

**Zellteilungsregulation meristematischer  
Wurzelzellen (Tabak BY-2) durch Phytohormone  
und Zucker**

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Fakultät für Biologie, Chemie und Geowissenschaften  
an der Universität Bayreuth

vorgelegt von  
Dipl.-Biol. Katja Hartig  
aus Meerane in Sachsen

Bayreuth, im März 2005

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Biologie, Chemie und Geowissenschaften der Universität Bayreuth genehmigten Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades Doktor der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.).

Diese Arbeit wurde in der Zeit vom Juni 2000 bis Februar 2005 am Lehrstuhl für Pflanzenphysiologie unter der Betreuung von Prof. Dr. Erwin Beck an der Universität Bayreuth angefertigt.

Die Arbeit wurde eingereicht am: 09. März 2005

Das Rigorosum fand am: 10. Juni 2005

Der Prüfungsausschuss bestand aus:

Prof. Erwin Beck (1. Gutachter)

Prof. Christian Lehner (2. Gutachter)

Prof. Gerhard Krauss

Prof. Ewald Komor

Prof. Benedikt Westermann (Vorsitz)

### **Vorträge und Poster, in denen Bestandteile dieser Arbeit vorgestellt wurden:**

- 2000 Deutsche Botanikertagung, in Jena: Posterpräsentation
- 2001 SPP „Molekulare Grundlagen der Phytohormonwirkung“ Treffen in Bad Honnef, Vortrag  
IPGS (International Plant Growth Substances) in Prag, Posterpräsentation
- 2002 SPP „Molekulare Grundlagen der Phytohormonwirkung“ Treffen in Hamburg, Vortrag und Posterpräsentation  
Deutsche Botanikertagung, in Freiburg: Posterpräsentation
- 2003 SPP „Molekulare Grundlagen der Phytohormonwirkung“ Treffen in Bad Honnef, Vortrag
- 2004 SPP „Molekulare Grundlagen der Phytohormonwirkung“ Treffen in Freising, Vortrag und Posterpräsentation „Cell cycle of tobacco BY-2 cells and the role of cytokinin Oxidase/Dehydrogenase“  
Internationales Cytokinin-Meeting, in Berlin: Vortrag „Cytokinin oscillation control cell cycle progression of tobacco BY-2 cells“  
Deutsche Botanikertagung, in Braunschweig, Posterpräsentation

### **Veröffentlichungen:**

- Hartig, K. & Beck, E. (2005) Cytokinin oscillation control cell cycle progression of tobacco BY-2 cells. *Plant Biology* 7: 33-41
- Hartig, K. & Beck, E. (2005) Long and short term effects of lovastatin on the cell cycle of tobacco BY-2 cells. In press (*Physiologia Plantarum*)

### **Assoziierte Diplomarbeiten und Praktika:**

- 2002 Christian Weiß (Konstruktion eines Vektors zur Überexpression des D-Cyclins)
- 2003 Gudrun von Scheven (Effekt externer Cytokinine)  
Denise Freimark (Screening nach dem Cytokinin Oxidase/Dehydrogenase-Gen in Tabak)
- 2004 Jolante Reth (Cytokininmuster am S/G2-Übergang) Diplomarbeit  
Kai Fuchsberger (Effekt des Anticytokinins)  
Angelika Munck (Untersuchung der Glukose-Präferenz 5 Tage alter BY-2 Zellen)

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>8</b>
1.1	STEUERUNG DER KOHLENHYDRATVERTEILUNG INNERHALB DER PFLANZE – REGULATION DER SINKSTÄRKE.....	8
1.2	DER ZELLZYKLUS BEI PFLANZEN .....	9
1.3	REGULATION DES PFLANZLICHEN ZELLZYKLUS DURCH ZUCKER, CYTOKININ UND AUXIN .....	13
1.4	DIE VERKNÜPFUNG DER ZUCKER-, CYTOKININ- UND AUXINSIGNALE IM ZELLZYKLUS.....	19
1.5	FRAGESTELLUNG.....	20
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>22</b>
2.1	GRUNDLAGEN .....	22
2.1.1	<i>Besondere Substanzen .....</i>	22
2.1.2	<i>Kultivierung der Tabak BY-2 Zellen.....</i>	23
2.1.3	<i>Synchronisation der BY-2 Zellen.....</i>	23
2.1.4	<i>Behandlungen der BY-2 Zellen zur Variation der Signalstärken .....</i>	24
2.1.5	<i>Versuchsaufbau .....</i>	25
2.2	ANALYTISCHE METHODEN .....	26
2.2.1	<i>Zellzahl, Zellvolumen, Frisch- und Trockengewicht .....</i>	26
2.2.1.1	<i>Zellzahl: Zählkammer und Durchflusscytometer.....</i>	26
2.2.1.2	<i>„Settled volume“, Frisch- und Trockengewicht.....</i>	26
2.2.2	<i>Anteil lebender Zellen.....</i>	27
2.2.3	<i>Quantifizierung des DNA-Gehaltes der Zellkerne.....</i>	27
2.2.4	<i>Ermittlung des Anteils sich teilender Zellen.....</i>	28
2.2.5	<i>Bestimmung des Mitose-Index.....</i>	29
2.2.6	<i>Expressionsmuster der Zellzyklus-Kontrollgene .....</i>	30
2.2.6.1	<i>Gewinnung von mRNA .....</i>	30
2.2.6.2	<i>Reverse-transcription-PCR .....</i>	30
2.2.7	<i>Bestimmung der Kohlenhydrate .....</i>	32
2.2.7.1	<i>Extraktionen der Kohlenhydrate .....</i>	32
2.2.7.2	<i>Lösliche Kohlenhydrate .....</i>	33
2.2.8	<i>Cytokinin-Analyse.....</i>	34
2.2.8.1	<i>Extraktionen der Cytokinine .....</i>	36
2.2.8.2	<i>Aufreinigung der Cytokinin-Extrakte .....</i>	36
2.2.8.3	<i>Trennungen der Cytokinine .....</i>	37
2.2.8.4	<i>Immunochemische Bestimmung der Cytokinin-Konzentrationen mittels ELISA.....</i>	39
2.2.9	<i>Messung der Aktivität der Cytokinin Oxidase/Dehydrogenase.....</i>	41
2.2.9.1	<i>Extraktionen der CKX .....</i>	41
2.2.9.2	<i>Messungen der CKX-Aktivität .....</i>	41
2.2.9.3	<i>Substratspezifität der CKX .....</i>	42
2.3	TRANSFORMATIONEN DER BY-2 ZELLEN .....	43
2.3.1	<i>Transformation der BY-2 Zellen mittels Agrobacterium tumefaciens.....</i>	44
2.3.2	<i>Transformation der BY-2 Zellen mittels Partikel Bombardement.....</i>	45
2.4	ALLGEMEINE MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN.....	45
2.4.1	<i>Extraktion von DNA aus Agarose-Gelen.....</i>	46
2.4.2	<i>Bestimmung der Reinheit und Konzentration von DNA .....</i>	46
2.4.3	<i>PCR .....</i>	46
2.4.4	<i>Klonierung von PCR-Produkten.....</i>	46
2.4.5	<i>Ligation.....</i>	47
2.4.6	<i>Transformation von Plasmiden in E.coli.....</i>	47
2.4.7	<i>Übernacht-Kulturen und Dauer-Kulturen von E.coli.....</i>	47
2.4.8	<i>Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien.....</i>	47
2.4.9	<i>Restriktionsverdau.....</i>	48
2.4.10	<i>Trennung von DNA mittels Gelelektrophorese.....</i>	48

<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>49</b>
3.1	CHARAKTERISIERUNG DER TABAK ZELLKULTUR BY-2 .....	49
3.1.1	<i>Wachstum der Zellkultur .....</i>	49
3.1.2	<i>Ablauf des Zellzyklus der BY-2 Zellen.....</i>	52
3.1.3	<i>Expressionsmuster der Zellzyklus-Kontrollgene .....</i>	54
3.2	INTERNE UND EXTERNE SIGNALE UND DEREN EINFLUSS AUF DEN ZELLYKLUS.....	57
3.2.1	<i>Welche Faktoren bewirken das Ende der Teilungsaktivität im Verlauf der Kultivierung?</i> .....	57
3.2.2	<i>Zucker als Wachstumsressource und Signal für meristematische Aktivität .....</i>	59
3.2.2.1	Verlauf der externer und interner Zuckerkonzentrationen im Verlauf der Kultivierung .....	60
3.2.2.2	Modifikationen des Zuckerangebotes .....	62
3.2.2.3	Einfluss des modifizierten Zuckerangebotes auf die Expression von Zellzyklus- Kontrollgenen .....	68
3.2.3	<i>Charakterisierung der Cytokinine als regulatorisches Signal im Zellzyklus der BY-2 Zellen.....</i>	72
3.2.3.1	Der endogene Cytokininspiegel der BY-2 Zellen im Verlauf des Zellzyklus .....	72
3.2.3.2	Die Cytokin Oxidase/Dehydrogenase Aktivität der BY-2 Zellen im Verlauf des Zellzyklus.....	73
3.2.3.3	Modifikationen des Cytokininsignals .....	76
3.2.3.4	Einfluss des veränderten Cytokininsignals auf die Expression von Zellzyklus- Kontrollgenen .....	89
3.2.4	<i>Charakterisierung des Auxinsignals als regulatorisches Signal im Zellzyklus der BY-2 Zellen.....</i>	93
3.2.4.1	Variation des Auxinangebots im Medium und Auswirkungen auf die Zellteilung .	93
3.2.4.2	Einfluss des veränderten Auxinsignals auf die Expression von Zellzyklus- Kontrollgenen .....	97
3.2.5	<i>Die Vernetzung der die Zellteilung regulierenden Signale .....</i>	97
<b>4</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>102</b>
4.1	CHARAKTERISIERUNG DER TABAK BY-2 ZELLKULTUR.....	102
4.1.1	<i>Tabak BY-2 Zellen – eine besonders schnell wachsende pflanzliche Zellkultur .....</i>	102
4.1.2	<i>Erst die Synchronisierung macht den sequenziellen Ablauf des Zellzyklus sichtbar....</i>	103
4.1.3	<i>Die Expression der meisten Zellzyklus-Kontrollgene ist nicht konstant.....</i>	104
4.2	INTERNE UND EXTERNE SIGNALE UND DEREN EINFLUSS AUF DEN ZELLYKLUS.....	106
4.2.1	<i>Platz, Zucker, und Auxin limitieren die Teilungsaktivität der Kultur im Verlauf der Kultivierung.....</i>	106
4.2.2	<i>Zucker als Wachstumsressource und Signal für meristematische Aktivität .....</i>	106
4.2.2.1	Die Zuckerquelle variiert im Verlauf der Kultivierung .....	106
4.2.2.2	BY-2 Zellen haben entwicklungspezifische Zuckerpräferenzen.....	107
4.2.2.3	Zucker ist nicht nur Metabolit, sondern auch ein wichtiges Signal bei der Regulation des Zellzyklus .....	108
4.2.3	<i>Charakterisierung der Cytokinine als regulatorisches Signal im Zellzyklus der BY-2 Zellen.....</i>	109
4.2.3.1	Der endogene Cytokininspiegel oszilliert im Zellzyklusverlauf.....	109
4.2.3.2	Der oszillierende Cytokininspiegel wird unter anderen durch die Regulation der Cytokin Oxidase/Dehydrogenase Aktivität erzeugt.....	110
4.2.3.3	Die endogenen Cytokin An- und Abreicherungen haben eine regulatorische Funktion im Zellzyklus .....	111
4.2.3.4	Die Oszillation der Cytokinine reguliert die phasenspezifische Expression der Cycline .....	114
4.2.4	<i>Charakterisierung des Auxinsignals als regulatorisches Signal im Zellzyklus der BY-2 Zellen.....</i>	115
4.2.4.1	Das Auxinangebot steuert die Entscheidung zwischen Zellteilung und Differenzierung .....	115
4.2.5	<i>Der „cross-talk“ der Signale findet auf verschiedenen Ebenen statt.....</i>	116

4.3	SCHLUSSBETRACHTUNGEN .....	118
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>121</b>
<b>6</b>	<b>SUMMARY .....</b>	<b>124</b>
<b>7</b>	<b>LITERATUR.....</b>	<b>127</b>
<b>8</b>	<b>ANHANG.....</b>	<b>134</b>
8.1	VERÄNDERUNG DER EXPRESSION VON CYCLIN D2;1 UND CDK2A DURCH ÜBEREXPRESSION UND GEN-SILENCING .....	134
8.2	UNTERSUCHUNG DER WIRKUNG DES ANTICYTOKININS 3-METHYL-7-(3-METHYLBUTYL-AMINO)PYRAZOLO[4,3- <i>D</i> ]-PYRIMIDINE AUF DAS WACHSTUM UND DIE ZELLTEILUNG DER TABAK BY-2 ZELLEN.....	137

## Abkürzungsverzeichnis:

Tabak BY-2	Tabak Linie Bright yellow 2
Cdk	Cyclin dependent kinase
Z	<i>t</i> -Zeatin
ZR	<i>t</i> -Zeatinribosid
Z9G	<i>t</i> -Zeatin-9-Glukosid
ZOG	<i>t</i> -Zeatin-O-Glukosid
ZROG	<i>t</i> -Zeatinribosid-O-Glukosid
ZRMP	Zeatin-Nukleotid
DHZ	Dihydrozeatin
DHZR	Dihydrozeatinribosid
DHZ9G	Dihydrozeatin-9-Glukosid
DHZOG	Dihydrozeatin-O-Glukosid
DHZROG	Dihydrozeatinribosid-O-Glukosid
DHZRMP	Dihydrozeatin-Nukleotid
IP	Isopentenyladenin
IPA	Isopentenyladenosin
IPAMP	Isopentenyladenin-Nukleotid
TG	Trockengewicht
FG	Frischgewicht
CKX	Cytokinin Oxidase/Dehydrogenase
AC	3-methyl-7-(3-methylbutylamino)pyrazolo[4,3- <i>d</i> ]-pyrimidine (Anticytokinin)
ER	Endoplasmatisches Retikulum
IES	Indol-3-Essigsäure
DMSO	Dimethylsulfoxid
min	Minute
h	Stunde
sec	Sekunde

# 1 Einleitung

## 1.1 Steuerung der Kohlenhydratverteilung innerhalb der Pflanze – Regulation der Sinkstärke

Pflanzen besitzen photosynthetisch aktive Gewebe („Source“) und Gewebe, die auf die Assimilatversorgung durch die Sourcegewebe angewiesen sind („Sink“). Bei den Sourcegeweben handelt es sich im Wesentlichen um ausgewachsene Blätter, welche die übrigen Organe - Blüten, Früchte, Wurzeln, junge, bzw. alte Blätter und Meristeme – mit Assimilaten in Form von Saccharose über das Ploem beliefern (Abb. 1). Die Saccharose wird im Sinkgewebe von extrazellulären Invertasen in die Hexosen Glukose und Fruktose gespalten. Die Hexosen werden dann von den Zellen aufgenommen und als Baustoff, bzw. Energieträger verwendet (Roitsch & Tanner; 1996). Auf Grund der vielfältigen Sinkgewebe ist es notwendig, dass die Pflanze Möglichkeiten besitzt, die Sinkstärke der verschiedenen Gewebe und damit deren Kohlenhydratverbrauch zu steuern. Nur auf Grund dieser Regulationen wird sichergestellt, dass die Verteilung der Kohlenhydrate innerhalb der Pflanze an die vorherrschenden Umweltbedingungen und den Entwicklungszustand angepasst wird.

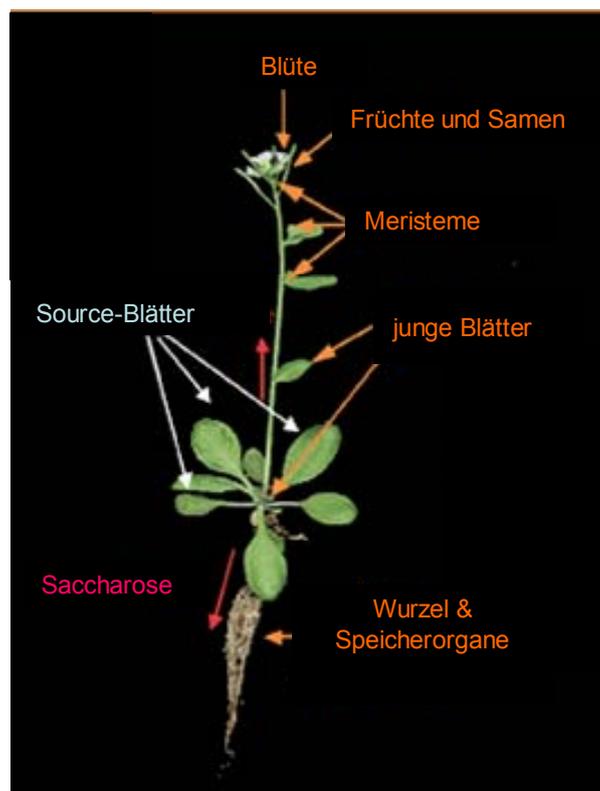


Abb. 1: Verteilung der Sink- (Blüte, Früchte und Samen, Meristeme, junge Blätter, Wurzel und Speicherorgane) und Sourcegewebe (adulte Blätter) innerhalb einer Pflanze. (nach Rolland et al.; 2002).

Besonders wichtige Sinkgewebe sind die Meristeme („utilization sink“), deren Sinkstärke vor allem über die Zellteilungsaktivität bestimmt wird. Die Verknüpfung von Informationen aus der gesamten Pflanze ist an dieser Stelle besonders wichtig. Es gibt Befunde, die darauf hinweisen, dass die Steuerung des Wurzel/Spross-Verhältnisses über die Verteilung von Phytohormonen erfolgt. So zeigten Wagner & Beck (1993), dass die an die Stickstoffversorgung gekoppelte Zellteilungskontrolle im Sprossmeristem über angelieferte Cytokinine geschieht. Außerdem stimulieren Cytokinine und Brassinosteroide die Zuckeraufnahme in *Chenopodium rubrum* Zellkulturen (Roitsch & Ehneß; 2000) und in Tabakblättern (Roitsch & Gonzalez; 2004) über die Aktivierung der extrazellulären Invertase und Induktion von Hexose-Transportern.

Zur Untersuchung der Regulation des Zellzyklus durch Phytohormone und dessen Verknüpfung mit der Sinkstärke wird ein geeignetes Modell benötigt. Die Tabak *bright yellow* - 2 Zellkultur (BY-2) ist eine heterotrophe Zellkultur, die auf die Zufuhr von Zucker und Auxin über das Medium angewiesen ist (Nagata et al.; 1992). Die Zellkultur entspricht auf Grund ihrer Herkunft einem Wurzelmeristem (Winicur et al.; 1998). Der wichtigste Aspekt, der diese Zellkultur zu einem ausgezeichneten Modellsystem klassifiziert, ist die Tatsache, dass die Zellteilung gut synchronisierbar ist. Mit Hilfe eines reversiblen Zellzyklusarrests ist es möglich bis zu 90 % der Zellen zum gemeinsamen Start des Zellzyklus am G1/S-Übergang zu bewegen (Nagata et al.; 1992).

## 1.2 Der Zellzyklus bei Pflanzen

Wie eben beschrieben, wird die Sinkstärke von Meristemen im Wesentlichen durch die Zellteilungsaktivität bestimmt. Aus diesem Grund werden zunächst der Ablauf des Zellzyklus und die beteiligte Komponenten erläutert.

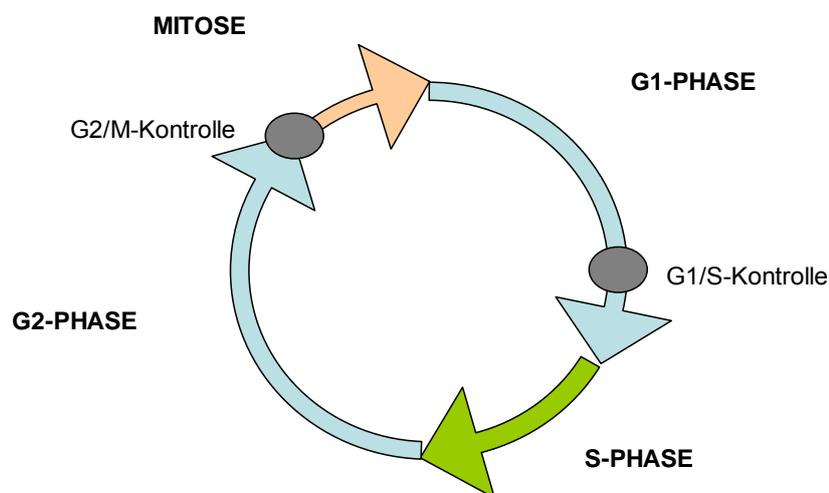
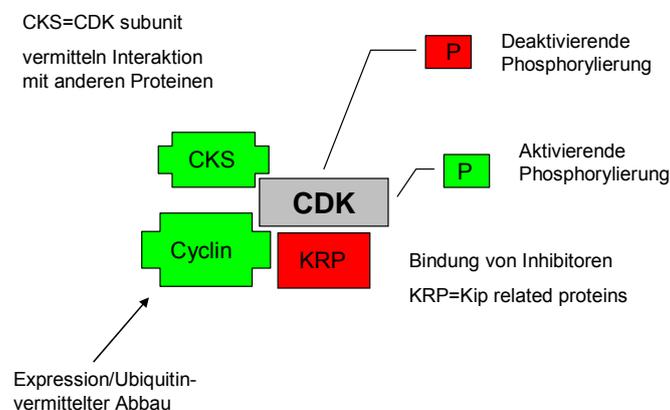


Abb. 2: Zellzyklusphasen und wichtige Kontrollpunkte des Zellzyklus.

Der Zellzyklus besteht aus vier verschiedenen Phasen (Abb. 2) (Dewitte & Murray; 2003). Zellen, die den Zellzyklus durch Differenzierung oder während einer Ruhephase verlassen haben, werden als G<sub>0</sub>-Zellen bezeichnet und können durch bestimmte Signale wieder in den Zellzyklus eintreten. Die Teilung beginnt in der G<sub>1</sub>-Phase. Es folgt die S-Phase, in der die Verdopplung der DNA stattfindet. Daran schließt sich die G<sub>2</sub>-Phase, gefolgt von der Mitose, in welcher die Trennung der Chromosomen vollzogen wird. Es existieren zwei wichtige Kontrollpunkte innerhalb des Zellzyklus, in der späten G<sub>1</sub>-Phase (Restriktionspunkt in tierischen Organismen, bzw. START bei Hefen) und am G<sub>2</sub>/M-Übergang. An diesen Stellen fließen viele externe und interne Signale zusammen und die Entscheidung wird gefällt, ob die nächste Phase der Teilung eingeleitet wird oder nicht. Ein Großteil der bislang gewonnenen Erkenntnisse über den Ablauf und die Regulation des Zellzyklus stammt aus Untersuchungen an Hefen (*Saccharomyces cerevisiae* und *S. pombe*) oder Tieren. Bei Pflanzen war bisher vor allem die geringe Synchronisierbarkeit der Zellen ein limitierender Faktor bei der Erforschung des Zellzyklus.

Eine zentrale Rolle im Ablauf des Zellzyklus spielen die Cyclin-abhängigen Kinasen (Cdk), die das Bindeglied zwischen den Signalen und der Reaktion auf Expressionsebene darstellen (Dewitte & Murray; 2003). Die Aktivität der Cdk wird dabei durch die Bindung von Cyclinen, inhibitorischen Proteinen, bzw. durch phosphorylierende oder dephosphorylierende Aktivierung oder Inhibierung reguliert (Abb. 3).



**Abb. 3: Möglichkeiten der Regulation der Cdk-Aktivität (nach Dewitte & Murray; 2003).**

Die Cdk der Pflanzen unterteilt man auf Grund bestimmter Protein-Motive in A- und B-Typen und eine Gruppe nicht klassifizierter Kinasen (Tab. 1), unter denen es auch Vertreter gibt, die keine Rolle im Zellzyklus spielen (Mironov et al.; 1999, Joubes et al.; 2001, Setiady et al.; 1996). Die genaue Funktion innerhalb des Zellzyklus ist nur von einigen Vertretern bekannt. So weiß man, dass die Cdk2a (Typ A) von *Arabidopsis thaliana* an beiden Kontrollpunkten des Zellzyklus eine Rolle spielen muss, während die CdkB (B-Typ) von *Arabidopsis thaliana* spezifisch an der Regulation des G<sub>2</sub>/M-Übergang beteiligt ist.

**Tab. 1: Klassifizierung der pflanzlichen Cdks, deren charakteristische Aminosäure-Motive und bekannte Expressionsmuster hinsichtlich des Zellzyklusverlaufs (nach Mironov et al.; 1999).**

Klassifizierung		Aminosäure-Motiv	Expressionsmuster
A		PSTAIRE	nicht spezifisch
B	1	PPTALRE	S/G2
	2	PPTTLRE	G2/M
nicht klassifiziert		NFTALKE	G1/S
		PITAIRE	nicht spezifisch
		SPTAIRE	nicht spezifisch

Die Aktivität der Cdk wird, wie bereits erwähnt, unter anderem über die Bindung von Cyclinen gesteuert (Mironov et al.; 1999, Cockcroft et al.; 2000). Auch die Cycline werden auf Grund bestimmter charakteristischer Proteinsequenzen in verschiedene Gruppen und Untergruppen unterteilt (Tab. 2). Die A-Cycline gruppiert man in drei, die B-Cycline in zwei und die D-Cycline in drei Untergruppen (Renaudin et al.; 1996). Die A- und B-Cycline besitzen eine konservierte Cyclin-Box und eine N-terminale Domäne („destruction-box“), die für den zyklischen Abbau der Cycline essentiell ist. Im Unterschied zu Tieren und Hefen besitzen einige B-Cycline der Pflanzen Kernlokalisations-Signale. Außerdem wurde bei Tieren bisher nur eine Gruppe von A-Cyclinen identifiziert, während bei Pflanzen inzwischen drei Untergruppen bekannt sind, die sich strukturell in der „destruction-box“ unterscheiden und unterschiedliche Funktionen besitzen (Reichheld et al.; 1996). Die A1- und A2-Cycline sind entsprechend den A-Cyclinen bei Tieren für den Ablauf der G2-Phase wichtig, während die A3-Cycline wahrscheinlich die Funktion der in Pflanzen fehlenden E-Cycline während der S-Phase ersetzen (Yu et al.; 2003).

**Tab. 2: Klassifizierung der pflanzlichen Cycline, deren charakteristische Aminosäure-Motive und bekannte Expressionsmuster bezüglich des Zellzyklusverlaufs (nach Renaudin et. al; 1996).**

Klassifizierung		Typische Aminosäuremotive	Expressionsmuster
A	1	Cyclin-Box, destruction-box	S
	2		G2/M
	3		G1/S
B	1	Cyclin-Box, destruction-box, Kernlokalisations-Motiv	G2/M
	2		G2/M
D	1	Cyclin-Box, LxCxE, PEST	G1
	2		G1 und G2/M
	3		G1 und G2/M
	4		G1

Die B-Cycline werden am stärksten am G2/M-Übergang exprimiert, was deren Funktion während der Einleitung der Mitose unterstreicht (Colon-Carmona; 1999, Shaul et al.; 1996, Criqui et al.; 2000). Die Besonderheit der D-Cycline, die Bindungspartner der Cdk während der G1-Phase sind, ist der Besitz eines Retinoblastomprotein-(pRb)-Bindemotiv LxCxE (Qin et al.; 1995). Während der G1-Phase liegt pRb gering phosphoryliert und damit gebunden an den Transkriptionsfaktor E2F vor. Am G1/S-Übergang wird das pRb durch die aktivierte Cdk phosphoryliert, der E2F-Faktor löst sich ab und wird dadurch aktiv (Nakagami et.al; 1999, Tonini et al., 2002). Auf diese Weise erfolgt die Aktivierung der für die S-Phase spezifischen Gene. Ein weiteres Merkmal der D-Cycline ist die PEST-Sequenz, die wahrscheinlich ein Abbau-Signal darstellt. Darüber hinaus ist die Sequenz der D-Cycline allerdings sehr variabel und weist im Vergleich zu den A- und B-Cyclinen eine geringere Homologie auf. Anfangs ging man davon aus, dass die Expression der D-Cycline im Verlauf des Zellzyklus unverändert ist. Die Untersuchung an der synchronisierbaren Zellkultur BY-2 lieferte jedoch ein anderes Bild. Danach wird zwar das Cyclin D3;2 während des Zellzyklus annähernd gleichmäßig exprimiert, die Cycline D2;1 und D3;1 zeigen jedoch eine ansteigende Expression von der G2-Phase bis zur Mitose (Sorrell et al.; 1999). Auf Grund der Tatsache, dass die D-Cycline eine Funktion während der G1-Phase besitzen, ist umstritten, ob dieser Effekt für Pflanzen generell anzunehmen ist oder eine untypische Einzelercheinung der BY-2 Zellen, vergleichbar mit Beobachtungen bei menschlichen HELA-Zellen, darstellt (Mironov et al.; 1999). Neben der Interaktion der D-Cycline mit Cdk besitzen diese eine weitere davon unabhängige Funktion, die im Abfangen von bestimmten Cdk-Inhibitoren besteht (Jasinski et al.; 2001).

Die Aktivität der Cdk wird, außer über die Bindung verschiedener Cycline, zusätzlich durch Inhibitoren, andere Kinasen (CAK) oder Phosphatasen reguliert. Die Inhibitoren der Cdk werden in

Anlehnung an die tierischen Inhibitoren als KRP (kip related proteins) bezeichnet. Die Expression der Inhibitoren wird im Zusammenhang mit der Wirkung von Abscisinsäure und dem Eintritt in die Stationäre Phase von Zellen beobachtet (Dewitte & Murray; 2003). Über die Klassifizierung und genaue Funktion der aktivierenden oder inaktivierenden Kinasen oder Phosphatasen ist bisher wenig bekannt. Der G2/M-Übergang wird allerdings durch das Zusammenspiel einer deaktivierenden Kinase (WEE 1) und dem Gegenspieler einer Cdc25 ähnlichen Phosphatase reguliert (Dewitte & Murray; 2003).

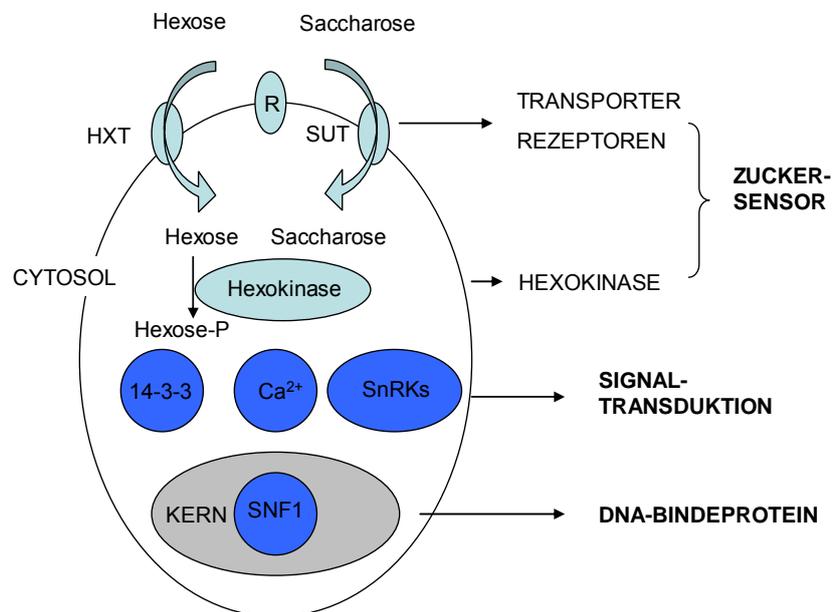
### **1.3 Regulation des pflanzlichen Zellzyklus durch Zucker, Cytokinin und Auxin**

Der Ablauf des Zellzyklus wird von vielen externen und internen Faktoren gesteuert. Diese Faktoren können Signale, wie beispielsweise Phytohormone, aber auch Metaboliten sein. Prinzipiell könnte die Regulation des Zellzyklus durch diese Faktoren auf verschiedenen Ebenen stattfinden. Zum einen könnte die Aufnahme bzw. Verfügbarkeit von essentiellen Nährstoffen oder Hormonen wechselseitig reguliert werden, was eine indirekte Steuerung der Zellteilungsaktivität zur Folge hätte. Zum anderen könnte die Regulation aber auch direkt über die Veränderung der Expression, bzw. Aktivität von Zellzyklus-Kontrollelementen erfolgen. Es handelt sich demnach vermutlich um ein kompliziertes Netzwerk, in dem sich Signale und Metabolite auf verschiedenen Ebenen gegenseitig beeinflussen können.

Schlüsselmetabolit bei der Regulation des pflanzlichen Zellzyklus ist die über das Phloem angelieferte Saccharose, die sowohl Baustoff als auch den wichtigsten Energielieferanten darstellt. Die Saccharose wird in aller Regel im Sinkgewebe von extrazellulären Invertasen in Glukose und Fruktose gespalten und über Monosaccharid- $H^+$ -Symporter von den Zellen aufgenommen. Auf Grund der gewebespezifischen Expression der apoplastischen Invertase wird dieser eine aktive Funktion bei der Sink/Source-Regulation der Kohlenhydratverteilung zugeschrieben (Roitsch et al.; 1995). Die Erkenntnis, dass der Einfluss des Zuckers nicht nur indirekter Natur ist, sondern dass Zucker auch ein Signal darstellt, resultiert aus der Tatsache, dass auch nicht metabolisierbare Zuckeranaloga in der Lage sind Zucker-spezifische Reaktionen in der Pflanze auszulösen (Rolland et al.; 2002).

Damit Zucker-spezifische Signaltransduktion stattfindet, muss die Zucker-Konzentration zunächst von der Zelle wahrgenommen werden. Bei Hefen und Tieren dienen Hexokinasen als Zuckersensor und auch in Pflanzen wurde die Bedeutsamkeit der Hexokinasen als Komponenten der Zuckersignaltransduktion durch Analyse entsprechender *Arabidopsis*-Mutanten nachgewiesen (Jang et al.; 1997, Smeekens; 2000, Smeekens & Rook; 1996, Jang & Sheen; 1997). In Pflanzen gibt es allerdings zusätzlich davon unabhängige Zuckersensoren (Abb. 4), denn auch Saccharose und

Trehalose lösen spezifische Reaktionen in Pflanzenzellen aus (Goddijn & Smeekens; 1998). Zum Beispiel reguliert Saccharose in keimenden Samen Differenzierung und Speicherung, während Hexose Wachstum und Metabolismus kontrolliert (Wobus & Weber; 1999). Auch Saccharoseanaloge, wie Palatinose oder Turanose, die nicht Membran permeabel sind, werden von den Zellen registriert. Dies deutet darauf hin, dass es weitere Sensoren in Form von Rezeptoren geben muss (Ferne et al.; 2001). Sowohl Saccharose, als auch Glukose und Fruktose, können mit Hilfe von Rezeptoren und im Zuge der Aufnahme durch die Transporter wahrgenommen werden. Endogen wird das Glukosesignal mit Hilfe von Hexokinasen gemessen, die entweder frei im Cytosol oder assoziiert mit Chloroplasten, bzw. Mitochondrien vorliegen (Rolland et al; 2002). Die Messung der Fruktose erfolgt zusätzlich über Fruktokinase. Somit scheint das Netzwerk der Zuckersignalwege in Pflanzen wesentlich komplexer als das der Tiere zu sein.



**Abb. 4: Zuckersensoren und Komponenten der Zuckersignaltransduktion in Pflanzen (Smeekens & Rook; 1997, Rolland et al.; 2002).**

**HXT – Hexosetransporter; SUT – Saccharosetransporter; R – Rezeptoren, 14-3-3 – konservierte Proteine; die an phosphorylierte Substrate binden; SnRKs – SNF1 verwandte Proteinkinasen; SNF1 – Ser/Thr Proteinkinase**

Der weitere Weg des Zuckersignals bis hin zu den Transkriptionsfaktoren ist nur unvollständig bekannt. Als gesichert gilt, dass Calcium, 14-3-3 Proteine und auch verschiedene SNF1<sup>1</sup> verwandte Proteinkinasen (SnRK<sup>2</sup>) involviert sind. Bei *Saccharomyces cerevisiae* führen die Signalwege des Zuckers im SNF1-Komplex zusammen, der neben Kinasen auch DNA-bindende Proteine enthält. Mit diesem Komplex können sowohl Gene reguliert, als auch Enzymaktivitäten verändert werden. Bei Pflanzen wurde ein entsprechendes Homolog entdeckt (Halford et al.; 1999). Viele Zucker-regulierte Gene besitzen ein *cis*-Element (SURE<sup>3</sup>) im Promotor, allerdings gibt es auch Gene, die keine dieser typischen Sequenzbereiche besitzen, so dass zusätzlich noch andere Erkennungssequenzen existieren müssen.

Bezüglich der Regulation des Zellzyklus durch das Zuckersignal ist bisher nur bekannt, dass Zucker die Expression der D2-Cycline direkt und die der D3-Cycline indirekt steuert (Riou-Khamlichi et al.; 2000).

Neben Zucker sind die Phytohormone die zweite Gruppe von essentiellen Signalen, die zur Aktivierung und Aufrechterhaltung des Zellzyklus notwendig sind. Innerhalb der Gruppe der Phytohormone sind Cytokinine und Auxine bei der Regulation der Zellteilung die Bedeutendsten. Andere Hormone wie Abscisinsäure (ABA), Jasmonsäure, Brassinosteroide oder Ethylen scheinen eher lokal oder in Stresssituationen bedeutsam zu sein. Aus diesem Grund konzentriert sich diese Arbeit auf die Regulation des Zellzyklus durch Cytokinine und Auxine. Im Folgenden werden beide Hormone vorgestellt und die bisherigen Erkenntnisse bezüglich der Regulation des Zellzyklus zusammengefasst.

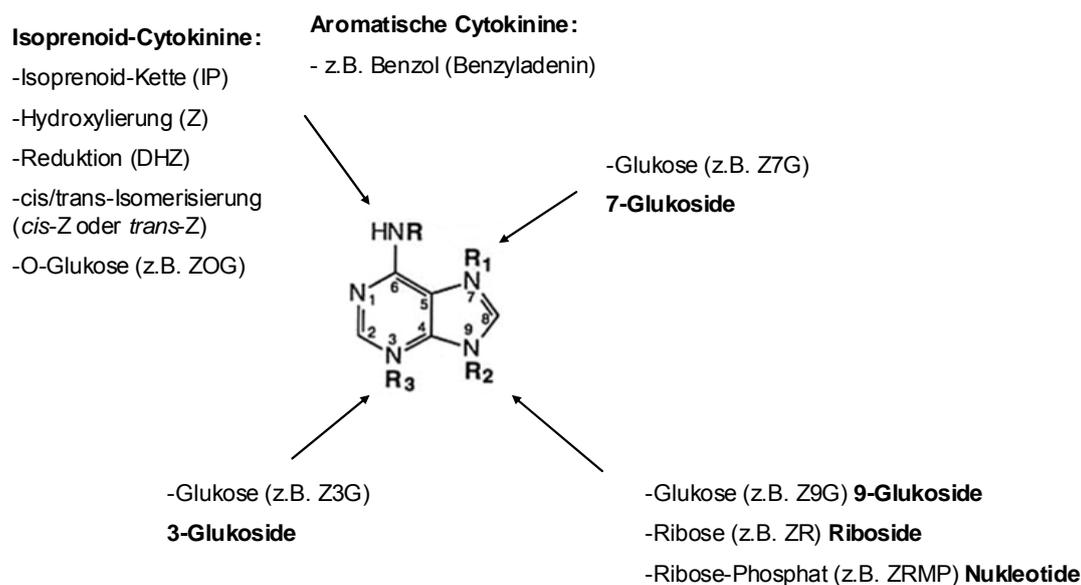
Seit der Entdeckung von Kinetin 1955 durch Skoog & Miller wurde eine große Anzahl natürlicher, aber auch synthetischer Cytokinine identifiziert (Mok & Mok; 2001). Die natürlichen Cytokinine sind Adeninderivate und können auf Grund der Art des N<sup>6</sup>-Restes in Isoprenoid- bzw. aromatische Cytokinine unterteilt werden (Mok & Mok; 2001). Die Vielzahl verschiedener Cytokinine resultiert aus den Substitutionsmöglichkeiten des Adenins, wie die Glukosylierung an Position 1, 3 oder 9 (Abb. 5). Eine Ribosylierung an Position 9 charakterisiert die Gruppe der Riboside. Befindet sich an der Ribose zusätzlich ein Phosphat, so bezeichnet man diese Gruppe als Nukleotide der entsprechenden Cytokinine. Hinzu kommen Modifikationen der N<sup>6</sup>-Isoprenoid-Seitenkette, wie *cis/trans*-Isomerisierung, Reduktion oder O-glukosidische Konjugation.

---

<sup>1</sup> SNF – sugar nuclear factor

<sup>2</sup> SnRKs - Snf1-related protein kinases

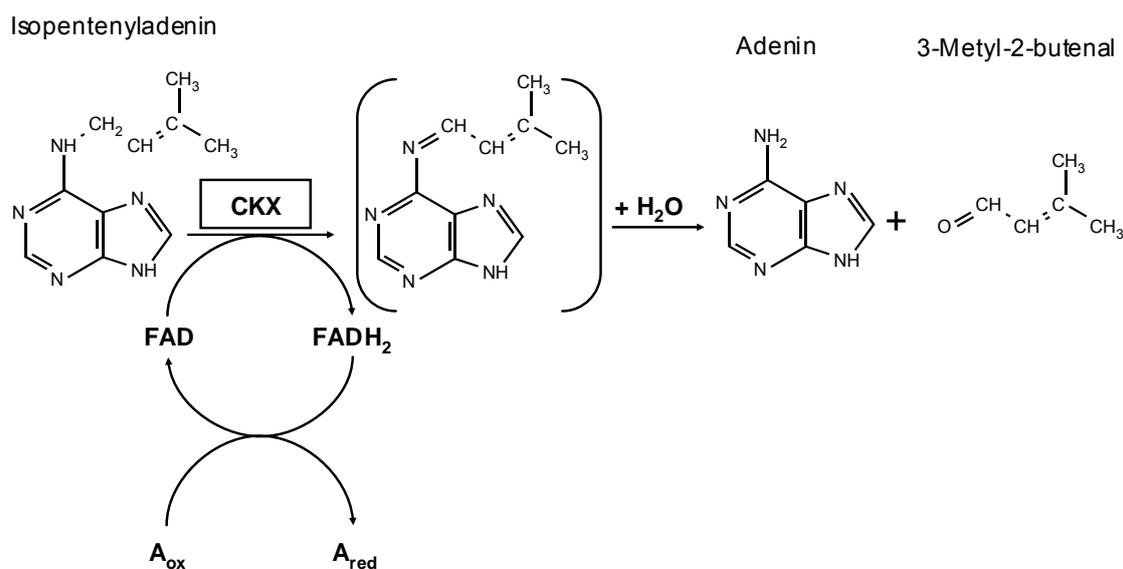
<sup>3</sup> SURE – sugar responsive



**Abb. 5: Überblick über Substitutionsmöglichkeiten am Adenin-Grundgerüst und die daraus resultierenden Gruppen von Cytokininen.**

**IP** – Isopentenyladenin; **Z** – Zeatin, **DHZ** – Dihydrozeatin; **ZOG** – Zeatin-O-Glukosid; **Z3G** – Zeatin-3-Glukosid; **Z7G** – Zeatin-7-Glukosid; **Z9G** – Zeatin-9-Glukosid; **ZR** – Zeatinribosid; **ZRMP** – Zeatin-Nukleotid

Der Metabolismus der Cytokinine in Pflanzen ist noch nicht in allen Einzelheiten aufgeklärt. In die Biosynthese sind Enzyme des Purinmetabolismus involviert, die den Adeningrundkörper synthetisieren. Darüber hinaus sind insgesamt 9 Isopentenyltransferasen bei *Arabidopsis* gefunden, deren Funktion die Übertragung der Isopentenyl-Gruppen von Dimethylallyl-Diphosphat auf ADP und ATP ist. Auf diese Weise entsteht das Grundgerüst der Cytokinine – Isopentenyladenosin-5'-triphosphat und Isopentenyladenosin-5'-diphosphat (Kakimoto; 2001, Takai et al.; 2001). Ausgehend von diesem Grundgerüst werden die verschiedenen Cytokinine unter Beteiligung von Reduktasen, *cis/trans*-Isomerasen, Glukosyltransferasen und weiterer Enzyme synthetisiert. Die Abbau der Cytokinin erfolgt durch die Cytokinin Oxidase/dehydrogenase (CKX) (Mok & Mok; 2001). Die CKX inaktiviert die Cytokinine durch Abspaltung der Isoprenoid-Seitenkette (Abb. 6) (Schmülling et al.; 2003). Bemerkenswert ist dabei, dass die CKX sowohl die Oxidation der Isoprenoid-Seitenkette durch  $FAD^{2+}$  und die hydrolytische Spaltung in einem enzymatischen Schritt durchführt. Der natürliche Elektronenakzeptor ist wahrscheinlich ein *p*-Chinon (Frebortova et al.; 2004), wobei die enzymatische Reaktion nicht vom Substrat limitiert wird, sondern von der Re-Oxidation des Enzyms, bzw. der Freisetzung des Produktes (Frebortova et al.; 2004).



**Abb. 6: Reaktionsmechanismus der CKX beim Abbau von IP (nach Frebortova et al. 2004)**

Der endogene Spiegel an Cytokinen wird jedoch nicht nur über die Biosynthese oder den Abbau reguliert, sondern die Konzentration kann in der Zelle zusätzlich durch Export oder Import von Cytokinen über Transporter der PUP<sup>4</sup>-Familie (Bürkle et al.; 2003) und dem reversiblen/irreversiblen Umbau in inaktive glukosidische Formen reguliert werden.

Obwohl eine große Anzahl Cytokinin bindender Proteine gefunden wurden, fand man die eigentlichen Rezeptoren erst 2001 in *Arabidopsis thaliana*. Es handelt sich bei diesen Kinasen um Histidin-Kinase des Zweikomponententyps (CRE<sup>5</sup> 1), deren Überexpression Cytokinin ähnliche Effekte hervor ruft (Schmülling; 2001). Im vollständig sequenzierten Genom von *Arabidopsis* sind alle Elemente des Zweikomponentensystems und darüber hinaus etwa 20 ARR<sup>6</sup> Gene vorhanden. Davon sind einige Cytokinin-sensitiv (Klasse A), andere wiederum nicht (Klasse B). Bisher wird die Vorstellung vertreten, dass eine Phosphorylierungskaskade das Signal von CRE 1 - mittels Transmitterproteinen - zu den Proteinen der Klasse B übermittelt. Diese Proteine regulieren dann die Expression der Gene der Klasse A. Die Kombinationen der einzelnen Komponenten führen letztlich zum großen Wirkungsspektrum.

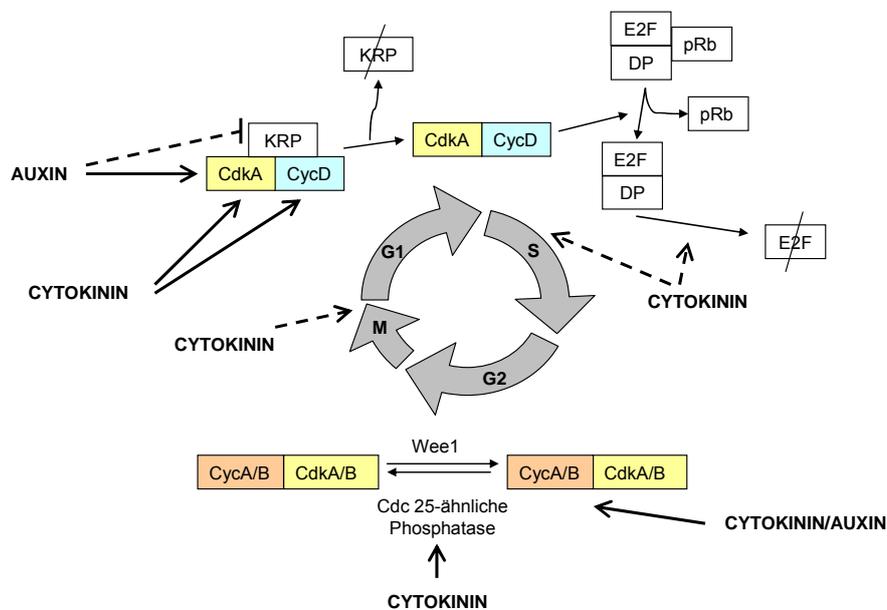
Der Einfluss von Cytokinin auf den Zellzyklus ist vielfältig. Obwohl dieses Phytohormon nach seiner teilungsfördernden Wirkung benannt wurde, ist noch immer wenig über die tatsächlichen Abläufe der Regulation des Zellzyklus bekannt. Bezüglich der Zellteilung sind Cytokinine essentiell, wobei es innerhalb der Pflanze sowohl Gewebe gibt, die auf eine Zufuhr von außen angewiesen sind, als auch Gewebe, die selbst Cytokinin produzieren. Als Cytokinin-autotroph gilt zum Beispiel das Wurzelmeristem, während das Sprossmeristem auf die Anlieferung von Cytokinen angewiesen ist

<sup>4</sup> PUP – purine permease

<sup>5</sup> CRE – cytokinin response

<sup>6</sup> ARR – response regulator gene

(Werner et al.; 2003). Auch die BY-2 Zellen sind Cytokinin-autotroph. Der endogene Cytokininspiegel synchronisierter BY-2 Zellen zeigt aber Schwankungen im Verlauf des Zellzyklus, deren genaue Position und Bedeutung allerdings bisher noch unklar ist (Redig et al.; 1996). Sicher ist jedoch, dass Cytokinine den Zellzyklus an mehreren Stellen beeinflussen (Roef & van Onckelen; 2004). Abb. 7 fasst alle bisherigen Erkenntnisse diesbezüglich zusammen. Demnach reguliert Cytokinin die Expression von D-Cyclinen (D3-Cycline) und die der CdkA und ist auf diese Weise an der Regulation des G1/S-Überganges beteiligt (Riou-Khamlichi et al.; 1999). Während der S-Phase beeinflussen Cytokinine in einer bisher unbekanntem Art und Weise die Replikation und damit die Länge der S-Phase (Houssa et al.; 1994). Darüber hinaus gibt es Hinweise, dass Cytokinine den Abbau des E2F-Transkriptionsfaktors fördern und damit den S/G2-Übergang regulieren. Eine weitere Funktion besitzen die Cytokinine am G2/M-Übergang, indem sie die Cdc25 ähnliche Phosphatase stimulieren. Diese Phosphatase aktiviert den CdkA/B-CyclinA/B-Komplex, der den Übergang zur Mitose ermöglicht (Zhang et al.; 2005).



**Abb. 7: Zusammenfassung aller bisher bekannten Einflüsse von Cytokinin und Auxin auf Komponenten des Zellzyklus (verändert nach Roef & van Onckelen; 2004). Cytokinin reguliert die Expression von D-Cyclinen und die Aktivität der CdkA (G1/S-Übergang), beeinflusst die Länge der S-Phase und den Abbau des E2F (S/G2-Übergang), reguliert die Expression der Cdk und Cycline am G2/M-Übergang und steuert die Aktivität der Cdc25-ähnlichen Phosphatase (G2/M-Übergang). Auxin beeinflusst die Expression der CdkA, hemmt den Effekt der KRP (G1/S-Übergang) und steuert die Expression der Cdk und Cycline am G2/M-Übergang. KRP – Kip related proteins (Inhibitoren); E2F – Elongation factor 2 (Transkriptionsfaktor); pRB – Retinoblastomprotein; DP – docking protein; Wee1 – Cdk-aktivierende Kinase**

Auxin wird vor allem eine Bedeutung bei der Zellstreckung und aber auch bei der Initiierung von Zellteilung und Differenzierung zugeschrieben. Der wichtigste natürliche Vertreter ist dabei Indolelessigsäure (IES) und ein wichtiges synthetisches Auxin ist 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (2,4-D). Die Ausgangssubstanz der Auxinbiosynthese ist Indol-3-Glycerolphosphat, aus dem über einen Tryptophan-abhängigen und Tryptophan-unabhängigen Weg IES synthetisiert wird (Cohen et al.; 2003). Der Abbau von IES erfolgt durch eine Oxidase. Um die Konzentration an freier IES in der Zelle zu regulieren gibt es zusätzlich die Möglichkeit der reversiblen Inaktivierung durch die Bindung an Glukose, Asparaginsäure oder *myo*-Inositol.

Es wurden bisher eine große Anzahl Auxin-bindender Proteine isoliert, darunter auch Influx (AUX1) und Efflux-Carrier (PIN-Familie) (Estelle; 2001, Vogler & Kuhlemeier; 2003). Ein Auxinrezeptor wurde allerdings bislang nicht gefunden. Auxin induziert eine Reihe von Genen, deren Promotoren bestimmte *cis*-aktivierende Elemente enthalten (Guilfoyer et al.; 1998, Li et al.; 1999). Interessant ist, dass es Gene gibt, die innerhalb von wenigen Minuten aktiviert werden. Im Zusammenhang mit der Regulation des Zellzyklus durch Auxin (Abb. 7) ist die Beteiligung am Ubiquitin-Proteosom-Weg, der auch für den Abbau einiger Cycline bedeutsam ist nachgewiesen (Del Pozo & Estelle; 1999). Bekannt ist darüber hinaus, dass die Expression der CdkA durch Auxin induziert wird, allerdings ist zur Aktivierung der Kinase zusätzlich Cytokinin erforderlich (John et al.; 1993, Coenen & Lomax; 1997). Ebenso wie Cytokinin ist Auxin ein essentieller Faktor für die Zellteilung. Meristeme und wachsende Pflanzenteile weisen hohe Auxinkonzentrationen auf und exportieren diese in andere Pflanzenteile. Der Export erfolgt im Spross basipetal und in der Wurzel akropetal.

## **1.4 Die Verknüpfung der Zucker-, Cytokinin- und Auxinsignale im Zellzyklus**

Um die Zellteilungsgeschwindigkeit an die Gesamtsituation der Pflanze anzupassen ist es notwendig, die einzelnen Signale sinnvoll zu verknüpfen („cross-talk“). Beispielsweise wird trotz Überangebot von Saccharose die Teilung im Apikalmeristem eingeschränkt, wenn zu wenig Stickstoff vorhanden ist (Beck; 1996). Die Erfassung des Stickstoffstatus erfolgt durch Cytokinine, die im Meristem angeliefert werden (Wagner & Beck; 1993). Darüber hinaus beeinflussen Cytokinine die Kohlenhydrataufnahme über die Regulation der Aktivität extrazellulärer Invertasen (Roitsch & Ehneß; 2000). Bei der genetischen Analyse vieler *Arabidopsis*-Mutanten mit veränderter Zuckerperzeption zeigte sich, dass es sich um bereits charakterisierte Phytohormon-Mutanten handelte (Leon & Sheen; 2003). Die Mehrzahl der bisher identifizierten Mutanten mit parallelen Defekten im Zucker- und Hormonsignalweg weisen zwar nur Veränderung der Abscisinsäure- oder Ethylen-Signalkette auf, trotzdem zeigt diese Feststellung eindrucksvoll die wahrscheinlich enge Verknüpfung von Zucker- und Hormonsignalwegen. Interaktionen zwischen Cytokinin und Auxin sind äußerst vielfältig.

Bezüglich der Zellzyklusregulation wirken allerdings beide Hormone synergistisch, wie zum Beispiel bei der Regulation der Expression und Aktivität der CdkA (John et al.; 1993, Coenen & Lomax; 1997).

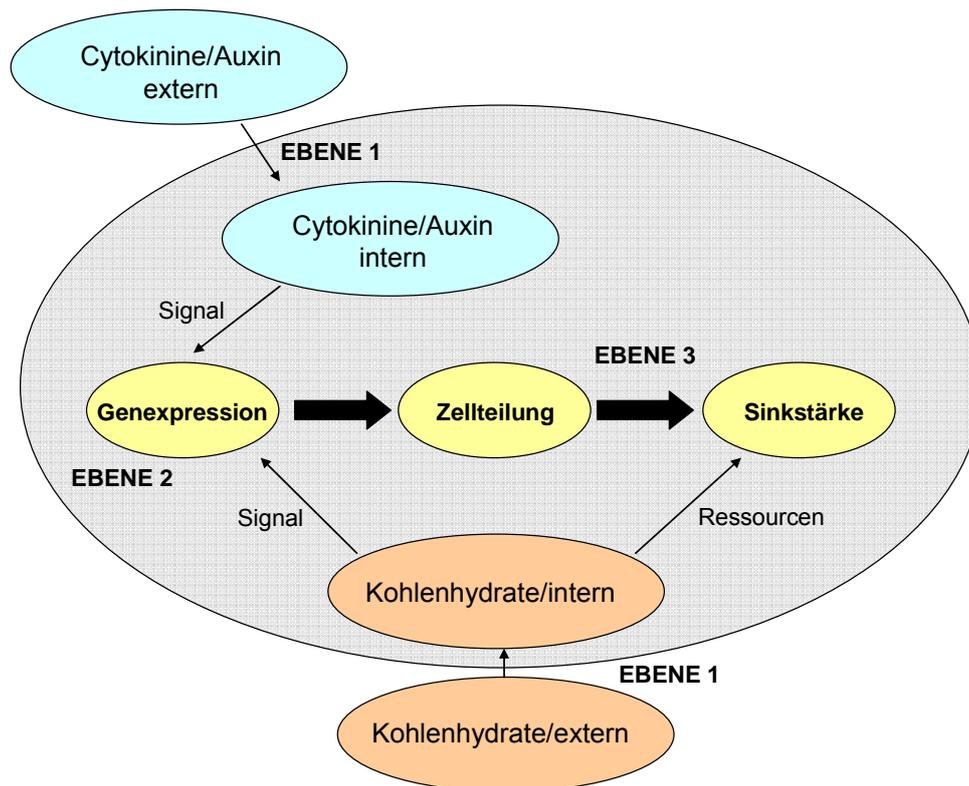
## 1.5 Fragestellung

Da bislang unbekannt ist, auf welche Weise Phytohormone die Zellteilungsaktivität pflanzlicher Meristeme und damit den Bedarf an Saccharose steuern, zielen die Untersuchungen dieser Arbeit auf die Kopplung von Zellteilung und Sinkstärke im weitesten Sinne ab. Als Modellsystem eines pflanzlichen Meristems wird die Tabak-Zellkultur BY-2 verwendet. Überprüft werden soll die Hypothese, ob die Spiegel an Cytokinen und Auxinen das Ausmaß der Zellteilung kontrollieren und auf diese Weise der Kohlenhydratverbrauch – die Sinkstärke – definiert wird. Da neben diesen beiden Hormonen auch die Kohlenhydrate selbst ein essentielles Signal für den Zellzyklus darstellen und die Teilung nur bei sinnvoller Verknüpfung aller Signale stattfindet, kommt dem „cross-talk“ zwischen den Signalen eine wesentliche Bedeutung zu.

Vordringlich ist insofern die Untersuchung der Zucker-, Cytokinin- und Auxinsignale in ihrer Wirkung auf die Zellteilung. Diese geschieht auf 3 Ebenen:

- Die **erste Ebene** befasst sich mit der Charakterisierung des Signals selbst und sollte die Fragen klären, wo und in welcher Form das Signal wahrgenommen wird. Die Beziehung zwischen externem und internem Signal steht dabei im Mittelpunkt.
- Die **zweite Ebene** erfaßt die Identifizierung von Zellzyklus-Kontrollgenen, welche an der Übertragung der Signale zum Zellzyklus hin beteiligt sind.
- Die **dritte Ebene** beinhaltet den Effekt der Signale auf die Zellteilungsaktivität und die damit verbundene Sinkstärke.

In Abb. 8 wird die den Untersuchungen zugrunde liegende Vorstellung verdeutlicht.



**Abb. 8: Regulatorische Ebenen, in denen die Signalverknüpfung zwischen Zucker-, Cytokinin- und Auxinsignal untersucht werden soll.**

Methodisch wird die Signalentstehung durch Messung externer und interner Zucker-, Cytokinin- und Auxinkonzentrationen im Kulturverlauf, genauer im Verlauf des Zellzyklus bearbeitet. Die Identifizierung Zucker-, Cytokinin- sowie Auxin-responsiver Zellzyklus-Kontrollgene wird durch qualitative und quantitative Variationen der untersuchten Faktoren und deren Auswirkung auf die Expression bislang bekannter Zellzyklus-Kontrollgene angestrebt. Mittels Kombination verschieden starker Einzelsignale sollen übergeordnete regulatorische Elemente, sowie Prioritäten innerhalb der Signale und mögliche Schnittstellen für den „cross-talk“ heraus gestellt werden. Die daraus resultierende Bedeutung der Zucker-, Cytokinin- und Auxinsignale bei der Regulation des Zellzyklus werden durch qualitative und quantitative Variation der Signale und die darauf folgenden kurzfristigen Effekte auf den Zellzyklus und längerfristigen Effekte auf die Entwicklung der Zellzahl, des Frischgewichtes und des Zellvolumens erfasst.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Grundlagen

In diesem Kapitel sollen die methodischen Grundlagen dieser Arbeit erläutert werden. Dazu zählt ein Überblick über wichtige verwendete Substanzen, die Kultivierung der Zellkultur, die Synchronisierung der Zellen und die Erläuterung des prinzipiellen Versuchsaufbaus.

#### 2.1.1 Besondere Substanzen

Die wichtigsten Stoffe, die zur Synchronisierung, Beeinflussung des Cytokinin-, bzw. Auxin-Haushalts und zur Selektion transformierter BY-2 Zellen verwendet wurden sind in Tab. 3 zusammengefasst.

**Tab. 3: Substanzen, mit denen die Tabak BY-2 Zellen während der Versuche behandelt wurden.**

Substanz	Hersteller	Lösungsmittel	Stammlösung [mg/ml]	Endkonzentration [µg/ml]
Aphidicolin	<i>A.G. Scientific, Inc.,</i> San Diego, USA	DMSO	5	5
Propyzamid	<i>Sigma-Aldrich,</i> Schnelldorf, Deutschland	DMSO	0,8	0,8
Claforan	<i>GIBCO-BRL,</i> Eggenstein, Deutschland	A. bidest.	250	250
Hygromycin B	<i>Sigma,</i> Taufkirchen, Deutschland	A. bidest.	15	50
Kanamycin	<i>Sigma,</i> Taufkirchen, Deutschland	A. bidest.	50	200
			[mM]	[µM]
Anticytokinin	<i>OlchemIm Ltd,</i> Olomouc, Tschechische Rep.	DMSO	1	0,05 – 0,5
Indolessigsäure (IES)	<i>Sigma-Aldrich,</i> Schnelldorf, Deutschland	100% Methanol	1	1

Z, ZR, DHZ, DHZR, IP; IPA	<i>OlchemIm Ltd,</i> Olomouc, Tschechische Rep.	A. bidest. und einem Tropfen konzentrierte HCl	1	1 und 6
Lovastatin	<i>Calbiochem,</i> Darmstadt, Deutschland	DMSO	12,35	5; 10 und 20

### 2.1.2 Kultivierung der Tabak BY-2 Zellen

In dieser Arbeit wurde eine heterotrophe Zellkultur von *Nicotiana tabacum* L. cv. Bright Yellow 2 (BY-2) verwendet (Nagata et al.; 1992). Die Linie, mit der die meisten Experimente durchgeführt stammt ursprünglich von Herrn Prof. Roitsch (Universität Würzburg) und wird seit dem Jahr 2000 am Lehrstuhl für Pflanzenphysiologie Bayreuth kultiviert. In einigen Versuchen wurde auch eine transgene Linie (GT 16, von Prof. Hasezawa, Universität Tokio) verwendet, in welcher ein  $\alpha$ Tubulin-GFP Fusionsprotein exprimiert und auf diese Weise der Tubulinanteil des Cytoskelettes der Zellen sichtbar wird.

Die Zellen wurden in *Batch*-Kultur und als Kallus-Kultur gezogen. Die Subkultivierung erfolgte nach jeweils 7 Tagen mit 2 % (v/v) Inokulum. Die Anzucht erfolgte in 250 ml Erlenmeyer-Kolben, die mit 100 ml Medium befüllt und mit Wattestopfen verschlossen wurden. Die Kultivierung fand im Dunkeln, bei 25 °C und bei permanentem Schütteln mit 125 rpm statt (Nagata et al; 1992, Nagata & Kumagai; 1999). Die Kalli wurden auf BY-2 Platten kultiviert und nach etwa einem Monat durch Transfer eines kleinen Teiles auf neue Platten verjüngt.

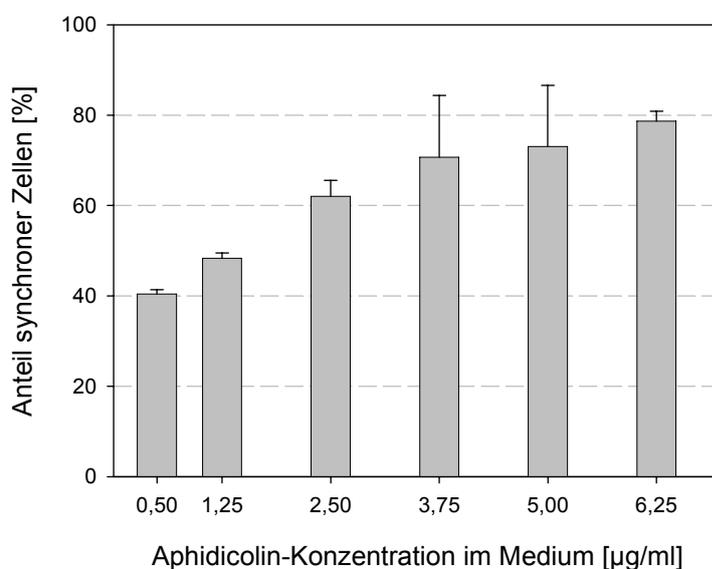
BY-2 Medium: 4,3 g/l MS-Medium (*Sigma-Aldrich*, Schnelldorf, Deutschland); 10,2 mM MES; 87,6 mM Saccharose; 2,8  $\mu$ M Thiamin; 0,55 mM *myo*-Inositol; 2,65  $\mu$ M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 8  $\mu$ M 2,4-D  
Vor dem Autoklavieren wurde das pH auf 5,8 (KOH) eingestellt

BY-2 Platten: BY-2 Medium enthält zusätzlich 0,8 % Agar

### 2.1.3 Synchronisation der BY-2 Zellen

Die Synchronisierung der Zellen erfolgte nach den Anweisungen von Nagata et al. (1992). Dazu wurden je 10 ml der Suspensionskultur in frisches Medium überimpft und 24 h lang mit Aphidicolin (Tab. 3) inkubiert. Aphidicolin ist ein Hemmstoff der DNA-Polymerase  $\alpha$  und bewirkt dadurch einen Arrest der Zellen am Beginn der S-Phase. Um das Aphidicolin zu entfernen und damit den Arrest zu lösen, wurde das Medium über eine Glasfritte entfernt und die Zellen mit 0,5 l Aphidicolin-freiem

BY-2 Medium unter geringem Vakuum gewaschen. Anschließend subkultiviert man die Zellen in frischem Medium. Ein Vorversuch ergab, dass mit Endkonzentrationen von 3,75 – 6,25  $\mu\text{g/ml}$  Aphidicolin die höchsten Synchronitäten mit 70 – 80 % erreicht wurden (Abb. 9). Routinemäßig wurde dann eine Endkonzentration von 5  $\mu\text{g/ml}$  Aphidicolin zur Synchronisierung verwendet. Die Synchronisierung erfolgte generell mit 5 bis maximal 7 Tage alten Zellkulturen (Zellen der Teilungsphase).



**Abb. 9: Anteil synchroner Zellen in Abhängigkeit von der Aphidicolin-Konzentration (n=3).**

Alternativ zu Aphidicolin kann auch Propyzamid zur Synchronisierung verwendet werden. Dieser Inhibitor unterbindet die Bildung der Mikrotubuli und erzeugt so einen reversiblen Arrest der Zellen in der Mitose. Die Zellen wurden zur Synchronisierung 16 h lang in BY-2 Medium mit Propyzamid (Tab. 3) inkubiert. Danach wurden die Zellen wie nach der Synchronisierung mit Aphidicolin gewaschen und in frisches Medium überführt.

## 2.1.4 Behandlungen der BY-2 Zellen zur Variation der Signalstärken

### - Untersuchung des Zuckermetabolismus

Das Standard-Medium der BY-2 Zellen enthält 87,6 mM Saccharose als Kohlenstoffquelle. Um zu untersuchen, welchen Einfluss Qualität und Quantität des Zuckers auf die Zellteilung der Kultur haben, wurde die Saccharose durch 87,6 mM Glukose und/oder Fruktose ersetzt, bzw. in einigen Versuchen verschiedene Konzentrationen an Saccharose oder Fruktose verwendet. Die Zugabe von Glukose und Fruktose erfolgte steril filtriert nach dem Autoklavieren. Als Kontrollansatz diente Medium ohne Zucker, welches als Osmotikum eine entsprechende Konzentration des nicht metabolisierbaren Sorbits enthielt.

### - Untersuchung des Cytokininsignals

Um das endogene Cytokininsignal zu erhöhen, wurden dem Medium verschiedene Cytokine zugesetzt (Tab. 3). Die Verminderung des endogenen Cytokininsignals wurde durch Verwendung von Lovastatin, einem Inhibitor der Cytokinin-Biosynthese (Tab. 3) (Crowell & Salaz; 1992) und eines Anticytokinins 3-Methyl-7-Pentylaminopyrazollo[4,3-*d*]Pyrimidin (Hecht et al.; 1971) erreicht (Tab. 3).

### - Untersuchung des Auxin-Signals

Das Kulturmedium enthält bereits das synthetische Auxin 2,4-D in einer Konzentration von 0,18 µg/ml (8 µM). In einigen Versuchen wurde die Konzentration von 2,4-D variiert oder aber durch Indoleessigsäure (Tab. 3) ersetzt.

## 2.1.5 Versuchsaufbau

Die hier beschriebenen Experimente, die zur Untersuchung des Einflusses von Zucker, Cytokinen und Auxin auf die Teilungsaktivität innerhalb dieser Arbeit durchgeführt wurden, sind zum einen längerfristige Beobachtungen von Effekten im Verlauf der Kultivierung (bis zu 20 Tagen) und zum anderen kurzfristige Untersuchungen von Effekten auf den Zellzyklus synchronisierter Zellen (bis zu 15 h). Tab. 4 gibt einen Überblick über die in den Experimenten verwendeten Methoden.

**Tab. 4: Überblick über die experimentellen Ansätze und die verwendeten Methoden.**

	Methoden	Beschreibung in:
<b>Längerfristige Versuche</b>	Zellzahlbestimmung	2.2.1.1
	Bestimmung des „settled volume“ und des Frischgewichtes	2.2.1.2
	Bestimmung des Anteils lebender Zellen	2.2.2
	Durchflusscytometrie (DNA-Gehalt)	2.2.3
	Bestimmung des Anteils sich teilender Zellen	2.2.4
	Bestimmung der Kohlenhydrate	2.2.7
	Bestimmung/Identifizierung der Cytokine	2.2.8
<b>Charakterisierung des Zellzyklus</b>	Durchflusscytometrie (DNA-Gehalt)	2.2.3
	Bestimmung/Identifizierung der Cytokine	2.2.6
	Messung der Aktivität der Cytokinin Oxidase/Dehydrogenase	2.2.9
	Expressionsmuster der Zellzyklusgenen	2.2.6
	Bestimmung des Mitose-Index	2.2.5

## 2.2 Analytische Methoden

Nachfolgend werden die in dieser Arbeit verwendeten analytischen Methoden im Detail beschrieben. Hierzu gehören zum einen Methoden, die der Charakterisierung der Zellkultur dienen, wie Zellzahl- oder Frischgewichtsbestimmung und die Beurteilung der Vitalität der Zellen. Weitere Methoden, die zur Untersuchung des Zellzyklus verwendet wurden, sind der Mitose-Index, die Bestimmung des DNA-Gehaltes und die Analyse der Expression von Zellzyklus-Kontrollgenen. Schließlich zählen dazu Methoden, die der Analyse des Zucker- und Cytokin-Haushaltes dienen, wie die Messung der Zuckerkonzentrationen, der Quantifizierung von Cytokininkonzentrationen und die Messung der CKX-Aktivität.

### 2.2.1 Zellzahl, Zellvolumen, Frisch- und Trockengewicht

#### 2.2.1.1 Zellzahl: Zählkammer und Durchflusscytometer

Bevor das Flow-Cytometer zur Verfügung stand, wurde die Zellzahl ausschließlich mit der Fuchs-Rosenthal Zählkammer ermittelt. Die Proben - je 0,5 ml Zellsuspension - wurden mit 0,5 ml 15 % Chrom(VI)Oxid-Lösung versetzt und 15 min lang bei 70 °C erhitzt. Danach wurden die Zellen abzentrifugiert und der Überstand durch das gleiche Volumen A. bidest. ersetzt. Durch mehrfaches Aufziehen mit einer Spritze wurden die Zellen vereinzelt. Anschließend wurden Aliquots der Zellsuspension in der Fuchs-Rosenthal-Zählkammer mikroskopisch bei 100facher Vergrößerung ausgezählt. Dabei wurden je 8 auf einer Diagonale liegende Großquadrate pro Zählung ausgewertet. Jede Probe wurde dreifach gezählt und die Werte gemittelt.

Die Bestimmung der Zellzahl mit dem Durchflusscytometer (siehe 2.2.3) erfolgt über die Ermittlung der Anzahl von Zellkernen. Zur Bestimmung der Zellzahl wurden, je nach Dichte der Zellen 0,1 - 2 ml Zellsuspension (das Frischgewicht muss < 0,1 g sein) entnommen, das Medium über eine Glasfritte entfernt und die Zellen in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Proben wurden bis zur Analyse bei -20 °C gelagert. Bis zu einem Kulturalter von 8 Tagen ergaben beide Methoden identische Zellzahlen. Bei älteren Zellen verhindert die zunehmende Schleimproduktion eine quantitative Extraktion der Zellkerne. Da die Versuche allerdings fast ausschließlich mit maximal 7 Tage alten Zellen durchgeführt wurden, war die Relevanz dieses Problems marginal.

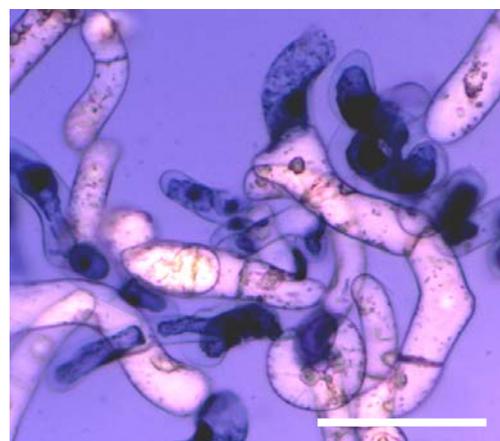
#### 2.2.1.2 „Settled volume“, Frisch- und Trockengewicht

Zur Bestimmung des „settled volume“ der Zellen wurden 10 ml Suspension entnommen und exakt 30 min in einem graduierten Reagenzglas sedimentiert (Crowell & Salaz; 1992). Danach wurde das Volumen des Zellsedimentes abgelesen. Zur Bestimmung des Frischgewichtes wurden entweder 10 ml Suspensionskultur oder der Inhalt eines gesamten Kolbens geerntet. Das Medium wurde über eine

Glasfritte abgesaugt und die Zellen mehrfach mit A. bidest. gewaschen. Danach wurden die Zellen exakt 2 min lang trocken gesaugt und das Frischgewicht bestimmt. Um das Trockengewicht der Zellen zu ermitteln, wurden die gewaschen Zellen 12 h lang bei 60 °C getrocknet.

### 2.2.2 Anteil lebender Zellen

Um die Vitalität der Zellen zu verfolgen wurden Proben (0,2 – 1 ml Suspension) entnommen und mit einem Tropfen 0,5 % „Evan’s Blue“-Lösung (in A. bidest., *Sigma*, Taufkirchen, Deutschland) versetzt (Gaff & Okong’o-Ogola; 1971). Die toten Zellen färbten sich dunkelblau, während die lebenden Zellen ungefärbt blieben. Unter dem Lichtmikroskop wurde dann der Anteil toter, bzw. lebender Zellen in der Probe bestimmt (Abb. 10).



**Abb. 10: BY-2 Zellen mit „Evans-Blue“ gefärbt. Die lebenden, ungefärbten Zellen sind deutlich von den dunkelblau gefärbten toten Zellen zu unterscheiden. Der Balken entspricht 100 µm.**

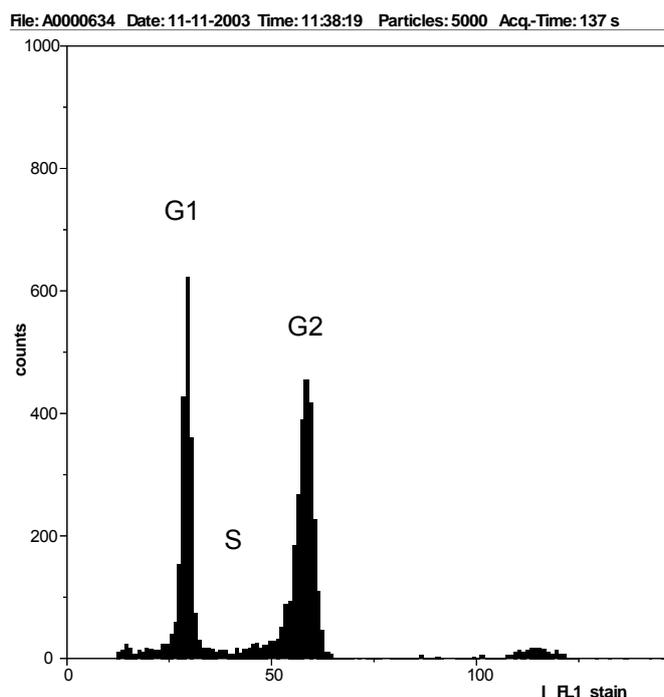
### 2.2.3 Quantifizierung des DNA-Gehaltes der Zellkerne

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie kann der DNA-Gehalt der Zellkerne bestimmt werden. Der DNA-Gehalt verdoppelt sich während der S-Phase des Zellzyklus und halbiert sich wieder während der Mitose. Auf diese Weise kann über den DNA-Gehalt die Position einer Zelle im Zellzyklusverlauf ermittelt werden. Gleichzeitig wird über die Anzahl der Kerne die Zellzahl in einem definierten Volumen (200 µl) bestimmt (siehe 2.2.1.1).

Zunächst musste aber die Isolierung der Zellkerne optimiert werden, da das im Kit „CyStain UV precise P“ (*Partec*, Münster, Deutschland) mitgelieferte Extraktionsmedium nicht in der Lage war, die Zellkerne aus frisch geernteten BY-2 Zellen herauszulösen. Wurden die Zellen jedoch zuvor in flüssigem Stickstoff eingefroren, konnten die Zellkerne vollständig und intakt isoliert werden. Zur Messung wurden die gefrorenen Zellen aufgetaut. Nach dem vollständigen Auftauen musste die Probe sofort weiter verarbeitet werden, um die Qualität der Zellkerne zu erhalten. Die übrigen Aufarbeitungsschritte der Proben wurden nach Angaben des Herstellers (CyStain UV precise P; *Partec*, Münster, Deutschland) durchgeführt.

Das hier verwendete Durchflusszytometer PA 1 (*Partec*, Münster, Deutschland) bestimmt die DNA-Gehalte einer definierten Menge von Zellkernen, indem die Fluoreszenz-Intensität der DAPI-gefärbten

Kerne quantifiziert wird. Routinemäßig wurden pro Messung stets 5000 Kerne analysiert. In einem Histogramm wird die Anzahl der Zählereignisse gegen deren Fluoreszenz-Intensität aufgetragen (Abb. 11). Die charakteristischen Anhäufungen von gezählten Kernen bei einem bestimmten DNA-Gehalt entsprechen der G1- (diploid) und der G2-Phase (tetraploid). Im Verlauf der DNA-Synthese während der S-Phase weisen die Zellkerne eine Fluoreszenzintensität auf, die zwischen den G1- und G2-Peaks liegt. Die Mitose kann mit dem Durchfluscytometer nur indirekt über das Verschwinden von G2-Zellen und das gleichzeitige Auftauchen von G1-Zellen im zeitlichen Verlauf ermittelt werden.



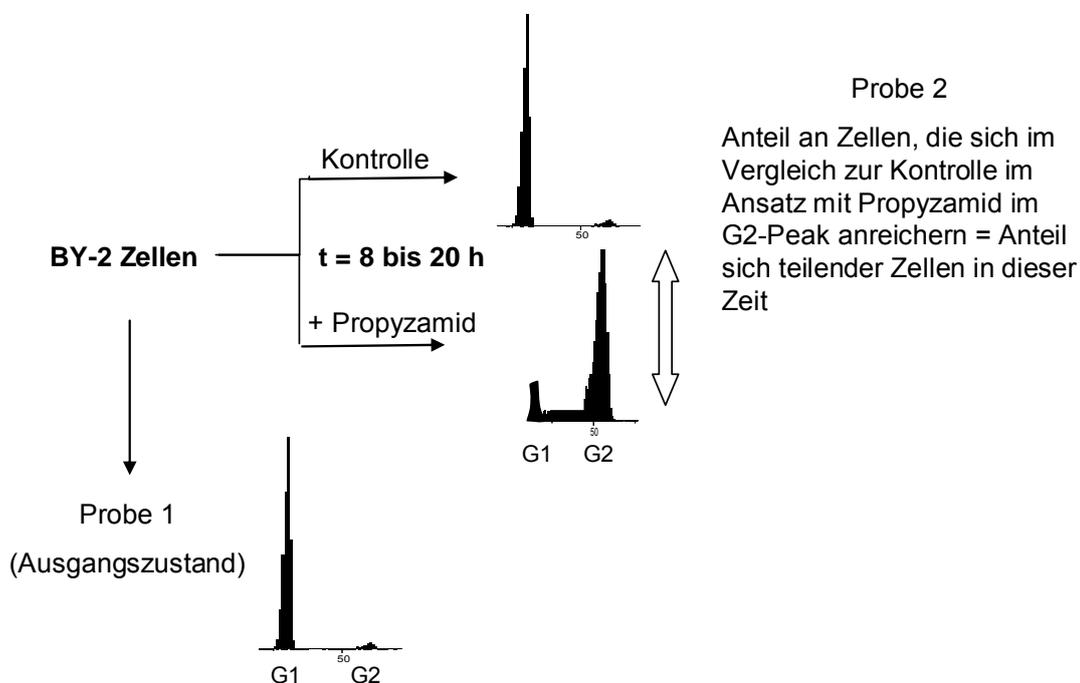
**Abb. 11:** Analyse des DNA-Gehaltes einer synchronisierten Tabak BY-2 Zellkultur durch Durchfluscytometrie. Dargestellt sind auf der Ordinate die Anzahl der Zählereignisse und auf der Abszisse die Fluoreszenz-Intensität der Kerne. Der Peak mit der geringeren Fluoreszenz-Intensität entspricht den G1-Zellen ( $2n$ ), der mit der höheren den G2-Zellen ( $4n$ ) und die Zählereignisse zwischen diesen beiden Peaks entsprechen den Zellen in der S-Phase. Bei der kleinen Anhäufung von Zellen rechts vom G2-Peak handelt es sich um polyploide Zellen ( $8n$ ).

Die Auswertung der Histogramme, das heißt die Bestimmung der Anteile der Zellen in verschiedenen Zellzyklus-Stadien, erfolgte mit dem Programm DPAC (*Partec*, Münster, Deutschland).

#### 2.2.4 Ermittlung des Anteils sich teilender Zellen

Der Anteil sich teilender Zellen wurde durch Vergleich der DNA-Gehalte vor und nach einer Behandlung mit Propyzamid ermittelt (Abb. 12). Um den Anteil von Zellen zu ermitteln, die sich innerhalb einer bestimmten Zeit geteilt haben, wurde der Zellzyklus durch Zugabe von Propyzamid (Tab. 3) während der Mitose gestoppt. Dazu wurde vor und nach der Behandlung eine Probe zur

Bestimmung des DNA-Gehaltes entnommen (Probennahme wie in 2.2.3). Durch Vergleich des Anteils an G2-Zellen vor und nach der Propyzamid-Behandlung mit Hilfe des Durchflusscytometer (siehe 2.2.3) konnte der Anteil von sich teilenden Zellen in dieser Zeit bestimmt werden.



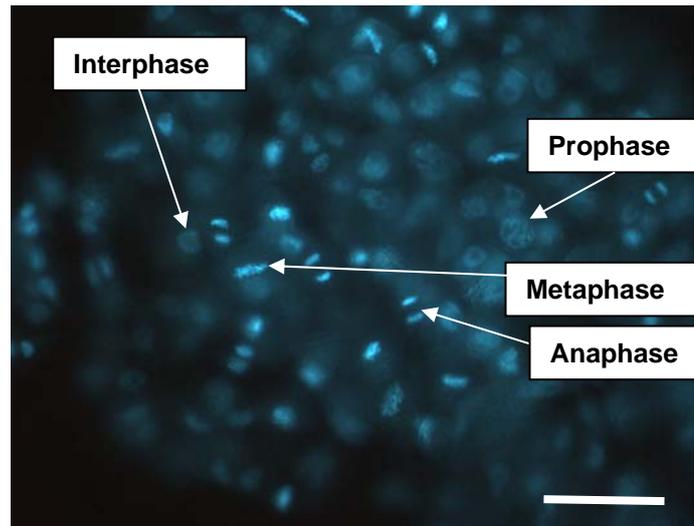
**Abb. 12: Verfahren zur Ermittlung des Anteils der sich in einer definierten Zeit teilenden Zellen. Durch Behandlung mit Propyzamid arretieren die sich teilenden Zellen während der Mitose und können über die Zunahme des Anteils an G2-Zellen gegenüber dem Ausgangszustand bestimmt werden.**

### 2.2.5 Bestimmung des Mitose-Index

Zur Bestimmung des Mitose-Index wurde je 1 ml Zellsuspension sofort nach der Probennahme zentrifugiert, das Medium durch Fixierlösung (Ethanol:Eisessig 3:1, Gerlach; 1984) ersetzt und bei 4 °C gelagert.

Die fixierten Zellen wurden dreimal mit je 1 ml A. bidest. gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurden die Zellen in 100 µl DAPI-Lösung (2 µg/ml) suspendiert und 20 min lang bei 0 °C im Dunkeln angefärbt. Die gefärbten Zellen wurden einmal mit 1 ml A. bidest. gewaschen und in 200 µl A. bidest. aufgenommen und sofort unter dem UV-Mikroskop (Anregungswellenlänge: 372 nm; Emissionswellenlänge: 456 nm) betrachtet (Abb. 13). Zur Bestimmung des Mitose-Index wurde der prozentuale Anteil von Zellen in Mitose-Phasen bei ca. 1000 Kernen ermittelt.

**Abb. 13: Mit DAPI gefärbte BY-2 Zellen im UV-Lichtmikroskop. Zu sehen sind die Mitose-Stadien: Prophase, Metaphase, Anaphase und im Vergleich dazu ein Kern in der Interphase. Der Balken entspricht 100  $\mu\text{m}$ .**



## 2.2.6 Expressionsmuster der Zellzyklus-Kontrollgene

Um Proben zur Analyse der Expressionsmuster der Zellzyklus-Kontrollgene mittels RT-PCR zu gewinnen, wurden je 0,3 ml Suspension direkt in Eppendorfgefäße gegeben und in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert. Die Zeitpunkte der Probennahme wurden so gewählt, dass möglichst jede Phase des Zellzyklus erfasst wurde.

### 2.2.6.1 Gewinnung von mRNA

Die mRNA der BY-2 Zellen wurde mit Hilfe des „Dynabeads mRNA purification Kit“ (Dyna, Skoyen, Norwegen) nach Angaben des Herstellers isoliert und direkt zur RT-PCR verwendet.

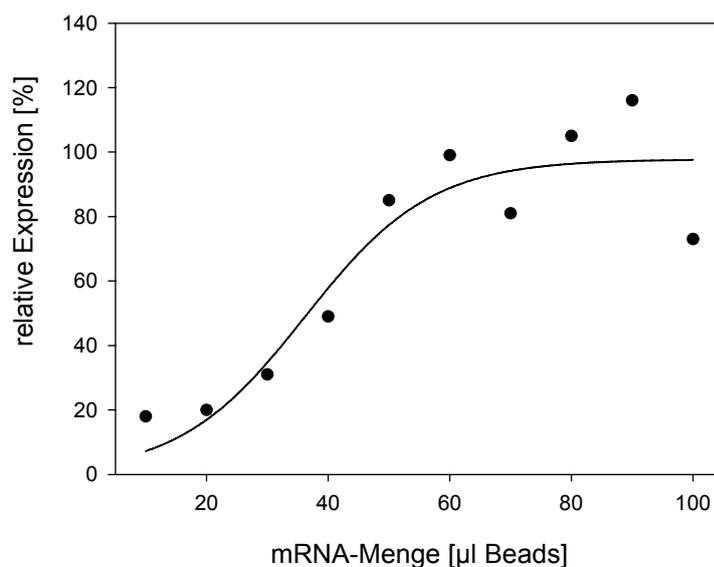
### 2.2.6.2 Reverse-transcription-PCR

Auf Grund der geringen Expression der meisten Zellzyklus-Kontrollgene konnten keine aussagekräftigen Northern Blots erstellt werden. Um möglichst viele verschiedene Signale zu erfassen, wurde versucht mittels „Reverse-transcription-PCR“ (RT-PCR) die Transkriptmengen der bis dato von Tabak bekannten Zellzyklus-Kontrollgene zu quantifizieren. Die dazu verwendeten Primer wurden mit Hilfe des Programms GCG (DKFZ, Heidelberg, Deutschland) konstruiert (Tab. 5) und von MWG Biotech AG (Ebersberg, Deutschland) oder von Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland) bezogen.

**Tab. 5: Übersicht der verwendeten Primer-Paare.**

Bezeichnung	Accession-Nummer	Oligonukleotidsequenz	bp
Cyclin D3;1	AJ011893	5'-ATCTCCTCCTCTCTATTATGGC-3'	114
		5'-CAACAGAATTACAAGGCTCAAC-3'	
Cyclin D3;2	AJ011894	5'-TGCAATGGAATACCAGAATCAG-3'	318
		5'-CCCACAACGACAGAAACAG-3'	
Cyclin D2;1	AJ011892	5'-GATCAAATCCCATCTCGGC-3'	344
		5'-CCAAGTGTCTCTCATCACC-3'	
Cdk2a	AF289467	5'-AAAGTTGAGAAGATTGGGGAAG-3'	340
		5'-GACAATAAGCAATACCACGGAG-3'	
CdkB1-1	AF289465	5'-GAAATTGGAGAAAGTAGGAGAAGG-3'	324
		5'-ATGAGAGAAGGAGGGAGAGG-3'	
Cyclin A3;3	X93467	5'-CACCCACAACCTCCAAACAC-3'	274
		5'-CACCTCCACTAACCAATCAAC-3'	
Cyclin B1;2	Z37978	5'-ACCAGAAGGGAGAAATAGGAAAG-3'	304
		5'-AGCAGTGAGAGTAGAAGTAAGAG-3'	
pRb	AB015221	5'-CCCCCAAACCATCTCCATTTCC-3'	265
		5'-ACCAAGCCCGCATCAACATC-3'	
Histon H3	Y14195	5'-TCCCTCTACCCCTCCTTTTC-3'	165
		5'-GCTTTTGTAGCTAATTGCTTCC-3'	
Aktin	AB158612	5'-AGGCATTCACGAAACGAC-3'	219
		5'-ATAGAACCTCCAATCCAAACAC-3'	
Cytokinin-Rezeptor (CRE1)	AF302082	5'-TTCCTACTACCACCATGCCC-3'	420
		5'-GCTCCAAAACCTTCCACTCCC-3'	

Die an Dynabeads gebundene mRNA wurde direkt nach der Isolierung zur RT-PCR verwendet. Die RT-PCR wurde mit dem „ProStar™ HF Single-Tube RT-PCR System“ (Stratagene, La Jolla, USA) durchgeführt und dabei nach Angaben des Herstellers vorgegangen. Die PCR-Produkte wurden durch Gel-Elektrophorese getrennt (siehe 2.4.10) und mit Hilfe der Software „Image Master 2D-prime“ (Amersham Pharmacia Biotech, Frankfurt, Deutschland) quantifiziert. Um zu gewährleisten, dass die Menge an PCR-Produkt der Menge der mRNA entsprach, wurde vor Versuchsbeginn die optimale Menge an mRNA (bzw. Beads mit mRNA) ermittelt (Abb. 14).



**Abb. 14: Optimierung der in der PCR eingesetzten mRNA-Menge am Bsp. des Cyclins D3;2. In diesem Fall tritt bei Verwendung von mehr als 60 µl Beads eine Sättigung bei der PCR-Reaktion ein. Deshalb wurden im PCR-Ansatz nur 30 – 50 µl Beads verwendet.**

Um sicher zu stellen, dass es sich bei den amplifizierten Fragmenten tatsächlich um Stücke der zu untersuchenden Gene handelt, wurden die PCR-Fragmente aller untersuchten Gene in *E. coli* transformiert und vermehrt (siehe 2.4.4). Anschließend wurden die Fragmente sequenziert (*GATC Biotech AG*, Konstanz, Deutschland). In allen Fällen handelte es sich um das gewünschte Fragment. In einigen wenigen Versuchen trat zusätzlich zu dem gewünschten Fragment ein etwas kleineres Fragment auf. Auch diese Fragmente wurden identifiziert und es handelte sich um PCR-Fragmente der entsprechenden Gene, denen ein bis zu 50 bp großes Stück fehlte. Das Auftreten dieser verkürzten PCR-Fragmente zeigte einen klaren Zusammenhang zur Aufarbeitung der mRNA. Auf Grund der Tatsache, dass es sich um Stücke des untersuchten Genes handelte, wurde in einem solchen Fall die Quantifizierung beider Banden zusammengefasst.

## 2.2.7 Bestimmung der Kohlenhydrate

### 2.2.7.1 Extraktionen der Kohlenhydrate

Für die Bestimmung der Zuckerkonzentrationen wurden die Zellen und das Medium von 10 ml Suspension durch Zentrifugation getrennt. Die Zellen wurden lyophilisiert und das Medium direkt eingefroren. Die Proben wurden bis zur Analyse bei -20 °C gelagert.

Die Extraktion der löslichen Kohlenhydrate erfolgte durch Zugabe von 1 ml Extraktionspuffer (80 % Ethanol, 20 % 5 mM HEPES, pH 7,5) 45 min lang, unter Schütteln und bei 70 °C. Der Extraktionsansatz wurde danach 15 min lang bei 17000 x g zentrifugiert und der Überstand zur Analyse der Kohlenhydrate verwendet. Aus dem Präzipitat wurde die Stärke nach Stitt et al. (1978) extrahiert. Dazu wurde das Pellet mit 1 ml Ethanol und zweimal mit A. bidest. gewaschen. Die Stärke

wurde dann in 0,8 ml A. bidest. resuspendiert und 2 h im Trockenschrank bei 110 °C inkubiert. Anschließend wurde die Stärke mit 0,5 ml Natriumacetatpuffer pH 4,8, 10 µl Amyloglukosidase (1,4 U; *Roche*, Mannheim, Deutschland) und 10 µl  $\alpha$ -Amylase (2 U; *Roche*, Mannheim, Deutschland) versetzt und 2 h unter Schütteln bei 37 °C hydrolysiert. Die Analyse des Stärkegehaltes in Hexoseeinheiten erfolgte wie die Bestimmung der löslichen Kohlenhydrate. Hierfür wurde ein Probevolumen von 20 µl verwendet.

### 2.2.7.2 Lösliche Kohlenhydrate

Die Messung der Glukose-, Fruktose- und Saccharose-Konzentrationen erfolgte enzymatisch mit Hilfe eines gekoppelten optischen Tests (Bergmeyer & Bernt; 1974). Die Messung von Glukose wird durch Umwandlung der Glukose in Glukose-6-Phosphat (Hexokinase) und die anschließende Umwandlung in 6-Phosphoglukonat (Glukose-6-P-dehydrogenase) erreicht, bei der gleichzeitig eine Reduktion von NADP zu NADPH stattfindet. Diese Umwandlung von NADP kann photometrisch bei 340 nm verfolgt werden und unter Verwendung des Extinktionskoeffizienten ( $\epsilon = 6,3 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ ) die Menge an Glukose berechnet werden.

Die Messung (Tab. 6) wurde durch die Zugabe von Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase (0,35 U; *Roche*, Mannheim, Deutschland) gestartet, welche in der Probe eventuell vorhandenes Glukose-6-Phosphat zu 6-P-Glukonat umsetzt und den *blank* der Messung darstellt. Danach wurde Hexokinase (0,7 U; *Roche*, Mannheim, Deutschland) zugegeben, welche Glukose und Fruktose in Glukose-6-Phosphat, bzw. Fruktose-6-Phosphat umsetzt und somit das Substrat für die messbare Reaktion der Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase liefert. Die Extinktionsänderung im Messansatz entspricht dann der Glukose-Menge in der Probe. Durch die Zugabe der Phosphoglukose-Isomerase (17,5 U; *Roche*, Mannheim, Deutschland) wurde in der Probe vorhandenes Fruktose-6-Phosphat in Glukose-6-Phosphat umgewandelt und die folgende Extinktionsänderung entspricht dann der Fruktose-Menge.

**Tab. 6: Abfolge der enzymatischen Bestimmung von Glukose und Fruktose.**

Schritt:	Ansatz:	Bedeutung:
1	0,3 ml Probe; 0,5 ml Reaktionspuffer (100 mM Tricin, pH 8 mit NaOH, 10 mM MgCl <sub>2</sub> ; 20 µl 50 mM ATP; 20 µl; 25 mM NADP; auf 1 ml mit A. bidest.	
2	+ 5 µl Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase (0,35 U)	Messung des vorhandenen Glukose-6-Phosphats ( <i>blank</i> )
3	+ 5 µl Hexokinase (0,7 U)	Glukose-Menge
4	+ 5 µl Phosphoglukose-Isomerase (17,5 U)	Fruktose-Menge

Um die Saccharose-Konzentration der Probe zu bestimmen, muss zuvor eine Spaltung durch Invertase vorgenommen werden. Dazu wurden 0,3 ml Probe; 0,1 ml Reaktionspuffer (20 mM MES, pH 5,5 mit NaOH) und 10 µl Invertase (5 U; *Roche*, Mannheim, Deutschland) 30 min lang bei RT inkubiert. Danach erfolgte die Bestimmung der Glukose und Fruktose wie bereits beschrieben.

### 2.2.8 Cytokinin-Analyse

In Abb. 15 ist der Ablauf der Cytokinin-Analyse schematisch dargestellt. Die Extraktion der frischen Proben erfolgte mit Ethanol und Methanol. Nach Abdampfen der organischen Lösungsmittel erfolgte eine Säurefällung zur Entfernung von Verunreinigungen. Eine weitere Aufreinigung des Extraktes wurde durch eine *reversed phase*-Chromatographie an einer C<sub>18</sub>-Säule erreicht. Danach wurden mittels Anionenaustausch- und *reversed phase*-Chromatographie die Basen/Ribosid- und die Nukleotid-Fraktion der Cytokinine getrennt. Die einzelnen Cytokinine in diesen Fraktionen wurden dann durch HPLC aufgetrennt. Die Quantifizierung der Cytokinine erfolgte mittels ELISA. Dabei standen Antikörper gegen Zeatinribosid, Dihydrozeatinribosid und Isopentenyladenosin zur Verfügung. Auf Grund der Kreuzreaktivität dieser Antikörper mit den meisten Vertretern der jeweiligen Cytokinin-Familie konnten auch die Mengen einiger anderer Cytokinine bestimmt werden (Tab. 7). Die Basen/Ribosid-Fraktion enthielt stets auch die O-Glukoside, die sich durch HPLC nicht vollständig von den übrigen Cytokininen trennen ließen. Deshalb wurden in aliquoten Teilen der Basen/Ribosid-Fraktion vor dem ELISA die O-Glukosyl-Reste enzymatisch abgespalten und danach die Basen und Riboside bestimmt. Die Nukleotide wurden vor der HPLC-Fraktionierung enzymatisch in die Ribosidform überführt und in dieser Form im ELISA quantifiziert.

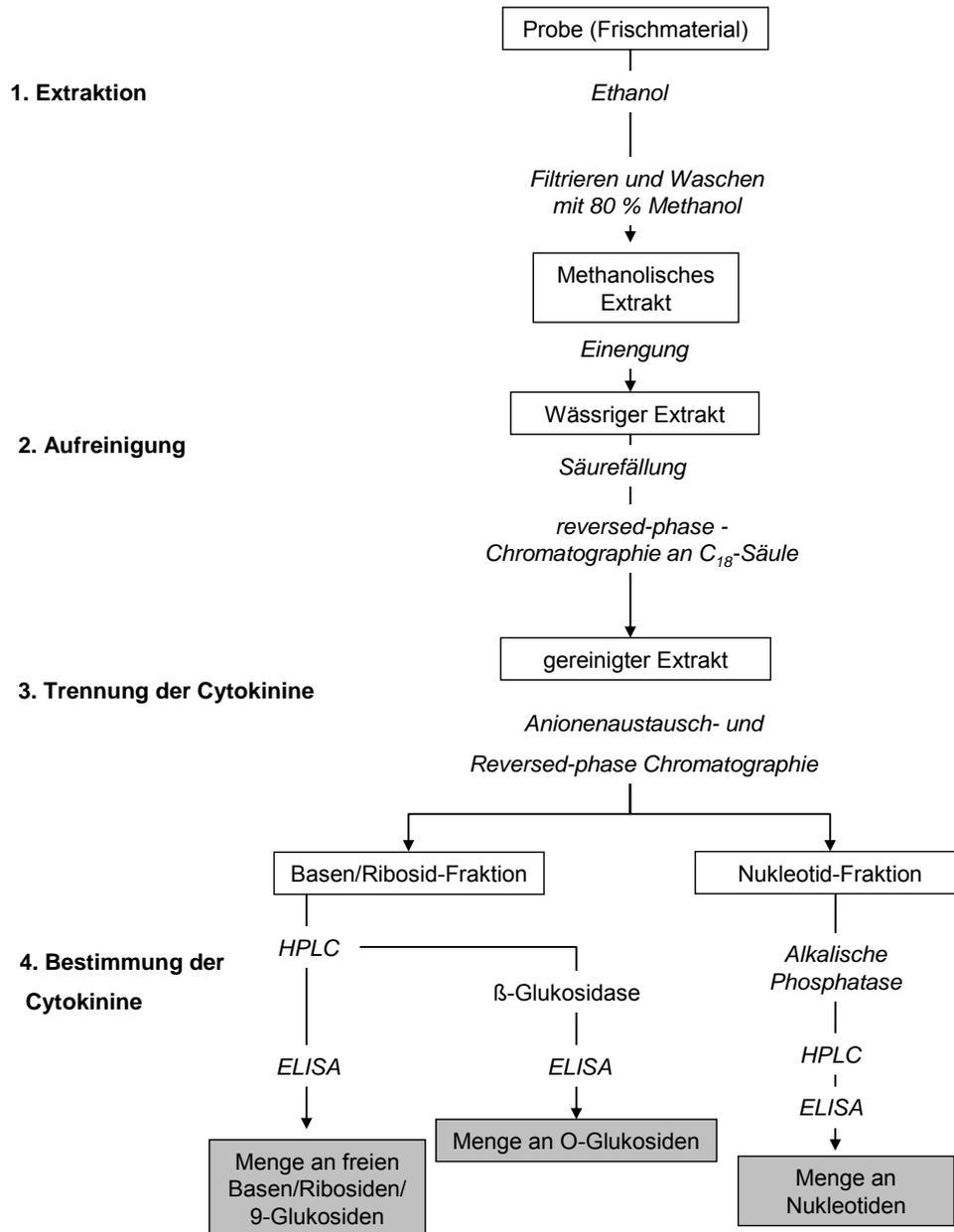


Abb. 15: Schematische Darstellung der Extraktion und Quantifizierung der Cytokinine.

**Tab. 7: Übersicht über die Cytokinine mitsamt Abkürzungen, deren Konzentrationen mittels ELISA in dieser Arbeit bestimmt wurden.**

<b>Cytokinin</b>	<b>Abkürzung</b>
<i>t</i> -Zeatin	Z
<i>t</i> -Zeatinribosid	ZR
<i>t</i> -Zeatinribosid-5'-monophosphat	ZRMP
<i>t</i> -Zeatin-9-Glukosid	Z9G
<i>t</i> -Zeatin-O-Glukosid	ZOG
<i>t</i> -Zeatinribosid-O-Glukosid	ZROG
Dihydrozeatin	DHZ
Dihydrozeatinribosid	DHZR
Dihydrozeatinribosid-5'-monophosphat	DHZRMP
Dihydrozeatin-9-Glukosid	DHZ9G
Dihydrozeatin-O-Glukosid	DHZOG
Dihydrozeatinribosid-O-Glukosid	DHZROG
Isopentenyladenin	IP
Isopentenyladenosin	IPA
Isopentenyladenosin-5'-monophosphat	IPAMP

### 2.2.8.1 Extraktionen der Cytokinine

Um die Cytokinin-Muster der Zellen zu analysieren, wurden jeweils ca. 20 g Frischgewicht an Zellen benötigt. Aus diesem Grund erfolgte die Anzucht der benötigten Zellen in 1 l-Erlenmeyerkolben mit 500 ml Medium, die mit 50 ml BY-2 Zellen inokuliert wurden. Die Zellen wurden über einer Glasfritte trocken gesaugt, mit 1:4 w/v absolutem Ethanol versetzt und ohne Schütteln bei 4 °C 20 h lang extrahiert. Danach wurde filtriert und mit der 5-fachen Menge 80 % wässrigem Methanol nachgewaschen. Das vereinigte Filtrat wurde im Rotationsverdampfer eingengt und bis zur Analyse bei –20 °C aufbewahrt.

### 2.2.8.2 Aufreinigung der Cytokinin-Extrakte

Die Proben wurden in wenig 100 % Methanol gelöst und der Kolben anschließend mehrfach mit A. bidest gespült. Die vereinigten Lösungen wurden dann wiederum auf etwa 10 ml eingengt und in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Der pH-Wert des wässrigen Extraktes wurde mit Essigsäure auf 3,5 eingestellt und die Proben über Nacht bei –20 °C gefroren. Am nächsten Tag wurden die Proben aufgetaut und dann 1 h lang bei 12000 rpm und 4 °C zentrifugiert (RC-5B; Sorvall). Der Überstand

wurde entnommen und das Präzipitat mit 2 ml A. bidest. gewaschen. Danach wurde der Überstand und die Waschflüssigkeit vereinigt, der pH-Wert auf 7 (NaOH) eingestellt und der Extrakt auf eine äquilibrierte Bakersäule (bakerbond spe<sup>TM</sup> colum; *J.T. Baker*, Deventer, Holland) aufgetragen. Die Äquilibration der Säulen erfolgte durch Einlegen der Säule in 100 % Methanol über Nacht und zweimaligem Waschen mit 5 ml 80 % wässrigem Methanol und dreimaligem Waschen mit 5 ml A. bidest. Nach dem Auftragen der Proben wurden die Säulen mit 10 ml A. bidest. gewaschen und die Cytokinine anschließend mit 10 ml 80 % Methanol eluiert. Das Eluat wurde dann am Rotationsverdampfer bei 37 °C bis zur Trockne eingengt.

### 2.2.8.3 Trennungen der Cytokinine

#### - Trennung der Basen/Ribosid- und Nukleotid-Fraktion

Die gereinigte Probe wurde mit 1 ml 80 % Methanol und 10 ml 40 mM Ammoniumacetat-Puffer (pH 6,5) gelöst und auf eine mit 20 ml 40 mM Ammoniumacetat-Puffer (pH 6,5) äquilibrierte „DEAE-Sephadex<sup>TM</sup> A-25 Säule“ (*Amersham Bioscience*, Uppsala, Schweden) mit angekoppelter „Sep Pak C18 Cartridge“ (*Waters Corporation*, Milford/Massachusetts, Irland) aufgetragen. Anschließend wurde die Säule mit 20 ml 40 mM Ammoniumacetat-Puffer (pH 6,5) und mit A. bidest. gewaschen. Dann wurde mit 5 ml 80 % wässrigem Methanol die Basen/Ribosid-Fraktion der Cytokinine eluiert und bei 37 °C eingengt. Eine zweite Sep Pak wurde mit 5 ml 100 % Methanol, 5 ml A. bidest. und 5 ml 6 % (v/v) Ameisensäure äquilibriert und an die DEAE-Säule gekoppelt. Mit 20 ml 6 % Ameisensäure wurde dann die Nukleotid-Fraktion der Cytokinine in die zweite Sep Pak C18 eluiert. Daraus wurde die Nukleotid-Fraktion wie die Basen/Ribosid-Fraktion mit Methanol eluiert und bis zur Trockne eingengt. Nach dem Lösen in 2 ml 50 mM Natriumhydrogencarbonat-Puffer (pH 9,6) wurden die Nukleotide über Nacht mit 10 µl alkalischer Phosphatase (10 U/10 µl, *Roche*, Mannheim, Deutschland) dephosphoryliert. Die Probe wurde anschließend erneut eingengt und mit 1 ml 80 % wässrigem Methanol und 10 ml 40 mM Ammoniumacetat-Puffer (pH 6,5) gelöst. Nach erneuter Reinigung an einer DEAE-Sephadex<sup>TM</sup> A-25 Säule mit angekoppelter Sep Pak C18 wurde die nun nur noch Basen/Riboside enthaltende Fraktion eluiert und zur Trockne eingengt.

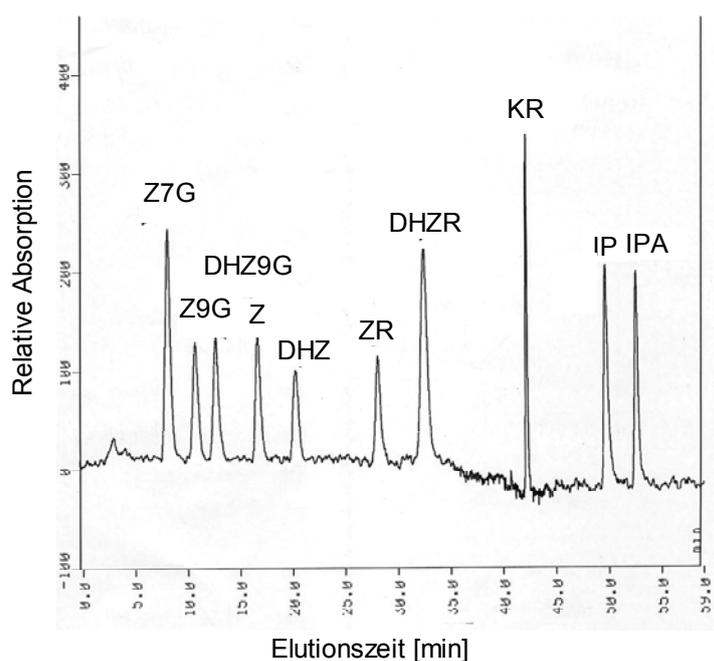
#### - Auftrennung der Cytokinine mittels HPLC

Die ehemalige Nukleotid und die Basen/Ribosid-Fraktion wurden in je 1 ml 8 % wässrigem Acetonitril gelöst und anschließend durch HPLC unter Verwendung einer C18-Säule (HyperClone 5 µm ODS (C18); *Phenomenex*, Aschaffenburg, Deutschland) durch den in Tab. 8 beschriebenen Gradienten aus 0,1 % wässriger Triethylammoniumacetat-Lösung (TEAA) und Acetonitril (HPLC grade, *Roth*, Karlsruhe, Deutschland) in 36 Fraktionen aufgetrennt. Das Auffangen der Fraktionen wurde 9 min nach der Injektion der Probe begonnen und endete nach 59,4 min. Dabei wurde pro Fraktion 1,4 min lang gesammelt.

**Tab. 8: HPLC-Laufbedingungen.**

		Zusammensetzung des Gradienten [%]	
Schritte	Zeit [min]	0,1 % TEAA-Lösung	Acetonitril
	0 - 10	8,5	91,5
	10,5 - 20	9	91
	21,5 - 29	9,7	90,3
	33,5 - 35	14,5	85,5
	36 - 55	19,7	80,3
	55 - 70	100	0
Laufgeschwindigkeit	1 ml/min		

Vor jeder Fraktionierung wurde ein Standardlauf zur Überprüfung der Trennqualität durchgeführt (Abb. 16).



**Abb. 16: Auftrennung eines Standard-Cytokiningemisches durch HPLC. Z7G – Zeatin-7-Glukosid; KR – Kinetinribosid. Die Bezeichnung der übrigen Cytokinine ist in Tab. 7 aufgeführt.**

### 2.2.8.4 Immunochemische Bestimmung der Cytokinin-Konzentrationen mittels ELISA

Die HPLC-Fractionen wurden im Luftstrom getrocknet und die Konzentrationen der einzelnen Cytokinine im ELISA mit Antikörpern gegen Zeatinribosid, Dihydrozeatinribosid und Isopentenyladenosin bestimmt. Die Methode ist bei Wagner (1991) im Detail beschrieben und im Folgenden werden nur die Spezifika dieser Arbeit näher erläutert.

Zunächst wurden die Mikrotiterplatten (Nunc-Immuno<sup>TM</sup>Platten-Maxisorp F96; *Nunc*, Wiesbaden, Deutschland) mit 200 µl 50 mM Natriumhydrogencarbonat-Puffer (pH 9,6) pro Vertiefung und je einem Antikörper (ZR 1:2500; DHZR 1:5000; IPA 1:1000) pro Platte befüllt und die Platten über Nacht im Kühlschrank inkubiert. Nachdem die Antikörperlösung entfernt wurde, wurden 200 µl Blockierlösung pro Vertiefung mit Hilfe einer Transferplatte überschleudert und die Mikrotiterplatte dann 1 h lang unter Schütteln inkubiert. Zum Waschen der Mikrotiterplatten wurde die TBS-Waschlösung verwendet. Dabei wurden die Platten stets dreimal mit Hilfe eines Immunwashers (Nunc-Immuno Wash 12, *Nunc GmbH & Co.KG*, Wiesbaden, Deutschland) gespült und danach gründlich trocken geklopft. Die Basen/Ribosid-Fractionen wurden mit jeweils 750 µl und die Nukleotid-Fractionen in jeweils 500 µl 50 mM Natriumacetat-Puffer (pH 5,8) gelöst. Je 100 µl der Fractionen, bzw. die Eichgerade und 100 µl der entsprechenden Tracer-Lösung (Antigen-Alkalische Phosphatase-Komplex) wurden in die Transferplatte pipettiert (Tab. 9).

**Tab. 9: Pipettierschema der Transfer-Mikrotiterplatten für den ELISA-Test.**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	Eichgerade [nM]											
	0,04	0,1	0,3	0,7	1,7	4,1	10	25,6	64	160	400	1000
<b>B</b>	Probe 2 (Fraktionen 1 – 36)						Probe 1 (Fraktionen 1 – 36)					
<b>C</b>												
<b>D</b>												
<b>E</b>												
<b>F</b>												
<b>G</b>												
<b>H</b>	Eichgerade [nM]											
	1000	400	160	64	25,6	10	4,1	1,7	0,7	0,3	0,1	0,04

Die Tracer-Lösungen wurden hergestellt, indem die Tracer mit TBS-Gelatine verdünnt wurden (ZR 1:1250; DHZR 1: 2000; IPA 1:1250). Die mit dem Tracer überschichteten Proben und die Eichgerade wurden dann nach Entfernung der Blockierlösung mit Hilfe der Transferplatte in die Mikrotiterplatte überschleudert. Die Platten wurden 1,5 h auf dem Schüttler bei RT inkubiert. Nach Entfernung der Proben/Tracer-Gemisches wurden dann 200 µl einer 4-Nitrophenylphosphat Dinatriumsalz

Hexahydrat (PNPP)-Lösung pro Vertiefung mit Hilfe der Transferplatte in die Mikrotiterplatte überschleudert. Diese Platten wurden 1 h lang im Dunkeln bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Extinktionen mittels ELISA-Readers (PowerWave X340; Packard BioScience GmbH, Deutschland) bei 405 nm bestimmt. Die Konzentrationen der Cytokinine wurden unter Berücksichtigung der beiden Eichgeraden vom Programm KVI (Packard BioScience GmbH, Deutschland) berechnet. Zum Nachweis der O-Glucoside wurden die verbleibenden 450 µl der Basen/Ribosid-Fractionen mit je 10 µl β-Glukosidase (0,2 U; Sigma, Taufkirchen, Deutschland) versetzt und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Cytokinine in diesen Fractionen ebenfalls im ELISA bestimmt und aus der Differenz zu den gemessenen Werten der Basen/Ribosid-Fraktion die Menge an O-Glucosiden berechnet.

Folgende Lösungen wurden verwendet:

TBS-Puffer:	0,22 M Tris, 2,21 M NaCl, 6,6 mM MgCl <sub>2</sub> , pH 7,8
TBS-Gelatine:	1 mg Gelatine auf 1 ml TBS-Puffer
TBS-Waschlösung:	1,2 l TBS-Puffer, 650 µl Tween 20 auf 8 l A. bidest.
Blockier-Lösung:	0,5 mg Rinderserumalbumin (BSA) auf 1ml TBS-Puffer
PNPP-Lösung:	1 mg 4-Nitrophenylphosphat Dinatriumsalz Hexahydrat (PNPP) auf 1 ml NaHCO <sub>3</sub> -Puffer (pH 9,6)

Da die im ELISA verwendeten polyklonalen Antikörper gegen ZR, DHZR und IPA nur diese Cytokinine zu 100 % binden, müssen für die übrigen zur korrekten Konzentrationsbestimmung die Kreuzreaktivitäten (Wagner & Beck; 1993, Schaz; 2003) mit dem entsprechenden Antikörper berücksichtigt werden (Tab. 10).

**Tab. 10: Kreuzreaktivitäten der Cytokinin-Antikörper mit verschiedenen Cytokininen.**

	Kreuzreaktivität [%]		
	ZR-Antikörper	DHZR-Antikörper	IPA-Antikörper
<b>ZR</b>	100	4	0
<b>Z</b>	77	4	0
<b>Z9G</b>	122	6	0
<b>DHZR</b>	8	100	0
<b>DHZ</b>	4	40	0
<b>DHZ9G</b>	4	102	0
<b>IPA</b>	0	5	100
<b>IP</b>	0	3	18

## 2.2.9 Messung der Aktivität der Cytokinin Oxidase/Dehydrogenase

Die verwendete Methode zur Messung der Cytokinin-Oxidase/Dehydrogenase (CKX)-Aktivität (Frebort et al.; 2002) beruht auf der Tatsache, dass die Produkte (Aldehyde) des Cytokininabbaus mit 4-Aminophenol unter sauren Bedingungen Schiff'sche Basen bilden, die photometrisch bei 352 nm quantifiziert werden können. Zur Abspaltung der Isopentenyl-Seitenkette benötigt die CKX einen Elektronenakzeptor. Im Test verwendet man hierfür den artifiziellen Elektronenakzeptor Dichloroindophenol (DCIP). Die Reaktion wird nach einer definierten Zeit mit Trichloressigsäure (TCA) gestoppt, wonach 4-Aminophenol zur Bildung der Schiff'schen Base zugesetzt wird.

### 2.2.9.1 Extraktionen der CKX

Für die Bestimmung der der CKX-Aktivität wurden pro Messung 5 - 10 g Frischgewicht an Zellen benötigt. Die Zellen wurden über eine Glasfritte trocken gesaugt und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Proben wurden bis zur Analyse bei -20 °C gelagert.

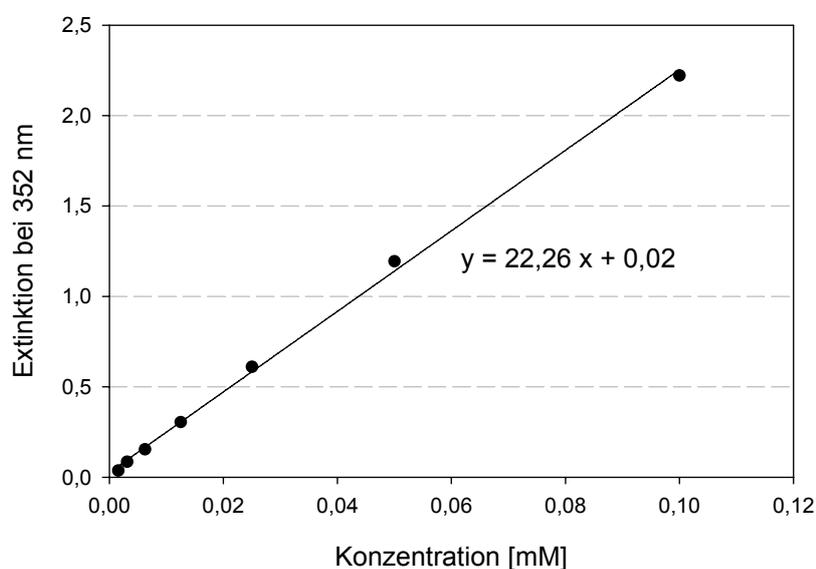
Die Extraktion der CKX erfolgte nach der Methode von Werner et al. (2003). Dazu wurden die gefrorenen Zellen in flüssigem Stickstoff gemörsert und in 5 ml 0,1 M Kaliumphosphat-Puffer, pH 7,2 aufgenommen. Der Ansatz wurde sorgfältig gemischt und dann durch Zentrifugation die löslichen von den unlöslichen Zellbestandteilen getrennt. Aus dem Überstand wurde die CKX mit anderen Proteinen mit Ammoniumsulfat (60 % Sättigung; 0,4 g/ml) gefällt und das Präzipitat in 1,5 ml Tris/HCl, pH 8 (bzw. zur Ermittlung des pH-Optimums pH 5,5; 6,5; 7,5) aufgenommen. Dieses Präparat wurde zur Messung der löslichen CKX-Aktivität verwendet. Die unlöslichen Zellbestandteile (Mikrosomen und Zellwände) wurden ohne weitere Reinigung in 1,5 ml Tris/HCl, pH 8 resuspendiert und zur Messung der gebundenen CKX verwendet.

### 2.2.9.2 Messungen der CKX-Aktivität

Die Bestimmung der CKX-Aktivität erfolgte im Stop-time-Assay nach Frebort et al. (2002). Dazu wurden 0,2 ml CKX-Extrakt, 0,4 ml A. bidest. , 0,05 ml 2 mM Isopentenylnadenin (IP) 0,05 ml 6 mM DCIP (*Sigma-Aldrich*, Schnelldorf, Deutschland) und 0,3 ml Tris/HCl pH 8 zusammen pipettiert. Zu jeder Probe wurde ein spezifischer Kontrollansatz ohne IP hergestellt.

Die Reaktionszeit bei 37 °C betrug wenigstens 3 h (bei 5 g FW). Gestoppt wurde die Reaktion durch die Zugabe von 0,3 ml 40 % TCA. Danach wurde 0,2 ml 2 % 4-Aminophenol (*Sigma-Aldrich*, Schnelldorf, Deutschland) in 6 % TCA zugesetzt und der Ansatz 5 min lang bei 12000 g zentrifugiert und anschließend die Extinktion in einer Quarzküvette gemessen. Die CKX-Aktivität ergab sich aus dem Absorptionsgipfel bei 352 nm. Unter Verwendung des Extinktionskoeffizienten des Reaktionsproduktes 3-Methyl-butenal (*Sigma-Aldrich*, Schnelldorf, Deutschland) mit 4-Aminophenol (Abb. 17;  $22,26 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ ) konnte die Menge des umgesetzten IP berechnet werden. Zur Erstellung

der Eichkurve wurden statt des CKX-Extraktes verschiedene Mengen 3-Methyl-butenal eingesetzt und mit dem Ansatz wie oben beschrieben verfahren (ohne Inkubationszeit).



**Abb. 17: Eichgerade mit 3-Metyl-2-butenal. Mit IP als Substrat ergab sich ein Extinktionskoeffizient von  $22,3 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ .**

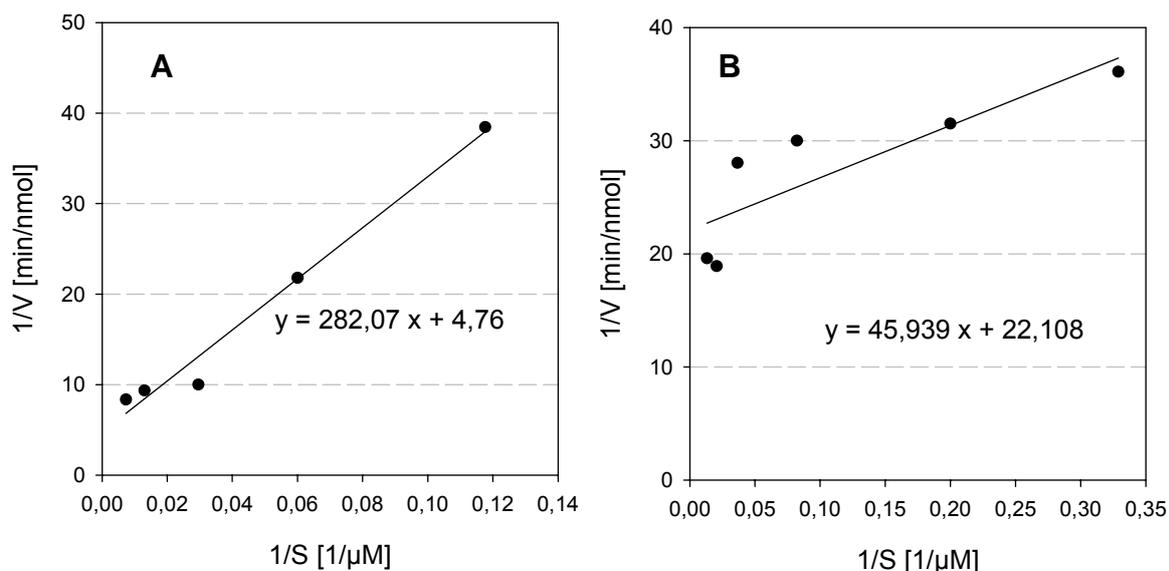
Zur Bestimmung der spezifischen CKX-Aktivität wurde parallel zu jeder Messung die Proteinkonzentration im CKX-Extrakt mit dem Bio-Rad-Assay (*Bio-Rad*, München, Deutschland) nach Bradford ermittelt. Dazu wurden je 80  $\mu\text{l}$  Probe und 20  $\mu\text{l}$  Bio-Rad Assay auf einer Mikrotiterplatte vermischt (Nunc-Immuno<sup>TM</sup>Platten-Maxisorp F96; *Nunc*, Wiesbaden, Deutschland), der Ansatz 10 min lang bei RT inkubiert und die Extinktion bei 595 nm im ELISA-Reader (PowerWave X340; *Packard BioScience GmbH*, Deutschland) gemessen. Die Eichgerade wurde mit BSA (*Sigma-Aldrich*, Schnelldorf, Deutschland) erstellt.

### 2.2.9.3 Substratspezifität der CKX

Weil die Bestimmung der CKX-Aktivität nur für IP als Substrat ausgearbeitet ist (Frebort et al.; 2002), musste zur Bestimmung der Abbaurate der übrigen Cytokinine eine andere Methode etabliert werden. Durch Kombination des CKX-Assay mit dem ELISA der Cytokinin-Analytik (2.2.8.4) konnte der Verlauf der Konzentration angebotener Cytokinine bei Inkubation mit CKX-Extrakt verfolgt werden. Auf diese Weise konnte die Abbaurate aller relevanten Cytokinine bestimmt werden. Für diesen Test wurden CKX-Extrakte der verschiedenen Zellzyklusphasen vereinigt. Es wurde wie folgt vorgegangen:

Ansatz: 0,2 ml CKX-Extrakt; 0,4 ml A. bidest.; 0,01 - 0,05 ml 2 mM (Z; ZR; IP; IPA; DHZ oder DHZR); 0,05 ml 6 mM DCIP, 0,3 ml Tris/HCl pH 8

Aus diesem Ansatz wurden dann in 10 minütigen Abständen je 10  $\mu\text{l}$  Probe entnommen, mit 990  $\mu\text{l}$  50 mM Natriumacetat-Puffer (pH 5,8) versetzt und die Rest-Konzentration des eingesetzten Cytokinins im ELISA bestimmt. Die so ermittelten Umsatz-Geschwindigkeiten wurden dann mit den eingesetzten Substratmengen in einem Lineweaver-Burk Plot aufgetragen (als Bsp. Z und IP als Substrate, Abb. 18). Aus den Schnittpunkten mit der Ordinate (entspricht  $V_{\max}^{-1}$ ) und der Abszisse (entspricht  $-K_m^{-1}$ ) konnten dann  $K_m$  und  $V_{\max}$  berechnet werden.



**Abb. 18: Lineweaver-Burk Plot für den Abbau (A) von Z und (B) von IP durch die lösliche CKX der BY-2 Zellen. Gleichungen für IPA:  $y = 826,64x + 5,38$  und DHZ:  $y = 291,36x + 4,052$  entsprechend.**

### 2.3 Transformationen der BY-2 Zellen

Das folgende Kapitel befasst sich mit der gezielten Veränderung der Genexpression ausgewählter Gene, durch Transformation der BY-2 Zellen mit Überexpressions- und RNAi-Konstrukten.

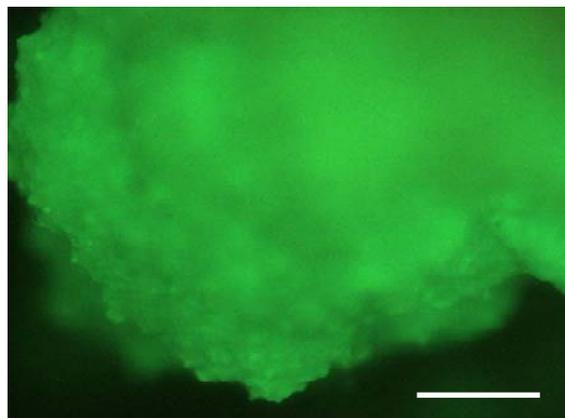
Durch Transformation der BY-2 Zellen wurde:

1. der Abbau von endogenen Cytokinin der BY-2 Zellen durch Transformation der CKX4 von *Arabidopsis thaliana* verstärkt
2. die Menge an Cyclin D2 und Cdk2a der BY-2 Zellen erhöht, bzw. zu reduziert, durch Transformation mit Überexpressions-Konstrukten des Cyclin D2, bzw. Cdk2a von *Chenopodium rubrum* und den entsprechenden RNAi-Konstrukten

### 2.3.1 Transformation der BY-2 Zellen mittels *Agrobacterium tumefaciens*

Der *Agrobacterium*-Stamm GV3101 mit dem Plasmid pBinHygTx-AtCHX4 wurde freundlicherweise von Thomas Schmülling (TU Berlin; Werner et al.; 2003) zur Verfügung gestellt. Ziel der Transformation war es, mit Hilfe der Überexpression der CKX den endogenen Cytokininspiegel zu senken, zumindest die Bedeutsamkeit der CKX für den Ablauf der Teilung zu demonstrieren. Um die Transformationseffizienz zu optimieren, wurden die BY-2 Zellen zunächst mit einem GFP-Überexpressions-Vektor (freundlicherweise von Sebastian Fettig, Universität Bayreuth zur Verfügung gestellt) transformiert, um die Effizienz der Transformation visuell verfolgen zu können. Die hier verwendete Methode führte dabei zu einer Transformationseffizienz von etwa 80 %. Dabei erwies sich die Temperatur während der Co-Kultivierung als wichtigster Faktor der Transformationseffizienz.

Zur Transformation wurden 10 ml einer 7 Tage alten Kultur in frisches Medium überimpft und nach 24 h zur Transformation verwendet. Dazu wurden 4 ml BY-2 Zellen mit 4 µl Acetosyringon-Lösung (20 mM in Ethanol, *Sigma*, Taufkirchen, Deutschland) versetzt und mit einer Glaspipette mehrmals aufgezogen. Anschließend wurden die BY-2 Zellen und 100 µl einer Übernacht-Kultur der Agrobakterien in einer Petrischale gemischt und diese mit Parafilm verschlossen. Die Co-Kultur erfolgte im Dunkeln, bei RT (20 °C) drei Tage lang. Die Zellen wurden dann drei Mal mit je 10 ml BY-2 Medium und 250 µg/ml Claforan (Tab. 3) gewaschen, zentrifugiert und in 3 ml BY-2 Medium aufgenommen. Jeweils 1 ml BY-2 Zellen wurden dann auf Selektionsmedium (Platten mit BY-2 Medium, 250 µg/ml Claforan und 50 µg/ml Hygromycin bzw. 200 µg/ml Kanamycin) ausplattiert und daraus transgene Kalli selektiert (Abb. 19).



**Abb. 19:** Transgener BY-2 Kallus, der durch Transformation mit einem Überexpressionsvektor mit dem Markergen GFP mittels *Agrobacterium tumefaciens* gewonnen wurde. Der Balken entspricht 0,1 cm.

Zur Herstellung von Übernacht-Kulturen von *Agrobacterium tumefaciens* wurden frische Kolonien in 20 ml YEP-Medium mit 50 µg/ml Rifampicin und 25 µg/ml Gentamycin (*GIBCO-BRL*, Eggenstein, Deutschland) überimpft und über Nacht bei 30 °C inkubiert.

YEP-Medium: 10 g Hefeextrakt; 10 g Pepton; 5 g NaCl; mit A. bidest auf 1 l, autoklavieren

YEP-Platten: YEP-Medium mit 0,8 % Agar

### 2.3.2 Transformation der BY-2 Zellen mittels *Partikel Bombardement*

Die Plasmide, die zum Gensilencing und zur Überexpression der Cdk2a und des Cyclins D2 verwendet wurden, wurden freundlicherweise von Oscar Valdes (Universität Bayreuth) zur Verfügung gestellt. Es handelt sich dabei um Gateway-Plasmide (pB7GWIWG2 und pB7WG2D mit cDNA-Sequenzen der Cdk2a, bzw. des D2-Cyclins von *Chenopodium rubrum*).

Die Plasmide (Konzentration: 1 µg/µl) wurden mit Hilfe der Partikel Gun (PDS-1000/He, *Russel-Kikkert*) in die Zellen eingebracht. Dazu wurde je 2 µl Plasmid mit 10 µl Goldpartikel (*BioRad*, Durchmesser: 1 µm) für 1 Minute gemischt. Nach kurzer Inkubation auf Eis wurden 4 µl 0,1 M Spermidin-Lösung und 10 µl 2,5 M CaCl<sub>2</sub>-Lösung zugesetzt und der Ansatz 3 min lang gemischt. Anschließend wurden die Goldpartikel zwei Mal mit 50 µl 70 % Ethanol gewaschen und dann in 30 µl 98 % Ethanol aufgenommen. Zur vollständigen Suspendierung der Partikel wurde der Ansatz kurz im Ultraschall-Bad inkubiert. Für den Beschuss wurden 12 µl der Lösung auf oberflächensterilisierte Makroprojekte (*BioRad*, 900 psi) aufgebracht. Der Abstand zwischen Zielgewebe (3 – 4 Tage alte BY-2 Kalli) und Abstoppgitter betrug 6,5 cm. Die beschossenen Zellen wurden nach 3 Tage auf Selektionsmedium (BY-2 Platten mit 150 µg/ml BASTA) überführt.

Zum Nachweis der Transformation wurden Primer verwendet, die spezifisch im 35S-Promotor der transformierten Plasmide binden und in einer PCR-Reaktion (siehe 2.4.3) ein 272 bp großes Produkt bilden.

## 2.4 Allgemeine Molekularbiologische Methoden

Die nachfolgend beschriebenen allgemeinen molekularbiologischen Methoden sind im Anschluss an bereits eingeführte Methoden verwendet worden. Zum einen musste der Nachweis erbracht werden, dass es sich bei den Fragmente, die durch RT-PCR (siehe 2.2.9) amplifiziert wurden, tatsächlich um die gewünschten Fragmente der entsprechenden Zellzyklus-Kontrollgene handelte. Dazu wurden die Fragmente aus dem Agarose-Gel extrahiert, in einen Vektor kloniert und in *E.coli* transformiert. Aus den Bakterien wurden dann die Plasmide isoliert, durch Restriktionsverdau mit geeigneten Enzymen das DNA-Fragment isoliert und sequenziert. Zum anderen mussten die erfolgreiche Transformation der BY-2 Zellen (siehe 2.3) durch Verwendung spezifischer Primer mittels PCR nachgewiesen werden.

### 2.4.1 Extraktion von DNA aus Agarose-Gelen

Zur Extraktion von DNA-Banden aus Agarose-Gelen wurde ein QIAquick Gel Extraction Kit (*QIAGEN*, Hilden, Deutschland) verwendet und nach Herstellerangaben vorgegangen.

### 2.4.2 Bestimmung der Reinheit und Konzentration von DNA

Die Konzentration und Reinheit von DNA in wässriger Lösung wurde durch Messung der Extinktion bei 260 nm und 280 nm bestimmt. Dabei entspricht eine Absorptionseinheit bei 260 nm bei 1 cm Schichtdicke 50 µg/ml DNA. Das Verhältnis der Absorptionen bei 260 nm zu 280 nm gibt Aufschluss auf die Reinheit der vorliegenden DNA-Lösung und sollte zwischen 1,7 und 2,0 liegen.

### 2.4.3 PCR

Zur Vermehrung von spezifischen DNA-Fragmenten wurden Puffer, Nukleotide und die Taq-DNA-Polymerase von *QIAGEN* (Taq PCR Core Kit, Hilden, Deutschland) in folgendem Ansatz verwendet:

Ansatz: 1 µl DNA; 5 µl 10 x Puffer; 1 µl dNTP's (je 10 mM); je 1 µl Primer (0,1 µM); 0,5 µl Taq-Polymerase; mit A. bidest. auf 50 µl

Die PCR wurde dann im Thermocycler PTC-100™ (*MJ Research, Inc.*) in folgenden Schritten durchgeführt (Tab. 11).

**Tab. 11: Generelles Schema der PCR-Schritte.**

	Temperatur [°C]	Dauer [min]	Anzahl der Zyklen
Start-Denaturierung	95	1	1
Denaturierung	95	0,5	40
Annealing	50 - 70*	0,5	
Extention	68	1 - 2**	
End-Extention	68	10	1

\* Die *Annealing*-Temperatur sollte 5 °C unter der Schmelztemperatur der Primer liegen.

\*\* Für PCR-Produkte, die länger als 1 kb sind verlängert sich die *Extention*-Zeit um 1 Minute/1kb.

### 2.4.4 Klonierung von PCR-Produkten

Zur Klonierung von PCR-Fragmenten wurden „AdvanTAge PCR Cloning“ (*Clontech*, Palo Alto, USA) sowie das „pGEM-T Easy Vector“ System (*Promega*, Madison, USA) verwendet und nach Anleitung der Hersteller vorgegangen.

### 2.4.5 Ligation

Für die Verknüpfung von DNA-Stücken oder das Klonieren von Fragmenten in Plasmide wurde Ligase (*Promega*, Madison, USA) verwendet. Besonders wichtig ist dabei das Mengenverhältnis zwischen Insert und Vektor. Die einzusetzende Menge an Insert wurde mit folgender Formel berechnet:

$$\frac{\text{ng Plasmid} \times \text{kb Insertgröße}}{\text{kb Plasmidgröße}} \times \frac{\text{mol Insert}}{\text{mol Plasmid}} = \text{ng Insert}$$

Der Ansatz bestand aus 1 – 8 µl Insert und Vektor, 1 µl 10 x Ligationspuffer, 0,5 µl T4-Ligase (2 U) und wurde mit A. bidest auf 10 µl Volumen gebracht. Die Inkubation erfolgte bei 4 °C über Nacht.

### 2.4.6 Transformation von Plasmiden in *E.coli*

Die Transformation von Plasmiden erfolgte in kompetente *E.coli* DH5α (Fountain; 2000). Dazu wurden pro Ansatz 200 µl Bakteriensuspension aufgetaut, mit 1 ng Plasmid-DNA in maximal 20 µl A. bidest. versetzt und 30 min lang auf Eis inkubiert. Dann folgte ein Hitzeschock von exakt 90 sec bei 42 °C. Anschließend wurden die Zellen 2 min lang bei RT inkubiert und danach mit 1 ml LB-Medium versetzt. Unter Schütteln wurden die Bakterien dann 1 h lang bei 37 °C inkubiert und dann auf LB-Platten mit Antibiotikum zur Selektion ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert, am nächsten Tag einzelne Kolonien gepickt und daraus Über-Nacht-Kulturen angelegt.

LB-Medium: 10 g Bacto-Trypton; 10 g NaCl; 5g Hefeextrakt; A. bidest. auf 100 ml, vor dem Autoklavieren den pH-Wert auf 7,3 eingestellt

LB-Platten: LB-Medium mit 1,6 % Agar

### 2.4.7 Übernacht-Kulturen und Dauer-Kulturen von *E.coli*

Zur Plasmidpräparation sowie zur Herstellung von Dauerkulturen wurden frische Kolonien von LB-Platten in Röhrchen mit 10 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum überführt. Die Röhrchen wurden dann über Nacht bei 37 °C auf einem Rotationsschüttler bei 250 rpm inkubiert. Antibiotika wurden steril filtriert und dem LB-Medium nach dem Autoklavieren und Abkühlen auf unter 55 °C zugegeben: Ampicillin (100 µg/ml); Kanamycin (50 µg/ml).

Um Bakterienstämme langfristig zu lagern wurden zu 425 µl einer Übernacht-Kultur 75 µl Glycerin gegeben und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Kulturen wurden bei –80 °C aufbewahrt.

### 2.4.8 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien

Zur Isolierung von Plasmiden aus *E.coli* oder *Agrobacterium tumefaciens* wurde „QIAprep Miniprep Kit“ (*QIAGEN*, Hilden, Deutschland) verwendet und nach Anleitung des Herstellers vorgegangen.

### 2.4.9 Restriktionsverdau

Um DNA an spezifischen Stellen spalten zu können wurden verschiedene Restriktionsenzyme und die entsprechenden Puffer (Tab. 12) benutzt. Zur DNA (~2µg) wurden 1 µl des Restriktionsenzym (entspricht 1-10 Units) und 2 µl des zugehörigen Puffers gegeben und mit A. bidest. auf 20 µl aufgefüllt. Entsprechend der Herstellerangabe wurden die Ansätze 1 - 3 h bei 37 °C verdaut.

**Tab. 12: Überblick über die verwendeten Restriktionsenzyme.**

Restriktionsenzym	Reaktionspuffer	Hersteller
<i>NotI</i>	0 <sup>+</sup>	MBI Fermentas
<i>BamHI</i>	<i>BamHI</i> <sup>+</sup>	MBI Fermentas
<i>XcmI</i>	NEBuffer 2	Biolabs
<i>NcoI</i>	Y <sup>+</sup> /Tango	MBI Fermentas
<i>SalI</i>	0 <sup>+</sup>	MBI Fermentas
<i>XhoI</i>	R <sup>+</sup>	MBI Fermentas
<i>EcoRI</i>	0 <sup>+</sup>	MBI Fermentas

### 2.4.10 Trennung von DNA mittels Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese wurde in Flachbettkammern durchgeführt. Die Gele wurden aus 1,6 % Agarose (*Invitrogen*, Karlsruhe, Deutschland) in 0,5 x TBE-Puffer hergestellt, indem die Agarose durch Erhitzen des Puffers vollständig gelöst wurde. Nach dem Abkühlen auf ca. 50 °C wurde Ethidiumbromid (Endkonzentration: 1 µg/ml) zugesetzt und das Gel in die vorbereitete Kammer mit einem entsprechenden Kamm gegossen. Als Laufpuffer diente 0,5 x TBE-Puffer. Die Proben wurden dann mit 1/10 Volumen an „Loading Dye“ (*MBI Fermentas*, St. Leon-Roth, Deutschland) versetzt und in die Taschen des Gels pipettiert. Als Standard wurden „GenRuler™ 100 bp DNA Ladder“ (*MBI Fermentas*, St. Leon-Roth, Deutschland) oder „Hyper Ladder I“ (*Bioline*, Luckenwalde, Deutschland) verwendet.

TBE-Puffer: 450 mM Tris; 450 mM Borsäure; 5 mM EDTA

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Charakterisierung der Tabak Zellkultur BY-2

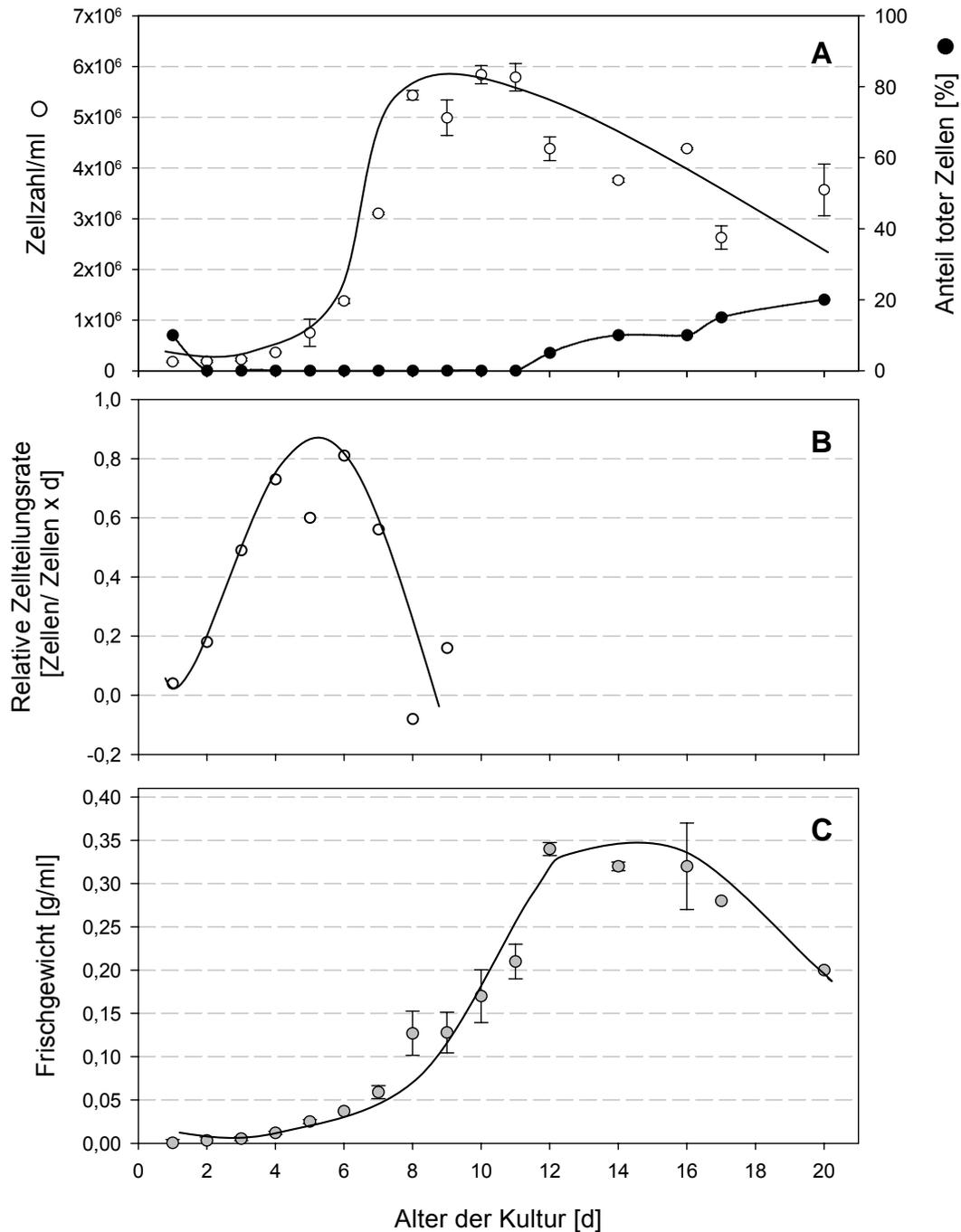
Um die Rolle der Phytohormone Cytokinin und Auxin, sowie der Kohlenhydrate bei der Regulation des Zellzyklus und die Wechselwirkung zwischen diesen Signalen am Modell der BY-2 Zellen untersuchen zu können, sollte als Grundlage zunächst das Wachstum der Zellkultur im Verlauf der Kultivierung untersucht werden. Eine weitere wichtige Grundlage stellt die Synchronisierung der Zellkultur und die damit mögliche Charakterisierung des Zellzyklus und der Expressionsmuster wichtiger Zellzyklus-Kontrollgene dieser Zellen dar.

#### 3.1.1 Wachstum der Zellkultur

Um das Wachstumsverhalten der Zellkultur zu charakterisieren, wurde die Entwicklung der Zellzahl, des Anteils toter Zellen und des Frischgewichtes im Verlauf der Kultivierung verfolgt. Routinemäßig wurden dazu 2 % (v/v) einer 7 Tage alten Kultur in frischem Medium kultiviert. Dabei zeigte sich, dass die Zellzahl zunächst langsam, ab dem 5. Kulturtag immer schneller zunimmt (Abb. 20 A). Die maximal erreichte Zelldichte beträgt  $6 \times 10^6$  Zellen pro ml Suspension. Damit nimmt die Zellzahl der BY-2 Kultur innerhalb einer Woche um das 70 – 80 –fache zu. Die relative Zellteilungsrate ergibt sich aus der lokalen linearen Regression unter Einbeziehung der totalen Zellzahl ( $N_{\text{total}}$ ) zu den Zeiten  $j-1$ ,  $j$  und  $j+1$  (Richard et al.; 2001):

$$\text{Relative Zellteilungsrate}_j = [d(\ln N_{\text{total}})/dt]_j$$

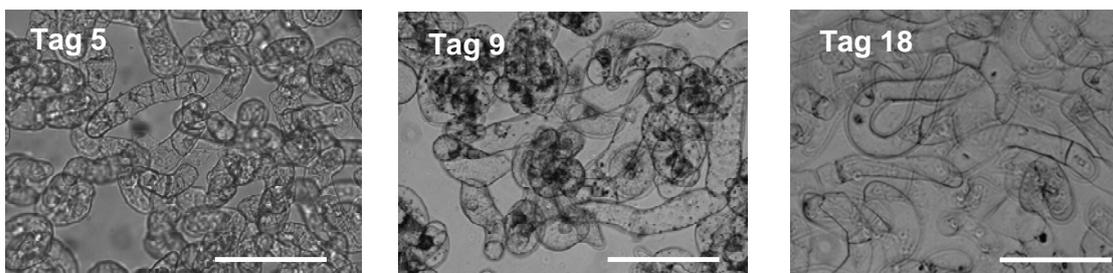
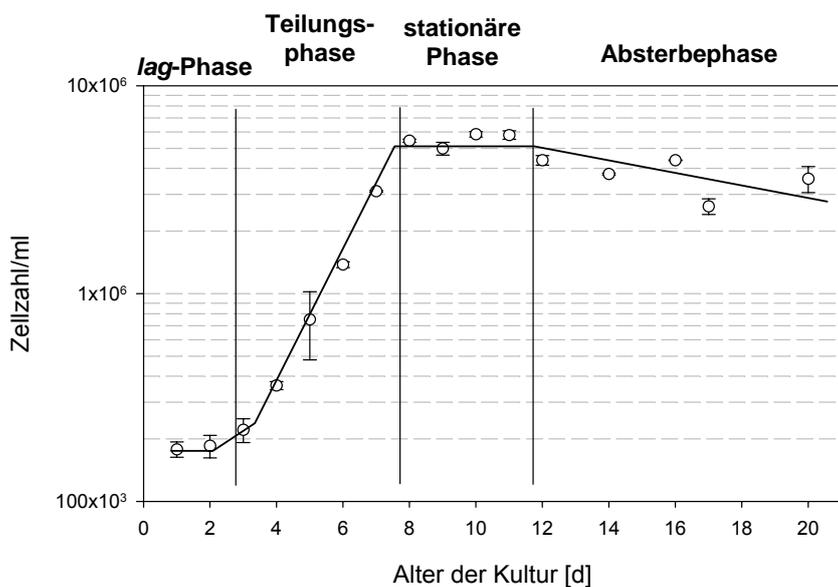
Die höchste relative Zellteilungsrate wird mit 0,7 bis 0,8 Zellen  $\times$  Zellen<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> zwischen dem 4. und 6. Kulturtag erreicht (Abb. 20 B). Zwischen dem 8. und 11. Kulturtag bleibt die Zellzahl dann konstant und nimmt danach allmählich ab. Gleichzeitig nimmt der Anteil toter Zellen zu (Abb. 20 A). Die Entwicklung des Frischgewichtes verläuft im Vergleich zur Entwicklung der Zellzahl zeitlich verzögert, so dass das maximale Frischgewicht mit 0,35 - 0,4 g/ml erst um den 12. Kulturtag erreicht wird und eine Abnahme des Frischgewichtes ab dem 17. Kulturtag festzustellen ist (Abb. 20 C). Das Frischgewicht nimmt innerhalb einer Woche um das 30 – 40 –fache zu.



**Abb. 20: Verlauf der Zellzahl (n=3) und des Anteils toter Zellen (A), der Relativen Zellteilungsrate (B) und des Frischgewichts (n=3) (C) während der Kultivierung der Tabak BY-2 Zellen.**

Die logarithmische Auftragung der Zellzahl (Abb. 21) zeigt, dass die Zellen nach der Subkultivierung in frischem Medium zunächst eine Anpassungsphase, die so genannte *lag*-Phase durchlaufen. Ab dem 3. Kulturtag gehen die Zellen in die Teilungsphase über. Der lineare Verlauf bei logarithmischer Auftragung zeigt, dass es sich um eine exponentielle Vermehrung der Zellen handelt. Zwischen dem 7. und 8. Kulturtag endet die Teilung abrupt, und die Zellzahl bleibt bis zum 11. Kulturtag konstant

(stationäre Phase). Danach beginnt die Phase des Absterbens, die durch eine langsame und gleichmäßige Abnahme der Zellzahl bei gleichzeitiger Zunahme des Anteils toter Zellen (Abb. 20 A) charakterisiert werden kann. Im Verlauf der Kultivierung verändert sich auch die Morphologie der Zellen (Abb. 21). Während der Teilungsphase sind die Zellen klein, kompakt und bilden zusammenhängende Ketten oder kleine Mikrokalli. Mit dem Übergang zur stationären Phase werden die Zellen größer, länger und variabler in der Form. Zudem ist die Bildung zahlreicher Stärkegranula, bzw. Amyloplasten zu beobachten. Sie verschwinden im Verlauf der Absterbephase wieder; die Zellen erscheinen immer strukturloser.



**Abb. 21: Entwicklungsphasen der BY-2 Zellkultur (n=3) im Verlauf der Kultivierung und Charakteristische mikroskopische Aufnahmen von Zellen in den einzelnen Entwicklungsphasen. Der Balken entspricht 100 µm.**

### 3.1.2 Ablauf des Zellzyklus der BY-2 Zellen

Prinzipiell teilen sich die Zellen in einer Zellkultur nicht synchron. Die Analyse des DNA-Gehaltes mittels Durchfluscytometrie der Zellen einer unsynchronisierten Zellkultur zeigt aus diesem Grund nur geringfügige Veränderungen der Anteile der Zellen in den verschiedenen Phasen nach der Subkultivierung (Abb. 22 A). Erkennbar ist der insgesamt dominierende Anteil von Zellen in der G1-Phase, der im Zeitraum von 9 h leicht zunimmt. Außerdem sind eine leichte Verringerung des Anteils an Zellen in der S-Phase und ein unveränderter Anteil von Zellen in der G2-Phase zu beobachten. Unter diesen Umständen könnten keine Aussagen über den Ablauf des Zellzyklus, die Länge einzelner Phasen oder über die Regulation des Zellzyklus durch bestimmte Signale getroffen werden.

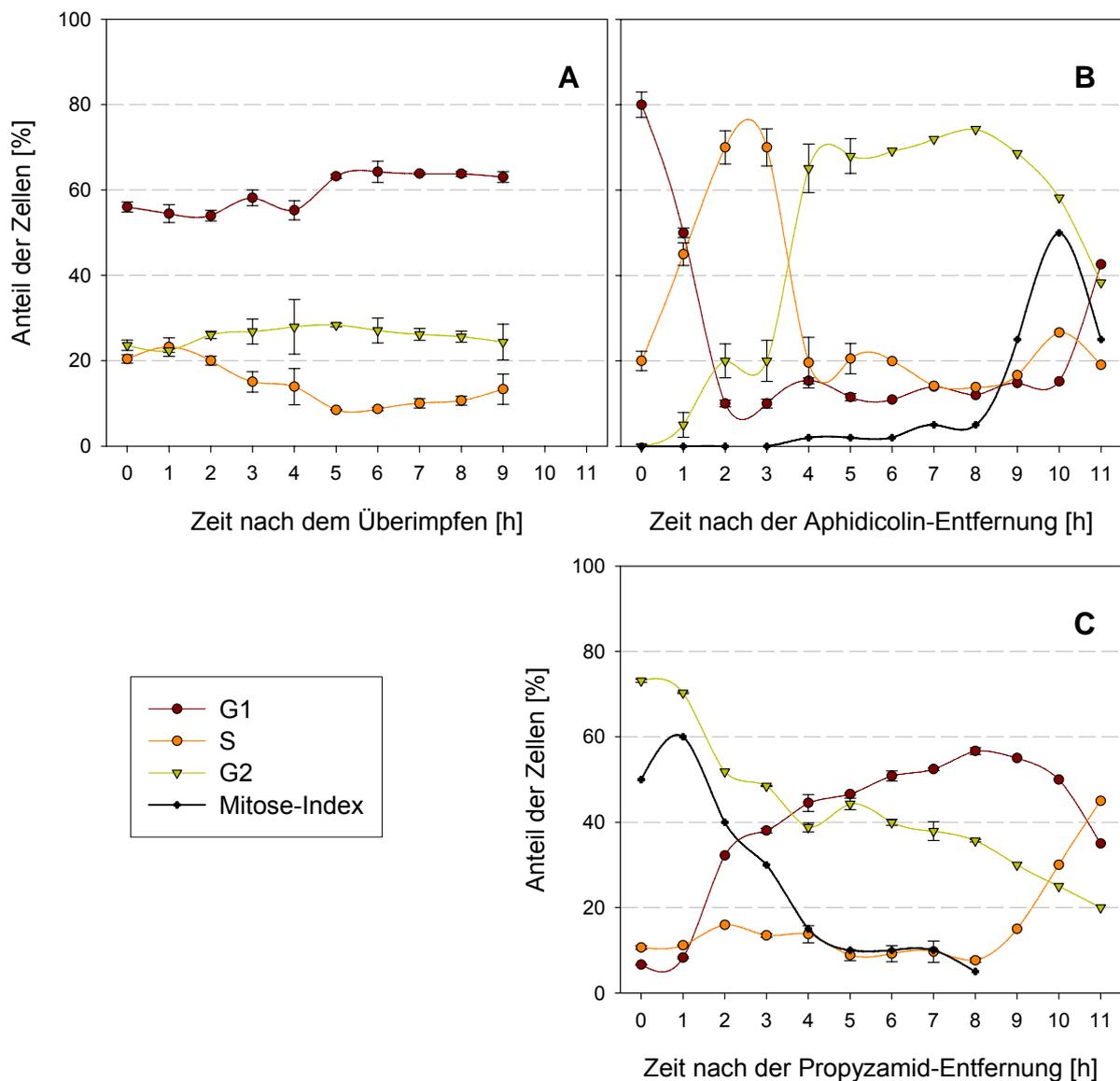


Abb. 22: Anteile der verschiedenen Zellzyklusphasen unsynchronisierter Zellen nach der Subkultivierung in frischem Medium (A) und nach Synchronisierung der Zellen mit Aphidicolin (B) und Propyzamid (C). Der Anteil der Zellen in den G1-, S- und G2-Phasen wurde durch Quantifizierung des DNA-Gehaltes von jeweils 5000 Zellkernen mittels Durchfluscytometrie

**bestimmt (n=3). Der Mitose-Index wurde mikroskopisch nach Färbung der Zellkerne mit DAPI ermittelt.**

Die BY-2 Zellkulturen eröffnen die Möglichkeit, den Zellzyklus durch die Verwendung von auswaschbaren Hemmstoffen zu synchronisieren. Mittels Aphidicolin kann durch die Inhibierung der  $\alpha$ -DNA Polymerase (Ikegami et al.; 1978) eine Hemmung am G1/S-Übergang verursacht und auf diese Weise eine Akkumulation der Zellen an dieser Stelle erreicht werden. Nach Entfernung dieses Inhibitors beginnt ein großer Teil der Zellen die Teilung gemeinsam am G1/S-Übergang. In Abb. 22 B erkennt man, dass sich nach der Aphidicolin-Entfernung 80 % der Zellen in der G1-Phase befinden. Nach 1 h sind bereits 50 % der Zellen in die S-Phase übergegangen, und im Zeitraum von 2 - 3 h befindet sich der Hauptanteil der Zellen in dieser Phase. Nach 3,5 h vollzieht sich der Übergang zur G2-Phase, in der sich in der Zeit von 4 – 8 h die Mehrheit der Zellen befindet. Nach 9 h steigt der Mitose-Index. Parallel dazu sinkt der Anteil an Zellen in der G2-Phase und der G1-Anteil der Zellen erhöht sich. Maximale mitotische Aktivität wird in 50 % der Zellen nach 10 h beobachtet. Infolgedessen können die einzelnen Zellzyklusphasen eindeutig voneinander getrennt werden und deren spezifische Regulationen untersucht werden. Eine weitere Möglichkeit, die Zellen zu synchronisieren, besteht in der Verwendung von Propyzamid. Dieser Hemmstoff verhindert die Depolymerisierung der Mikrotubuli und damit die Trennung der Chromosomen (Planchais et al.; 2000). In der Folge verbleiben die Zellen in der Metaphase. Nach Entfernung des Hemmstoffes befinden sich 50 - 60 % der Zellen in der Mitose (Abb. 22 C). Der Übergang in die G1-Phase findet zwischen 1 und 2 h nach der Entfernung des Hemmstoffes statt. Nach diesem Zeitpunkt verändern sich der Anteil der Zellen in der G2-Phase und der Anteil von Zellen in der G1-Phase nur noch geringfügig. Nach 9 h beginnt in einigen Zellen die S-Phase, wobei die Mehrheit der Zellen erst nach 11 h diese Phase erreicht.

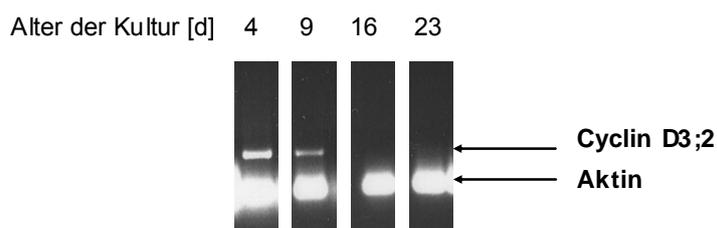
Zur Beurteilung der Synchronität können verschiedene Parameter herangezogen werden. Zum einen kann die Synchronität der BY-2 Zellen mit Hilfe des maximalen Mitose-Index beurteilt werden (Nagata et al.; 1992). Demnach würde die Synchronität der Zellen in dieser Untersuchung nach Aphidicolin-Behandlung 50 % und nach Propyzamid-Behandlung 50 – 60 % betragen. Die Analyse des Zellzyklus mittels Durchfluscytometrie ermöglicht ein detaillierteres Bild vom Anteil synchroner Zellen im Versuchsverlauf. Die maximal erreichten Anteile der Zellen in den verschiedenen Zellzyklusphasen zeigen, dass sich unmittelbar nach der Entfernung von Aphidicolin 80 % der Zellen in der G1-Phase befinden und demnach synchron sind. Während der S-Phase beträgt die Synchronität noch 75 % und in der G2-Phase 70 %. Bei Verwendung von Propyzamid befinden sich unmittelbar nach Entfernung des Hemmstoffes 75 % in der G2/M-Phase. Innerhalb der G1-Phase verhalten sich noch 55 % der Zellen synchron. Eine weitere Möglichkeit die Synchronität zu beurteilen, eröffnet die Betrachtung des Übergangsbereiches zwischen zwei Zellzyklusphasen. Je schneller dieser Übergang erfolgt, desto höher ist der Anteil synchroner Zellen an diesem Punkt. Um die Länge einzelner

Teilungsphasen zu bestimmen, wurde der Beginn einer Phase folgendermaßen definiert: Vom Schnittpunkt der Kurven zwischen vorhergehender und aktueller Phase bis zum Schnittpunkt der aktuellen und nachfolgenden Phase. Gemittelt über alle Experimente ergibt sich für die S-Phase eine Länge von  $3 \pm 0,5$  h ( $n=17$ ), für die G2-Phase  $7,6 \pm 0,7$  h ( $n=17$ ), für die Mitose 2 h und für die G1-Phase  $8 \pm 2$  h ( $n=3$ ). Die auf diese Weise ermittelte Länge des gesamten Zellzyklus beträgt demnach etwa 20 h.

### 3.1.3 Expressionsmuster der Zellzyklus-Kontrollgene

Obwohl die Untersuchung des pflanzlichen Zellzyklus sich noch in der Anfangsphase befindet, gibt es inzwischen eine ganze Reihe von Genen, die auf Grund von Homologien mit tierischen Zellzyklus-Kontrollgenen oder solchen von Hefe in Pflanzen gefunden wurden (Dewitte & Murray; 2003). Nur von wenigen Vertretern sind allerdings die genauen Funktionen innerhalb des Zellzyklus bekannt. Da angenommen werden musste, dass Phytohormone und Zucker als mitogene Signale die Expression mehrerer Zellzyklus-Kontrollgene steuern, wurden die Expressionsmuster aller zu Beginn der Arbeit bekannten Zellzyklus-Gene der Tabak BY-2 Zellen bestimmt. Es handelte sich um drei verschiedene D-Cycline, ein A- und ein B-Cyclin und zwei verschiedene Cdks. Basierend auf Kenntnissen der Expressions- und Aktivitätsmuster von bereits untersuchten Cdks war davon auszugehen, dass die Cdk2a eine übergeordnete Funktion im gesamten Zellzyklus hat, während die CdkB1-1 zusätzlich für den G2/M-Übergang benötigt wird. Die Quantifizierung der Expression erfolgte mittels semiquantitativer RT-PCR. Dazu wurden für die Tabak-Gene spezifische Primer konstruiert. In Vorversuchen wurde die optimale mRNA-Menge ermittelt, um zu gewährleisten, dass die PCR-Reaktion im linearen und nicht im sättigenden Bereich stattfindet (siehe Material und Methoden). Im Übrigen wurden die amplifizierte Fragmente sequenziert, um die Spezifität der RT-PCR nachzuweisen (siehe Material und Methoden).

Zunächst wurde die mRNA verschieden alter Zellen isoliert, um die Expressionsstärke des Cyclins D3;2 im Verlauf der Kultivierung zu untersuchen. Von diesem Cyclin ist bereits bekannt, dass es nur während der Teilungsphase exprimiert wird (Sorrell et al.; 1999). In Abb. 23 wird deutlich, dass die Expression dieses Cyclins am 4. Kulturtag besonders stark ist; am 9. Kulturtag nur noch schwach und in älteren Zellen überhaupt nicht mehr nachweisbar ist.



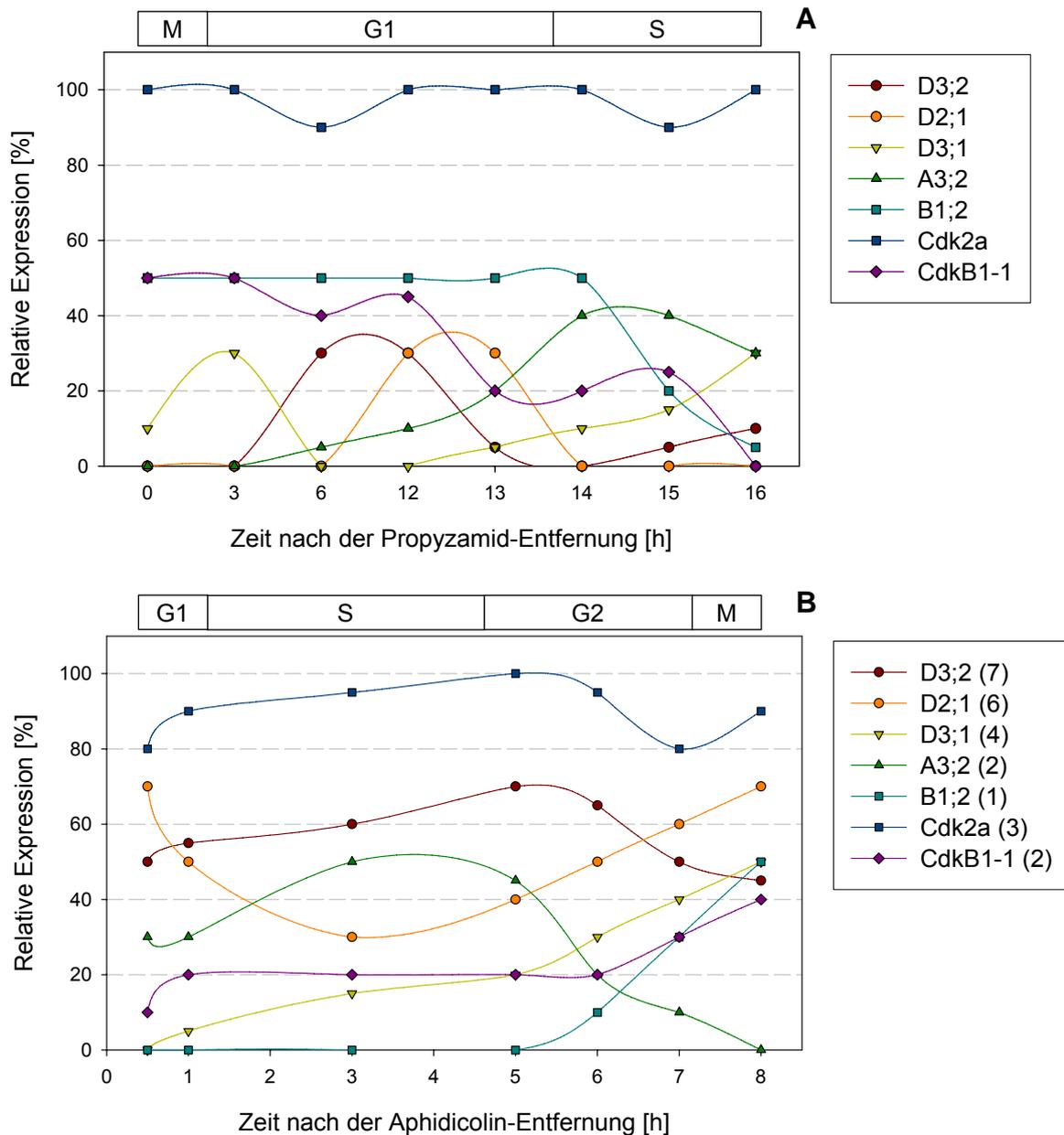
**Abb. 23: Expression des Cyclin D3;2 in unterschiedlich alten Zellen. Als interne Kontrolle wurde zusätzlich die Transkriptmenge von Aktin analysiert, dessen Expression im Verlauf der**

**Kultivierung unverändert blieb. Die Expressionsanalyse wurde mittels semiquantitativer RT-PCR durchgeführt.**

Anschließend wurden die BY-2 Zellen mit Aphidicolin und Propyzamid synchronisiert, phasenspezifische Proben genommen und mittels RT-PCR die Expressionsmuster der Zellzyklus-Kontrollgene analysiert.

In mit Propyzamid synchronisierten Zellen lassen sich die Expressionsmuster der Cycline und Cdks von der Mitose bis zur S-Phase verfolgen (Abb. 24 A). Es zeigt sich, dass die Expression der Cdk2a in diesem Teil des Zellzyklus konstant bleibt, während die Expression der CdkB1-1 allmählich abnimmt. Die Expression des Cyclin B1;2 verringert sich erst mit dem Beginn der S-Phase. Mit dem Ende der Mitose und dem Beginn der G1-Phase nimmt die Expression des Cyclin D3;1, gefolgt vom Cyclin D3;2 und zeitlich noch etwas verzögerter das Cyclin D2;1 transient zu. Mit dem Übergang zur S-Phase beginnt die Expression des Cyclin A3;2 anzusteigen. In mit Aphidicolin synchronisierten Zellen lassen sich die Expressionsmuster der Gene vom G1/S-Übergang bis zur Mitose erfassen (Abb. 24 B). Die Expression der Cdk2a erfolgt, mit Ausnahme einer geringfügigen Erhöhung am S/G2-Übergang, auch in diesem Teil des Zellzyklus konstant. Die Expression der CdkB1-1 ist zunächst gering und nimmt am Übergang zur Mitose zu. Im zeitlichen Zusammenhang mit der S-Phase steht die Expression des Cyclins A3;2. Die Expressionsmuster der drei D-Cycline variieren. Die Expression des Cyclin D2;1 nimmt mit dem G1/S-Übergang ab und steigt mit dem Beginn der G2-Phase wieder an. Das Cyclin D3;2 wird, mit Ausnahme einer transienten Zunahme in der G2-Phase, gleichmäßig exprimiert. Die Expression des Cyclin D3;1 nimmt vergleichbar mit der des Cyclin B1;2 mit dem Beginn der Mitose zu.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die D-Cycline mehr als ein Expressionsmaximum besitzen, das untersuchte Cyclin A3;2 während der S-Phase exprimiert und das Cyclin B1;2 während der Mitose exprimiert wird. Die Cdk2a zeigt keine Veränderung der Expression im Zellzyklusverlauf, während die CdkB1-1 verstärkt in der Mitose exprimiert wird.



**Abb. 24: Relative Expression (bezogen auf die stärkste Bande innerhalb des Versuches) der untersuchten Cycline und Cdks im Verlauf des Zellzyklus in mit Propyzamid (A) und mit Aphidicolin synchronisierten BY-2 Zellen (B). Die Expression wurde mittels semiquantitativer RT-PCR ermittelt. Die Quantifizierung der Banden erfolgte mit Image Master 1D Gel Analysis. In Klammern ist die Anzahl identischer Parallelversuche angegeben, die durchgeführt wurden.**

Um mehr über die Funktion einzelner Zellzyklus-Kontrollgene zu erfahren, wurde versucht, durch die Transformation der BY-2 Zellen mit entsprechenden Überexpressions- und „gen-silencing“ (RNAi)-Konstrukten die Expression grundlegend zu verändern. Exemplarisch wurden das Cyclin D2;1 und die Cdk2a ausgewählt. Da die Untersuchungen der transgenen Linien noch nicht abgeschlossen und die Ergebnisse noch nicht ausreichend abgesichert sind, werden die ersten Resultate im Anhang gezeigt. Überraschenderweise wuchsen mit Ausnahme der D2-RNAi Zellen die transformierten Linien

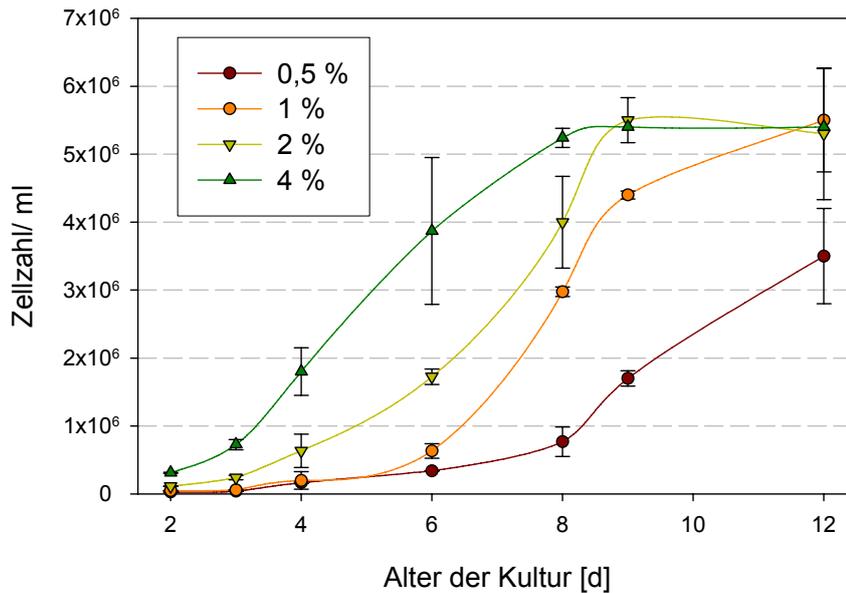
schlechter als die Kontrollzellen (Abb. 65). Darüber hinaus erhöhte sich der DNA-Gehalt der Zellen der transgenen Linien, besonders stark die der Cdk-RNAi- und die D2-Überexpressionslinien – die Zellen wurden tetraploid.

## 3.2 Interne und externe Signale und deren Einfluss auf den Zellzyklus

Der pflanzliche Zellzyklus wird durch eine Vielzahl externer und interner Faktoren reguliert, die man als Signal verstehen kann. Die wichtigsten derartigen Signale sind dabei Phytohormone, insbesondere Cytokinine und Auxine, wohl aber auch die Ressourcen selbst, wie beispielsweise Zucker. Auf Grund der eingeschränkten Kenntnisse über die Signaltransduktion zum Zellzyklus wurde zunächst angestrebt, möglichst viele Erkenntnisse darüber zu sammeln, ob es eine Priorität unter den Signalen gibt. Weiterhin wurde erforscht, welche Beziehung zwischen internen und externen Signalen besteht, wo und wie die Signale wahrgenommen werden und auf welche Weise die Zelle das Signal quantifiziert. Zu Beginn wurde untersucht, welcher Faktor im Verlauf der Kultivierung die Zellteilung limitiert und in der Folge den Übergang zur stationären Phase bewirkt. Danach wurde die Wirkung des Zucker-, Cytokinin- und Auxinsignals auf die Expression von Zellzyklus-Kontrollgenen im Einzelnen nachvollzogen.

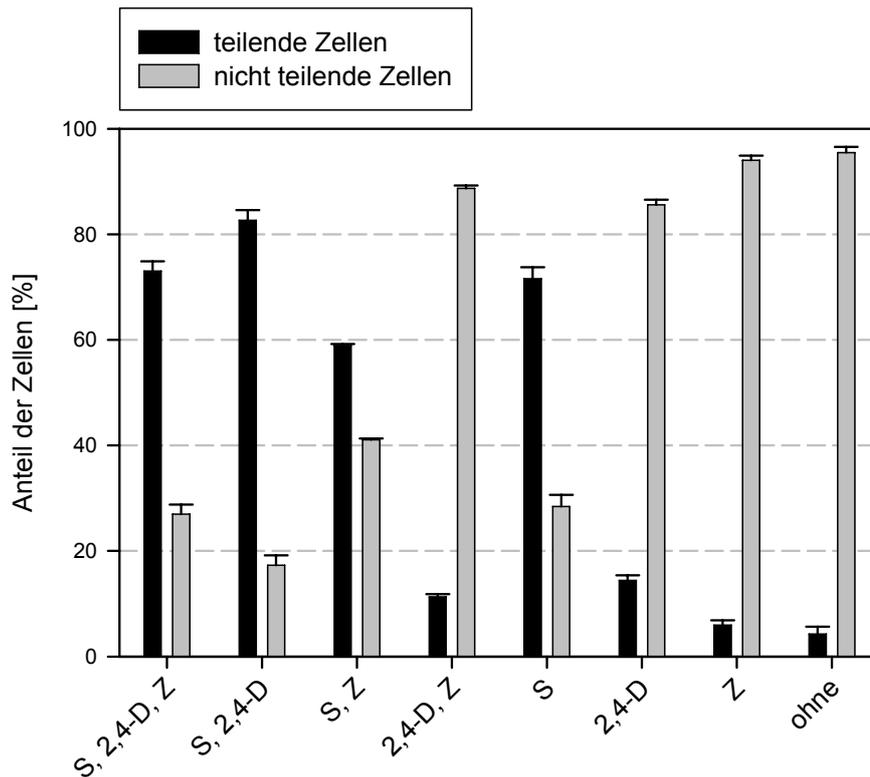
### 3.2.1 Welche Faktoren bewirken das Ende der Teilungsaktivität im Verlauf der Kultivierung?

Im Verlauf der Kultivierung endet um den 8. Kulturtag herum die Teilungsaktivität der Zellen. Sollte einer der in dieser Arbeit untersuchten Faktoren Zucker, 2,4-D oder Cytokinin, ursächlich daran beteiligt sein, könnte man diese allmähliche Limitierung des Faktors für die Untersuchung des Zellzyklus und der Expression von Zellzyklus-Kontrollgenen nutzen. Aus diesem Grund wurde 8 Tage alten Zellen (Beginn der stationären Phase) Zucker, 2,4-D, *t*-Zeatin sowie eine Kombination dieser Faktoren zugegeben. Dabei stellte sich heraus, dass es auf diese Weise nicht möglich war, die Zellteilung zu reaktivieren. Dieses Ergebnis führte zur Annahme, dass der entscheidende limitierende Faktor der fehlende Kontakt der Zellen zum Medium, bzw. Platzmangel sein könnte. Daraufhin wurde die Entwicklung der Zellzahl bei variierendem Animpfvolumen untersucht (Abb. 25). Es stellte sich heraus, dass sich die Länge der *lag*-Phase in Abhängigkeit vom Inokulum veränderte. Je geringer das Volumen des Inokulums war, desto länger war die *lag*-Phase. Erkennbar wird darüber hinaus, dass sich der Zeitpunkt des Eintretens in die stationäre Phase mit zunehmendem Inokulum nach vorne verschiebt. Mit Ausnahme des Animpfvolumens von 0,5 % endet die Teilungsfähigkeit der Zellen bei einer Dichte von  $5 - 6 \times 10^6$  Zellen/ml.



**Abb. 25: Einfluss des Animpfvolumens auf die Entwicklung der Zellzahl im Verlauf der Kultivierung (n=3).**

Im Folgenden wurde untersucht, inwiefern Zucker, 2,4-D, Cytokinin oder eine Kombination dieser Faktoren, die Zellteilungsaktivität von Zellen der stationären Phase nach der Subkultivierung in frischem Medium stimuliert. Dazu wurden Zellen einer 8 Tage alten Kultur in Medien mit verschiedenen Kombinationen an Zucker, 2,4-D und *t*-Zeatin (Z) überimpft. Der Anteil sich teilender Zellen kann durch die Zugabe von Propyzamid ermittelt werden, denn die sich teilenden Zellen reichern sich in der G2-Phase an, während sich der Anteil an Zellen in der G1-Phase verringert. Der verbleibende Anteil an Zellen in der G1-Phase entspricht dann dem Anteil sich nicht teilender Zellen im untersuchten Zeitraum. Die Analyse zeigte, dass durch die Subkultivierung alleine nur etwa 5 % der Zellen sich innerhalb der untersuchten 21,5 h zu teilen begannen (Abb. 26). Der Zusatz von Saccharose regte immerhin 70 % der Zellen zur Teilung an, während 2,4 D etwa 15 % der Zellen stimulierte. Z im Medium bewirkte im Vergleich zur Subkultivierung ohne Zusätze keine Veränderung des Anteils sich teilender Zellen, der Anteil betrug lediglich 5 %. Die Kombination von Saccharose und 2,4-D erhöht den Anteil sich teilender Zellen auf 85 %. Im Unterschied dazu, verringert die Kombination von Saccharose mit Z den Anteil sich teilender Zellen auf 60 %. Auch die Kombination von 2,4-D mit Z verursacht eine verminderte Teilungsaktivität auf etwa 10 %. Bei der Kombination von Saccharose, 2,4-D und Z ergibt sich ein Anteil sich teilender Zellen von 70 %.



**Abb. 26:** Anteil sich teilender Zellen einer 8 Tage alten Zellkultur, die in Medien mit und ohne 8  $\mu\text{M}$  2,4-D, 87 mM Saccharose (S) und 6  $\mu\text{M}$  *t*-Zeratin (Z) subkultiviert wurden. Der Anteil teilungsbereiter Zellen wurde über die Zunahme des Anteils an Zellen in der G2-Phase und der Anteil der sich nicht teilenden Zellen über den Anteil an Zellen in der G1-Phase nach 21,5 h Propyzamid-Behandlung ermittelt. Die Phasenanteile wurden durch Quantifizierung von je 5000 Zellkernen mittels Durchflusszytometrie bestimmt (n=3). Beide Anteile wurden auf die Lebendzellzahl bezogen.

Die Teilungsaktivität der BY-2 Zellen wird folglich im Verlauf der Kultivierung bedingt durch den Mangel an „Platz“, aber auch durch den Mangel an Zucker und 2,4-D begrenzt. Weil es sich um einen Mischeffekt handelt, mußten andere Möglichkeiten zur Variierung der Zucker-, Cytokinin- und Auxin-Verhältnisse in der Kultur gefunden werden. Infolgedessen wurden die Zucker-, Cytokinin- und Auxin-Verhältnisse im Verlauf der Kultivierung untersucht, um durch gezielte Veränderung des Angebotes im Medium, bzw. durch die Verwendung von Hemmstoffen der endogenen Biosynthese die Signalstärke zu beeinflussen. Die daraus resultierenden Effekte auf die Zellteilung wurden sodann untersucht.

### 3.2.2 Zucker als Wachstumsressource und Signal für meristematische Aktivität

Um die Bedeutsamkeit von Zucker als Ressource und Zellteilungs-Signal untersuchen zu können, wurden zunächst die Zuckerkonzentrationen im Medium und in den Zellen im Verlauf der

Kultivierung bestimmt. Anschließend wurde das Zuckerangebot variiert, um die Effekte auf den Ablauf des Zellzyklus und die Expression von Zellzyklus-Kontrollgene zu analysieren.

### 3.2.2.1 Verlauf der externer und interner Zuckerkonzentrationen im Verlauf der Kultivierung

Das Standard-Medium der Tabak BY-2 Zellen enthält Saccharose als Zuckerquelle. Betrachtet man die Zuckerkonzentrationen im Medium im Verlauf der Kultivierung, so zeigt sich, dass die Saccharose-Konzentration innerhalb der ersten drei Tage schnell abnimmt und gleichzeitig die Konzentrationen an Glukose und Fruktose ansteigen (Abb. 27 A). Dabei liegen bis zum Tag 6 Glukose und Fruktose in annähernd gleichen Konzentrationen vor, ab Tag 7 überwiegt Fruktose. Glukose wird folglich im Vergleich zur Fruktose bevorzugt aufgenommen.

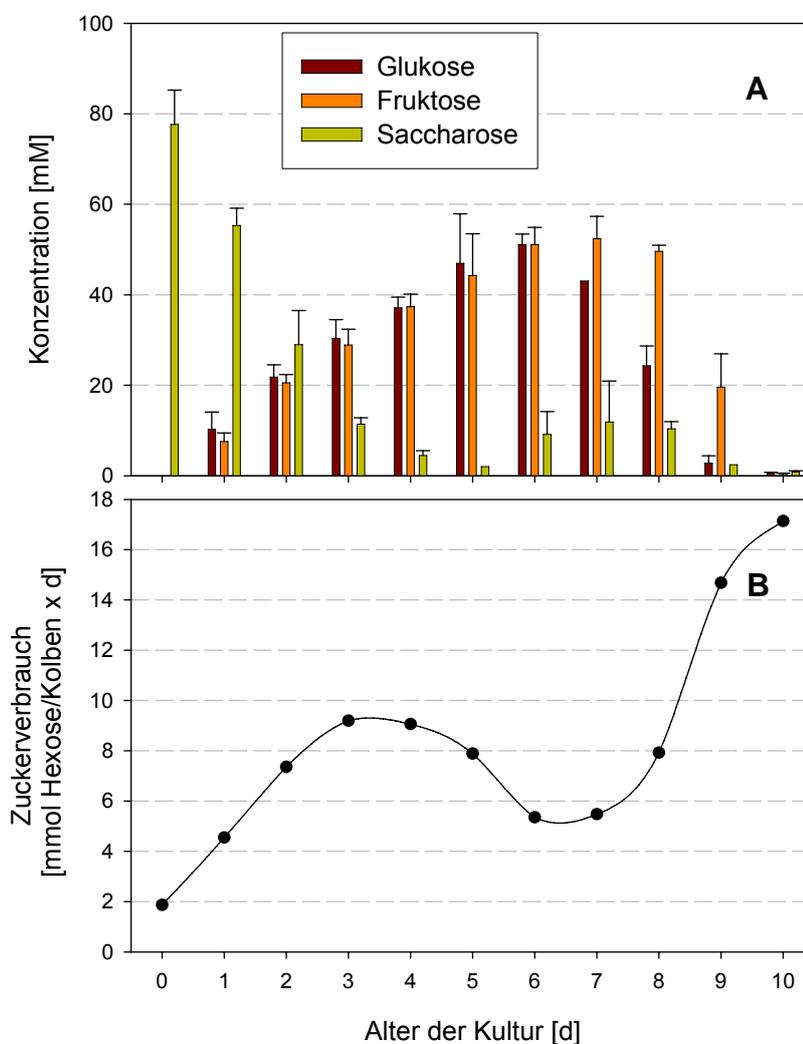
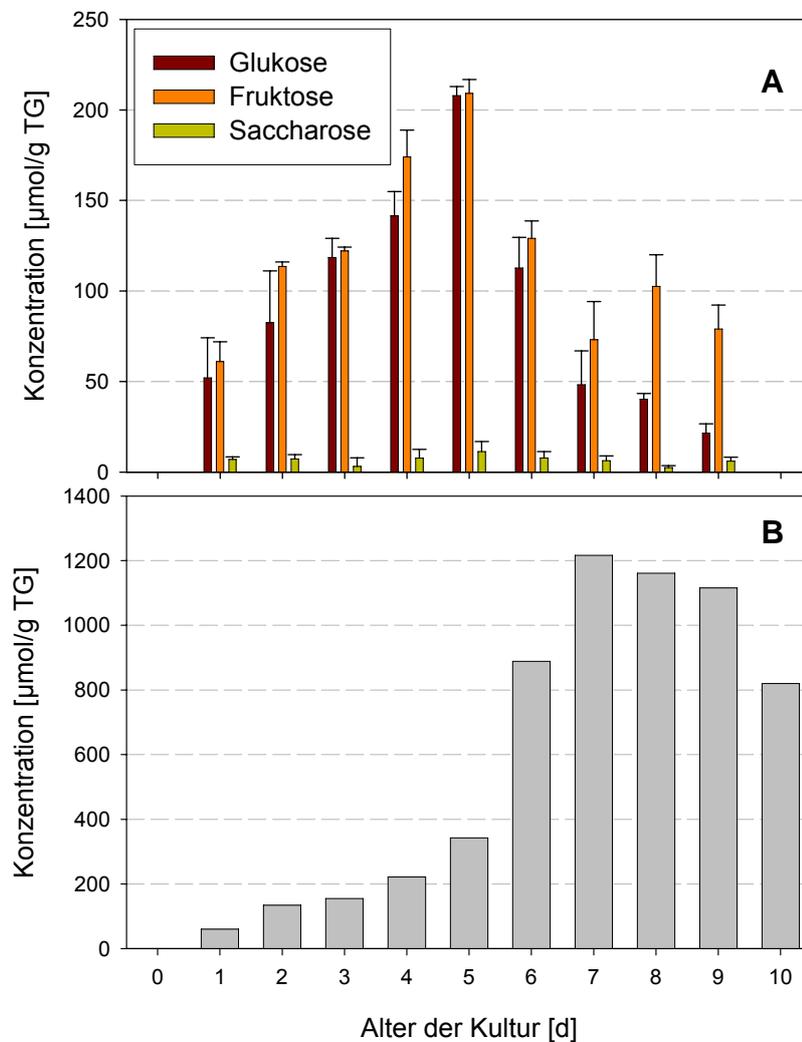


Abb. 27: Zuckerkonzentrationen im Medium, welches zum Zeitpunkt des Überimpfens ausschließlich 87 mM Saccharose enthielt (n=3) (A). Zuckerverbrauch der Zellen im Verlauf der Kultivierung, der in Hexoseeinheiten auf der Basis der Verringerung der Menge an Zucker im Medium berechnet wurde (B).

Berechnet man ausgehend vom Gesamtzuckergehalt des Mediums den Verbrauch des Zuckers, erkennt man, dass die Aufnahme durch die Zellen nicht gleichmäßig erfolgt (Abb. 27 B). Mit dem Übergang von der *lag*-Phase in die Teilungsphase nimmt auch die Zuckeraufnahme zu, durchläuft dann ein erstes Maximum und fällt am Ende der Teilungsphase stark ab. Ein erneuter, starker Anstieg des Zuckerverbrauches ist mit dem Übergang in die stationäre Phase zu verzeichnen.

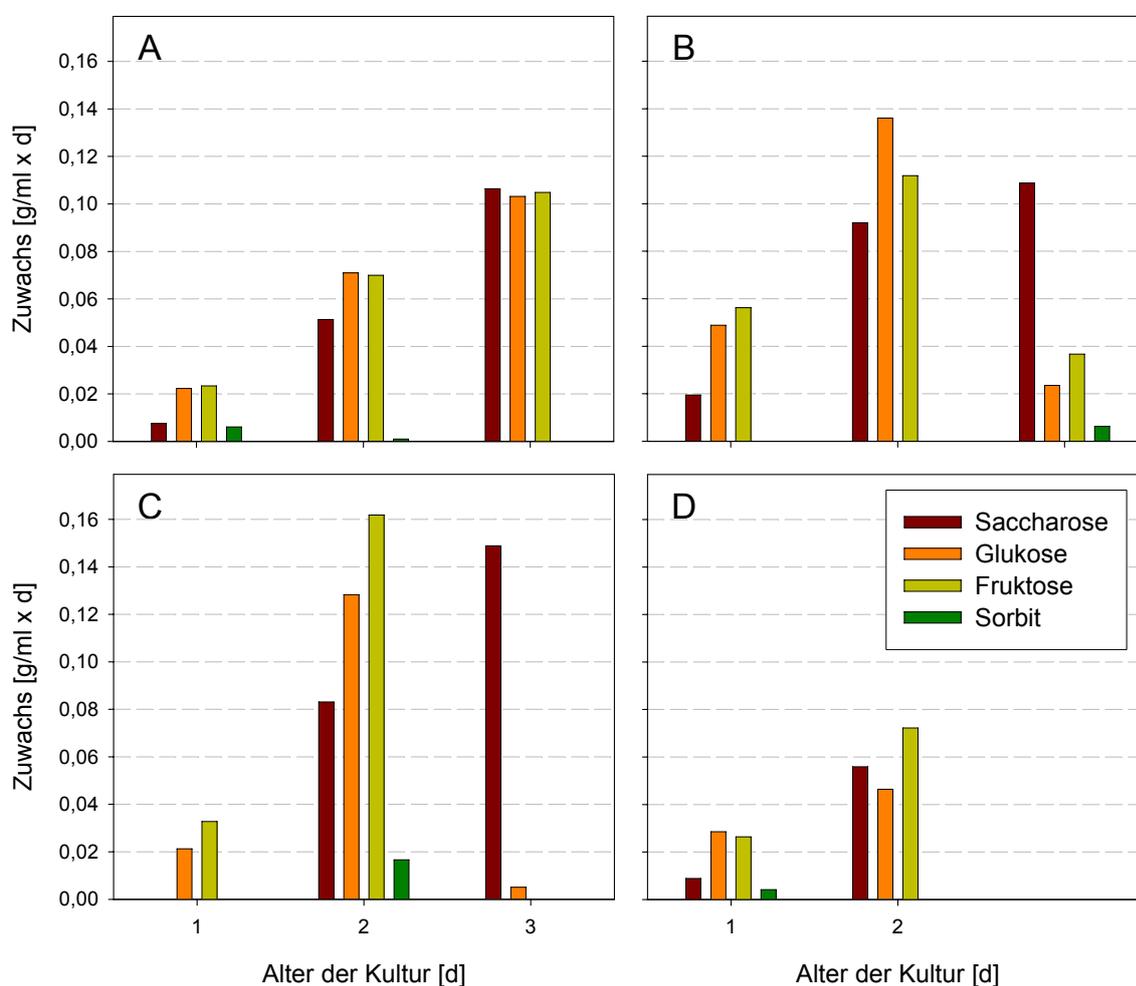


**Abb. 28: Zuckerkonzentrationen in den Zellen (n=3) (A) und Stärkekonzentration (B) im Verlauf der Kultivierung.**

Die interne Zuckerkonzentration erreicht am 5. Kulturtag ein Maximum mit 200  $\mu\text{mol}$  Fruktose und 200  $\mu\text{mol}$  Glukose pro g TG (Abb. 27 A). Glukose und Fruktose sind intrazellulär zunächst in annähernd gleichen Anteilen vertreten, ab Tag 8 dominiert Fruktose. Saccharose konnte intrazellulär nur in sehr geringen Konzentrationen nachgewiesen werden. Dies zeigt, dass Saccharose entweder nicht aufgenommen wird oder unmittelbar nach der Aufnahme gespalten wird. Es findet offenbar keine zellinterne Resynthese von Saccharose statt. Die Quantifizierung der Stärke ergab, dass mit dem Übergang zur stationären Phase zunehmend Stärke gebildet wird (Abb. 27 B).

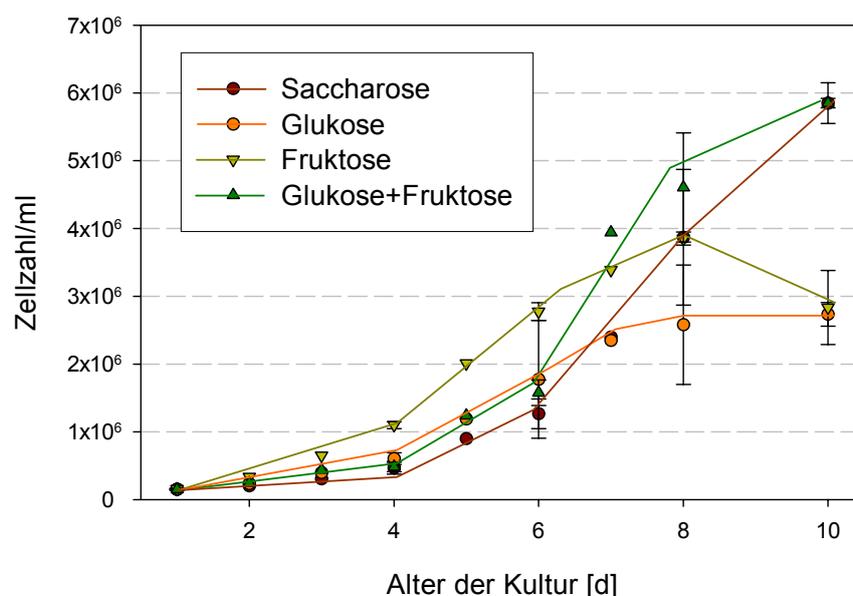
### 3.2.2.2 Modifikationen des Zuckerangebotes

Die entwicklungsabhängige Umstellung der BY-2 Zellen von der präferierten Glukose- auf die Fruktose-Aufnahme wurde im Folgenden genauer untersucht. Hierfür wurden Zellen aus 6 bis 9 Tage alten Zellkulturen in Medien mit variierendem Zuckerangebot subkultiviert und die Entwicklung der Frischgewichte verfolgt (Abb. 29). Es zeigte sich, dass Zellen aus 6 Tage alten Zellkulturen in Medien mit Glukose oder Fruktose ähnlich gut wuchsen, Zellen von 7 Tage alten Zellkulturen am Besten in glukosehaltigem Medium und Zellen von 8 bis 9 Tage alten Zellkulturen in fruktosehaltigem Medium am meisten Frischgewicht produzierten. Der Zuwachs in saccharosehaltigem Medium war stets etwas geringer als der Zuwachs in Medien mit Glukose oder Fruktose als Zuckerquelle. Ohne Zufuhr metabolisierbarer Zucker fand mit Ausnahme der 8 Tage alten Zellen, die in geringem Umfang zum Wachstum befähigt waren, kein Zuwachs des Frischgewichtes statt.



**Abb. 29:** Zuwachs des Frischgewichtes der Zellen, die aus 6 (A), 7 (B), 8 (C) und 9 Tage (D) alten Zellkulturen in Medien mit verschiedenem Zuckerangebot (je 87 mM Saccharose, Glukose, Fruktose und Sorbit) subkultiviert wurden. Die exemplarisch dargestellten Daten, stellen den Zuwachs des Frischgewichtes 3 Tage nach der Subkultivierung dar.

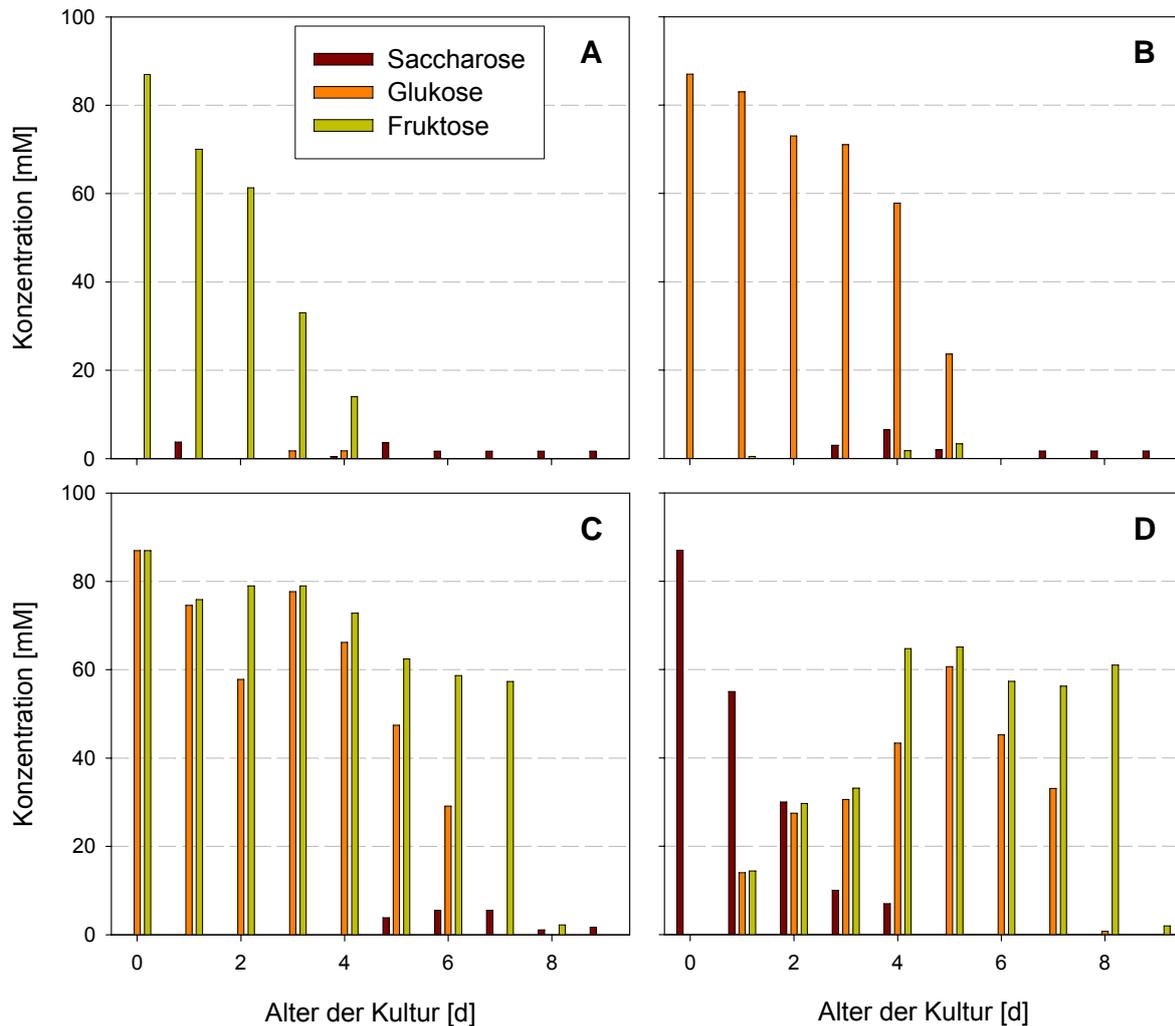
Im Anschluss daran wurde die Fruktose-Präferenz von 9 Tage alten Zellkulturen im Hinblick auf die Wirkung auf die Zellteilung näher untersucht. Dazu wurden diese Zellen in Medien mit unterschiedlichem Zuckerangebot subkultiviert und die Zellzahl-Entwicklung, sowie der Verlauf der Zuckerkonzentrationen im Medium und in den Zellen, charakterisiert. Wie in Abb. 30 gezeigt, ist in Medium mit Fruktose als Kohlenhydratquelle die *lag*-Phase signifikant kürzer und somit steigt die Zellzahl im Vergleich zu den anderen Ansätzen schneller an. Während eine deutliche Zunahme der Zellzahl in Medien mit Glukose, Saccharose sowie Glukose plus Fruktose erst ab Tag 5 festzustellen ist, wird die Teilungsphase bei den Zellen in fruktosehaltigem Medium bereits zwischen Tag 3 und 4 erreicht. Ein ähnliches Verhalten zeigten Zellen von 5 Tage alten Zellkulturen in Medium mit Glukose. Weil in den Ansätzen mit Glukose und Fruktose die Gesamtmasse an Zucker bei gleicher Molarität im Verhältnis zum Ansatz mit Saccharose nur halb so hoch war, ist die maximal erreichte Zellzahl in diesen Ansätzen dementsprechend geringer. Vergleicht man die Entwicklung der Zellzahl von Zellen in Saccharose-Medium mit der in Medium mit Glukose plus Fruktose, erkennt man einen geringen zeitlichen Entwicklungsvorsprung der Zellen im Hexose-haltigem Medium.



**Abb. 30:** Entwicklung der Zellzahl von Zellen einer 9 Tage alten Zellkultur, die in Medien mit verschiedenem Zuckerangebot (87 mM Saccharose, 87 mM Glukose, 87 mM Fruktose und 87 mM Glukose + 87 mM Fruktose) subkultiviert wurden (n=3).

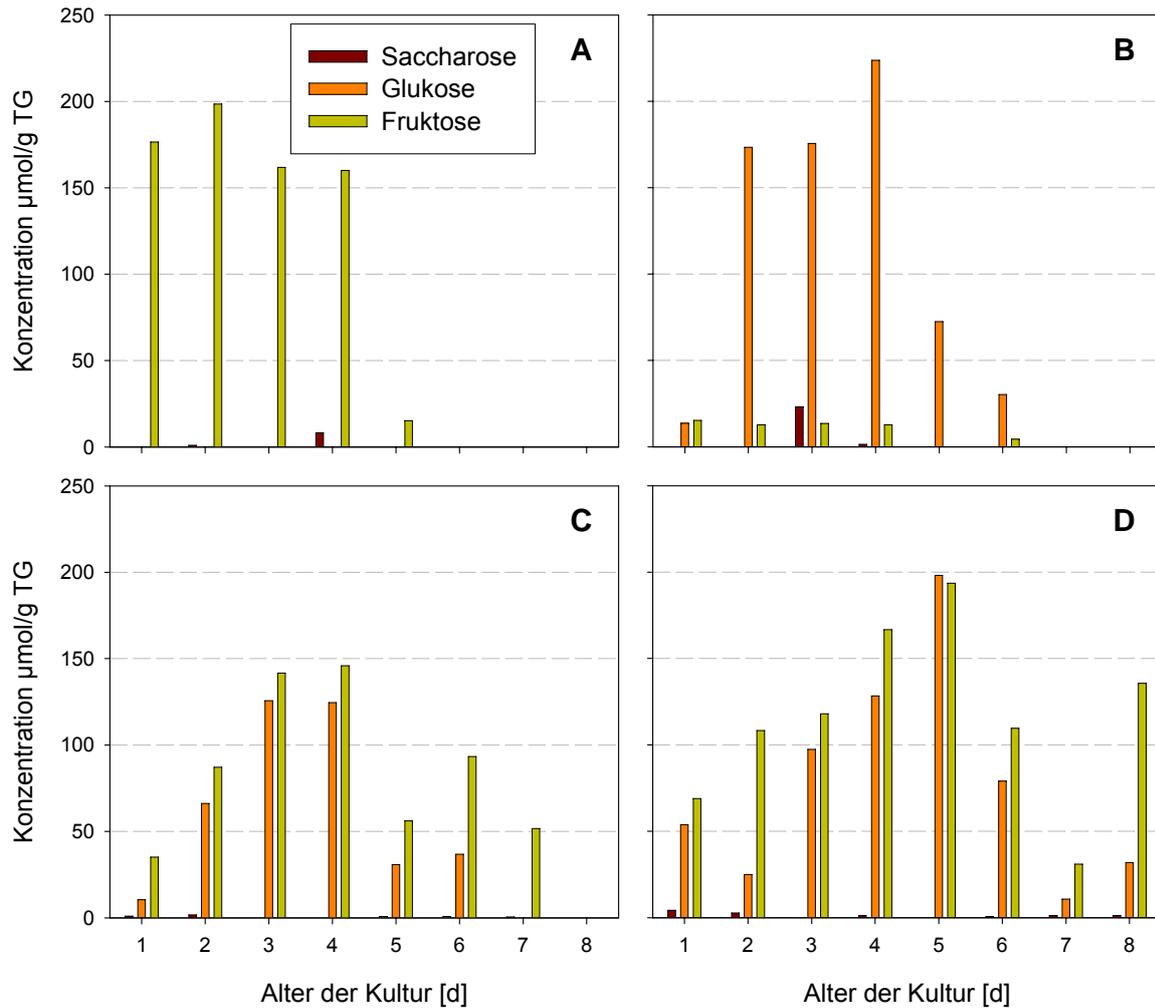
Die Kinetik der Zuckerkonzentrationen im Medium der mit verschiedenen Zuckerquellen subkultivierten 9 Tage alten Zellen zeigt, dass im Ansatz mit Fruktose sich die Zuckerkonzentration tatsächlich auch schneller verringert, als die Konzentration der angebotenen Glukose, bzw. Saccharose (Abb. 31). Interessanterweise findet bei gleichzeitigem Angebot von Glukose und Fruktose keine bevorzugte Aufnahme von Fruktose statt, sondern zunächst verringert sich die Glukose- und Fruktose-

Konzentration gleichermaßen; ab dem 5. Kulturtag die der Glukose und ab dem 8. Kulturtag die der Fruktose.



**Abb. 31: Zuckerkonzentrationen im Medium von Zellen die im Alter von 9 Tagen in Medien mit verschiedenen Zuckerquellen subkultiviert wurden. Die Medien enthielten 87 mM Fruktose (A), 87 mM Glukose (B), 87 mM Glukose + 87 mM Fruktose (C) und 87 mM Saccharose (D).**

Der intrazelluläre Zuckerspiegel der in Fruktose kultivierten Zellen war bereits am ersten Kulturtag mit 170  $\mu\text{mol/g}$  TG sehr hoch. Im Gegensatz dazu erreichten die Zellen in glukosehaltigem Medium den maximalen endogenen Zuckerspiegel erst zwischen dem 2. und 4. Kulturtag, im Medium mit Glukose plus Fruktose am 3. bis 4. Kulturtag und die Zellen in Saccharose am 5. Kulturtag. Wichtig ist auch die Tatsache, dass intrazellulär keine nennenswerte Umwandlung des im Medium angebotenen Zuckers erfolgte.



**Abb. 32: Intrazelluläre Zuckerkonzentrationen von Zellen die im Alter von 9 Tagen in Medien mit verschiedenen Zuckerquellen subkultiviert wurden. Die Medien enthielten 87 mM Fruktose (A), 87 mM Glukose (B), 87 mM Glukose + 87 mM Fruktose (C) und 87 mM Saccharose (D).**

Offen war, ob die Präferenz 9 Tage alter Zellkulturen für Fruktose den Zellen lediglich einen zeitlichen Vorsprung auf Grund der früher einsetzenden Teilung verschafft, oder ob sich die Menge teilender Zellen oder der Ablauf des Zellzyklus generell verändert. Diese Fragen konnten nur mit synchronisierten Zellen beantwortet werden. Ein gewisses Problem stellte dabei die 24-stündige Inkubation mit Aphidicolin dar, die in saccharosehaltigem Medium erfolgte und möglicherweise zur Abschwächung des Effektes führte. Diese Synchronisierungsbedingungen waren unumgänglich, denn die Verwendung identischer Medien während der Synchronisierung ist notwendig, um denselben Synchronisierungsgrad der Ansätze zu gewährleisten. Die Untersuchung des Zellzyklus der an Fruktose angepassten Zellen zeigt trotz dieser Einschränkung, dass der Zellzyklus gegenüber dem mit anderen Zuckerquellen im Medium insgesamt verkürzt war (Abb. 33 A - C). Dabei ist sowohl die Länge der S-Phase als auch die der G2-Phase, die im Versuch in ganzer Länge erfasst wurden, verringert. Überraschend war auch, dass selbst ohne Zufuhr metabolisierbarer Zucker von außen der

erste synchronisierte Zellzyklus, wenn auch deutlich langsamer, doch vollständig durchlaufen wurde (Abb. 33 D). Eine längere Verarmung in zuckerfreiem Medium hätte zwar den Effekt des fehlenden Zuckers deutlicher gemacht, allerdings wäre eine Synchronisierung unter diesen Umständen unmöglich. Aus diesem Grund war es nicht möglich, eine vollständige Verarmung der Zuckerreserven zu erreichen, sondern nur, den Effekt eines verringerten Zuckerangebots zu untersuchen. Der Anteil an Zellen, die während des Versuches in der G1-Phase verblieben (entspricht den G0-Zellen), war unabhängig von der Zuckerquelle gleich. Demnach beeinflusst die Art des angebotenen Zuckers nicht den Anteil sich teilender Zellen, sondern die Länge des Zellzyklus.

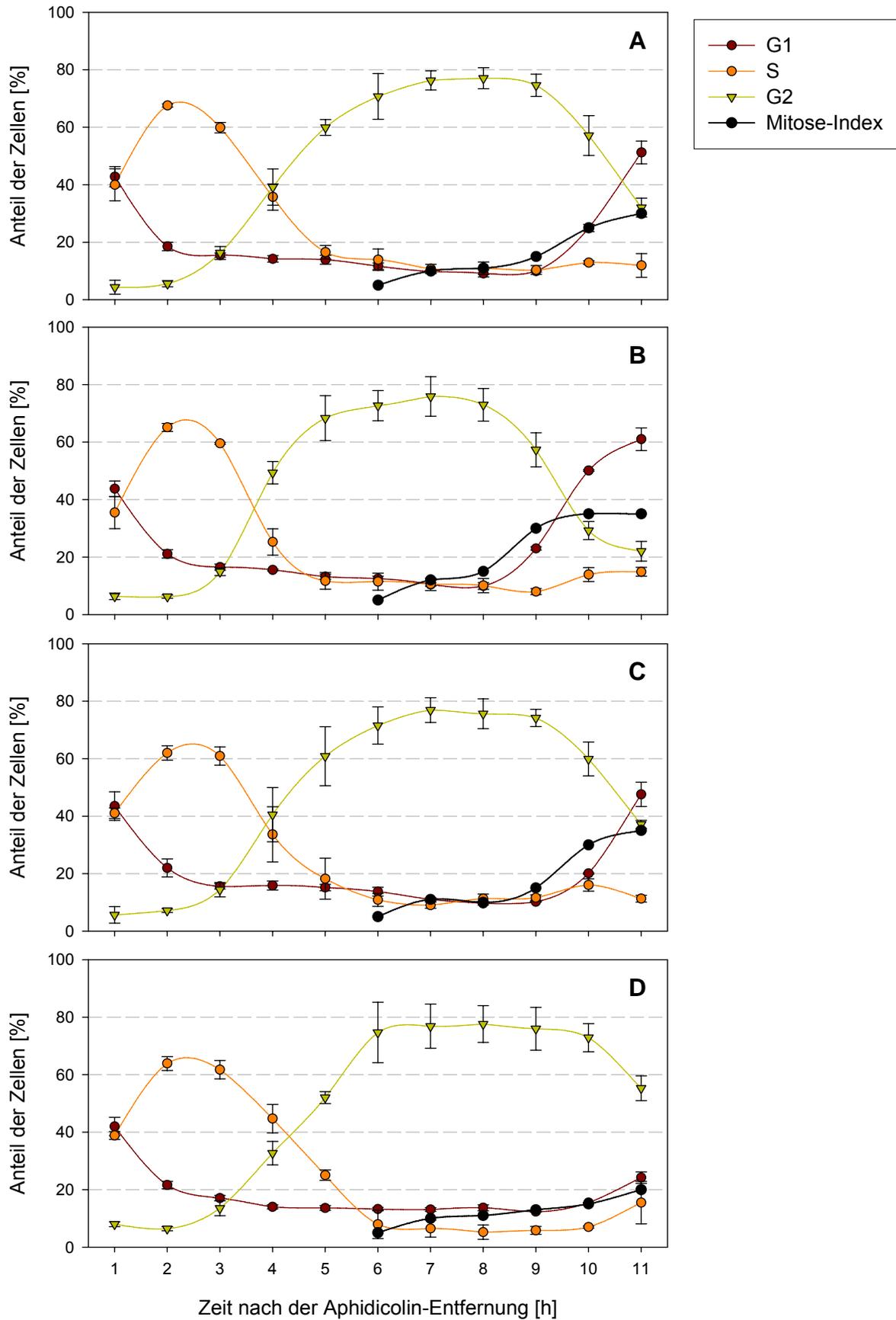


Abb. 33: Verlauf des Zellzyklus in mit Aphidicolin synchronisierten Zellen einer 9 Tage alten Zellkultur, die nach Entfernung des Hemmstoffes in Medien mit verschiedenem Zuckerangebot subkultiviert wurden (n=3). Die Medien enthielten 87 mM Saccharose (A), 87 mM Fruktose (B),

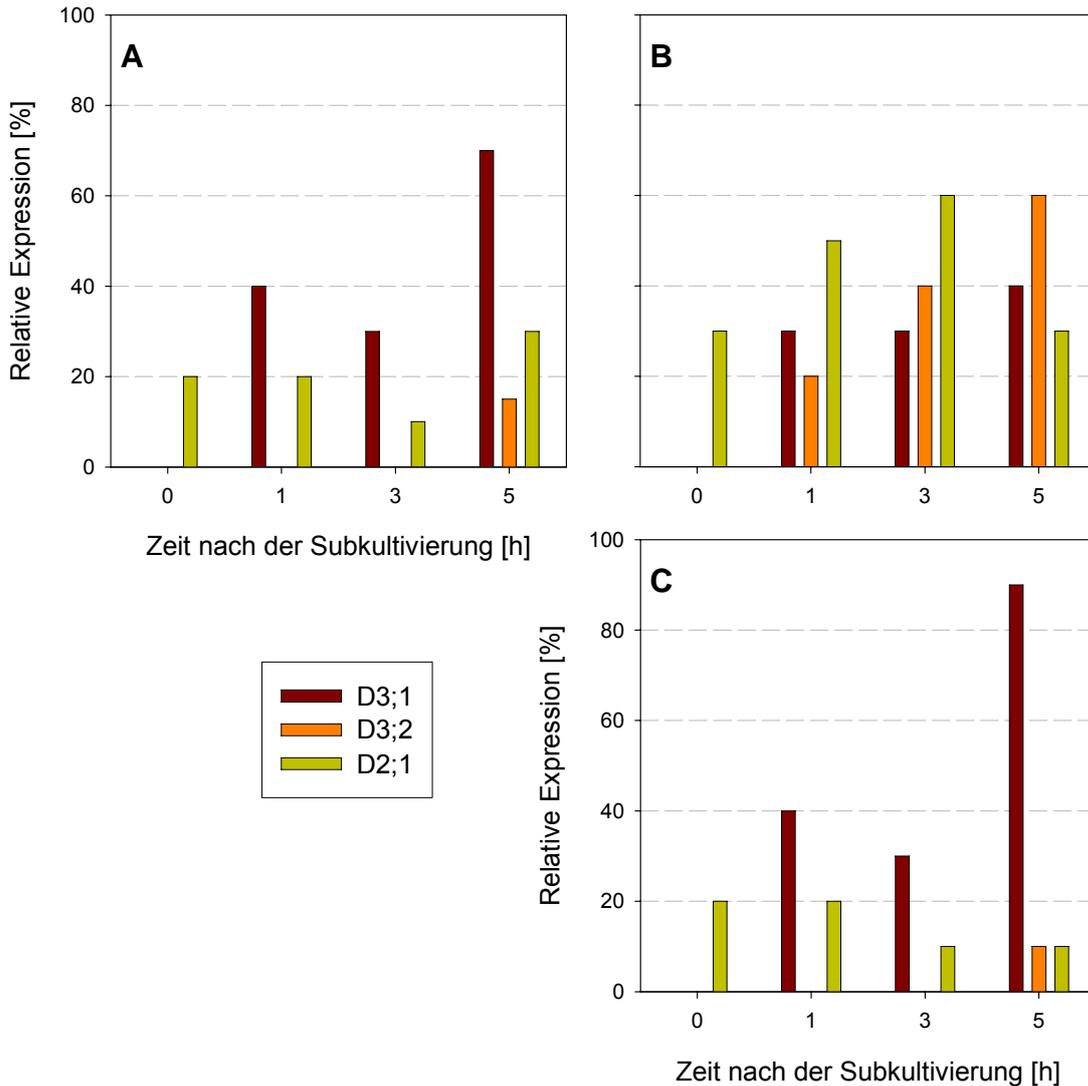
**87 mM Glukose (C) und 87 mM Sorbit (D). Die Anteile der G1-, S- und G2-Phasen wurden durch Quantifizierung von 5000 Zellen mittels Durchflusszytometrie ermittelt und der Verlauf der Mitose über die Bestimmung des Mitose-Index.**

Die Präferenz von 9 Tage alten BY-2 Zellen für Fruktose, die von einer schnelleren Aufnahme dieses Zuckers und einem beschleunigten Zellzyklus begleitet wurde, konnte im Folgenden dazu verwendet werden, um Zucker-responsive Zellzyklusgene zu identifizieren.

### **3.2.2.3 Einfluss des modifizierten Zuckerangebotes auf die Expression von Zellzyklus-Kontrollgenen**

Da mit der Wahl von Zellen aus einer bestimmten Ernährungssituation (9 Tage alte Zellen in Medien mit verschiedener Zuckerquelle) ein variierender Effekt auf den Zellzyklus ausgeübt werden konnte, lag die Vermutung nahe, dass Zucker nicht nur als Ressource, sondern auch als Signal auf den Zellzyklus wirkt. Zur Überprüfung, wurde der Einfluss des Kohlenhydratangebotes auf die Expression verschiedener Zellzyklus-Kontrollgene untersucht. Die Untersuchungen wurden zum einen mit Aphidicolin-synchronisierten Zellen durchgeführt und zum anderen mit unsynchronisierten Zellen der stationären Phase, welche in den entsprechenden Medien subkultiviert wurden. Analysiert wurde die Expression der Zellzyklus-Kontrollgene mittels semiquantitativer RT-PCR.

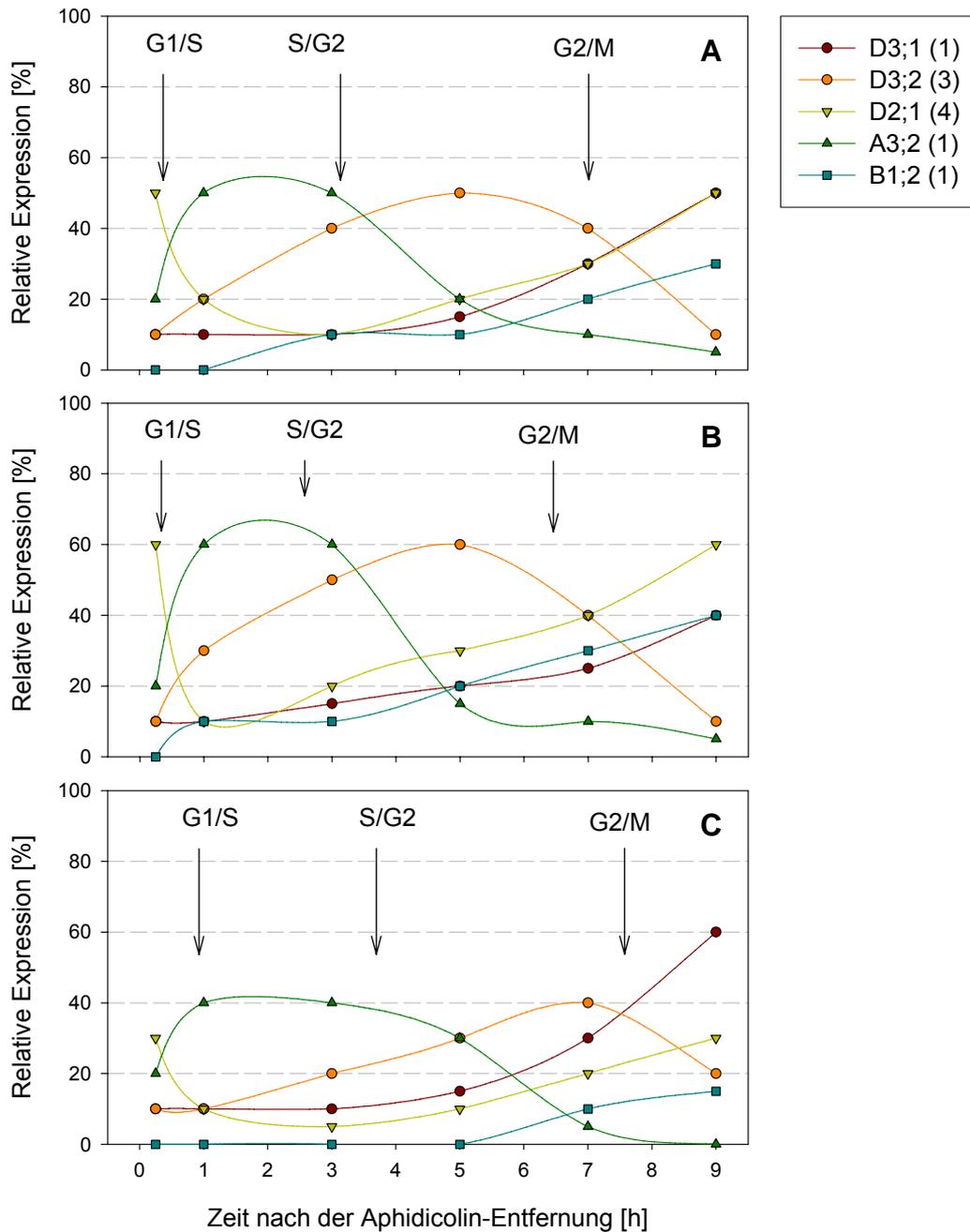
Die Subkultivierung von Zellen der stationären Phase in Saccharose- und Fruktose-haltigem Medium, bzw. Medium mit Sorbit bewirkte deutliche Unterschiede im Zeitpunkt der Induktion verschiedener Gene (Abb. 34). Während die Expression des Cyclins D2;1 in Zellen in Saccharose-haltigem Medium erst nach 5 h zunimmt, tritt dies in Zellen in Fruktose-haltigem Medium bereits nach 1 h ein. Im Gegensatz dazu bleibt der Anstieg der Expression dieses Cyclins im Ansatz ohne metabolisierbaren Zucker vollständig aus. Eine zeitlich frühere Induktion der Expression in Fruktose-haltigem Medium wurde ebenfalls beim Cyclin D3;2 gefunden. Auch die Expression dieses Cyclins wurde bei fehlendem metabolisierbarem Zucker im Medium geringer exprimiert. Genau entgegengesetzt verändert sich die Expression des Cyclin D3;1.



**Abb. 34: Einfluss von Zucker auf die relative Expression (bezogen auf die stärkste Bande innerhalb des Versuches) der D-Cycline nach der Subkultivierung von unsynchronisierten Zellen der stationären Phase in Medium mit 87 mM Saccharose (A), 87 mM Fruktose (B) und 87 mM Sorbit (C). Die Expression wurde mittels semiquantitativer RT-PCR ermittelt. Die Quantifizierung der Banden erfolgte mit Image Master 1D Gel Analysis.**

Im Folgenden wurden die Expressionsmuster ausgewählter Gene mit synchronisierten Zellen genauer analysiert. Es zeigte sich, dass die Expression der Cycline D2;1, D3;2, D3;1, A3;2 und B1;2 vom Zuckerangebot unterschiedlich beeinflusst wird (Abb. 35). Der Effekt besteht zum einen in der Erhöhung oder Erniedrigung der Expressionsstärke und zum anderen in der Verschiebung des Expressionsmusters im Verlauf des Zellzyklus. Besonders intensiv wurde das Verhalten der drei D-Cycline untersucht, da es sich bereits zu Beginn dieser Arbeit andeutete, dass diese an der Verknüpfung des Zucker- und Cytokininsignals beteiligt sein könnten. Cyclin D2;1 zeigte eine verstärkte, bzw. abgeschwächte Expression am G1/S-Übergang als Reaktion auf hohe, bzw. erniedrigte endogene Zuckerspiegel und eine Verschiebung des Anstiegs der Expression während der

G2-Phase in der Folge des unterschiedlich schnell verlaufenden Zellzyklus (vgl. Abb. 32 und Abb. 33). Cyclin D3;2 wurde bei erhöhtem Zuckerspiegel verstärkt, bzw. bei erniedrigtem Zuckerspiegel geringer während der G2-Phase exprimiert. Auch bei diesem Cyclin kam es in der Folge des unterschiedlich schnell ablaufenden Zellzyklus zu einer Verschiebung des Expressionsmusters. Das Cyclin D3;1 reagierte entgegengesetzt, ein verstärktes Zuckersignal bewirkt eine verzögerte Expression am G2/M-Übergang, während ein reduziertes Zuckersignal die Expression intensiviert. Zur Reaktion der übrigen Zellzyklusgene kann auf Grund der geringeren Versuchsanzahl nur bedingt etwas ausgesagt werden. Die Cycline A3;2 und B1;2 reagierten mit Erhöhung der Expression auf ein verstärktes und mit erniedrigter Expression auf ein reduziertes Zuckersignal. Die Expression der Cdk2a und CdkB1-1 zeigten keinerlei Veränderung im Zusammenhang mit dem Zuckersignal.



**Abb. 35:** Verlauf der Cyclin-Expression in mit Aphidicolin synchronisierten Zellen einer 9 Tage alten Zellkultur, die nach Entfernung des Hemmstoffes in Medien mit verschiedenem Zuckerangebot subkultiviert wurden (n=3). Kontrolle (87 mM Saccharose) (A), mit 87 mM Fruktose (B) und mit 87 mM Sorbit (C). Die Expression wurde mittels semiquantitativer RT-PCR ermittelt. Die Quantifizierung der Banden erfolgte mit Image Master 1D Gel Analysis. In Klammern ist die Anzahl identischer Parallelversuche angegeben, die durchgeführt wurden.

### 3.2.3 Charakterisierung der Cytokinine als regulatorisches Signal im Zellzyklus der BY-2 Zellen

Um die regulatorische Bedeutung von Cytokininem im Ablauf des Zellzyklus zu untersuchen, wurde zunächst der endogene Cytokininspiegel gemessen, die Aktivität der Cytokininoxidase/Dehydrogenase untersucht, sowie die Effekte eines veränderten Cytokininsignals auf den Ablauf des Zellzyklus und die Expression von Zellzyklus-Kontrollgenen analysiert.

#### 3.2.3.1 Der endogene Cytokininspiegel der BY-2 Zellen im Verlauf des Zellzyklus

Betrachtet man das Muster der Cytokinine im Verlauf des Zellzyklus der synchronisierten BY-2 Zellen, so findet man erhöhte Konzentrationen verschiedener Cytokinine unmittelbar vor den G1/S-, dem S/G2-, dem G2/M- und dem M/G1-Übergang (Abb. 36). Das mengenmäßig dominierende Cytokinin ist dabei immer Z, welches in Konzentrationen von maximal 100 pmol/g FW vorkommt. Am G1/S-Übergang wird Z begleitet von DHZ und IP, am S/G2-Übergang von DHZ allein, am G2/M-Übergang von ZR und am M/G1 von DHZ, DHZR, ZR und IPA. Darüber hinaus wurde festgestellt, dass zusammen mit den „aktiven Cytokininem“ auch die als inaktiv geltenden glukosylierten Cytokinine zu finden waren, allerdings in Konzentration an der unteren Nachweisgrenze (maximal 5 pmol/g FG). Zwischen den genannten Anreicherungsphasen der Cytokinine lagen minimale, zum Teil nicht mehr messbare Cytokininkonzentrationen vor (Abb. 36).

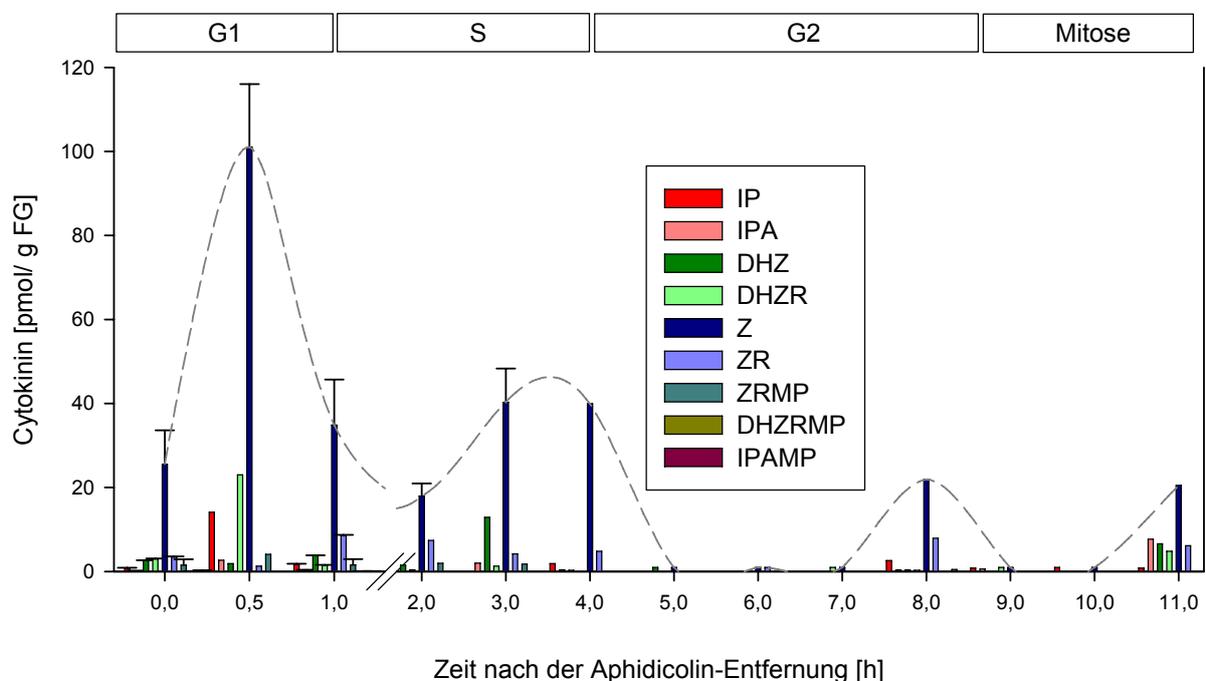
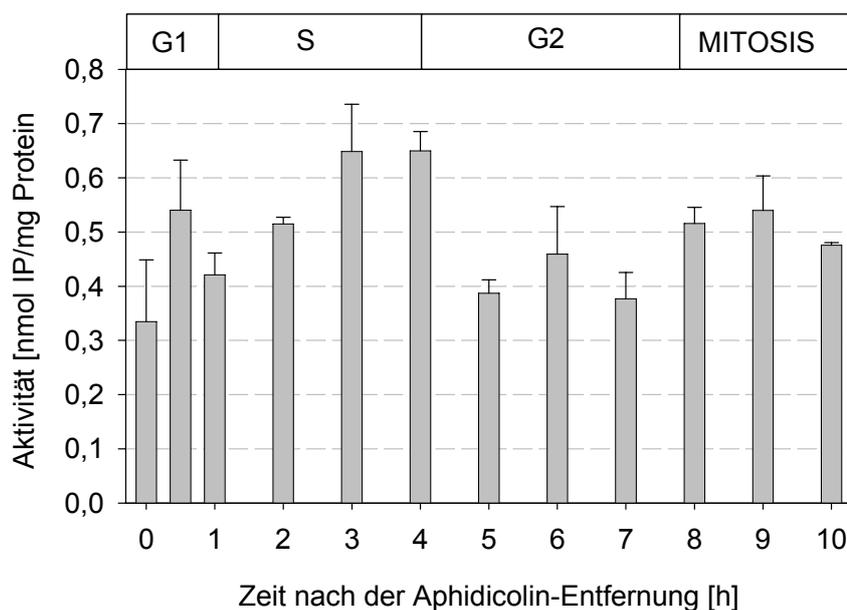


Abb. 36: Cytokininmuster im Verlauf des Zellzyklus' in mit Aphidicolin synchronisierten BY-2 Zellen.

**Z** – *t*-Zeatin; **ZR** – *t*-Zeatinribosid; **ZRMP** – *t*-Zeatinribosid-Nukleotid; **DHZ** – Dihydrozeatin; **DHZR** – Dihydrozeatinribosid; **DHZRMP** – Dihydrozeatinribosid-Nukleotid; **IP** – Isopentenyladenin; **IPA** – Isopentenyladenosin; **IPAMP** – Isopentenyladenosin-Nukleotid

### 3.2.3.2 Die Cytokinin Oxidase/Dehydrogenase Aktivität der BY-2 Zellen im Verlauf des Zellzyklus

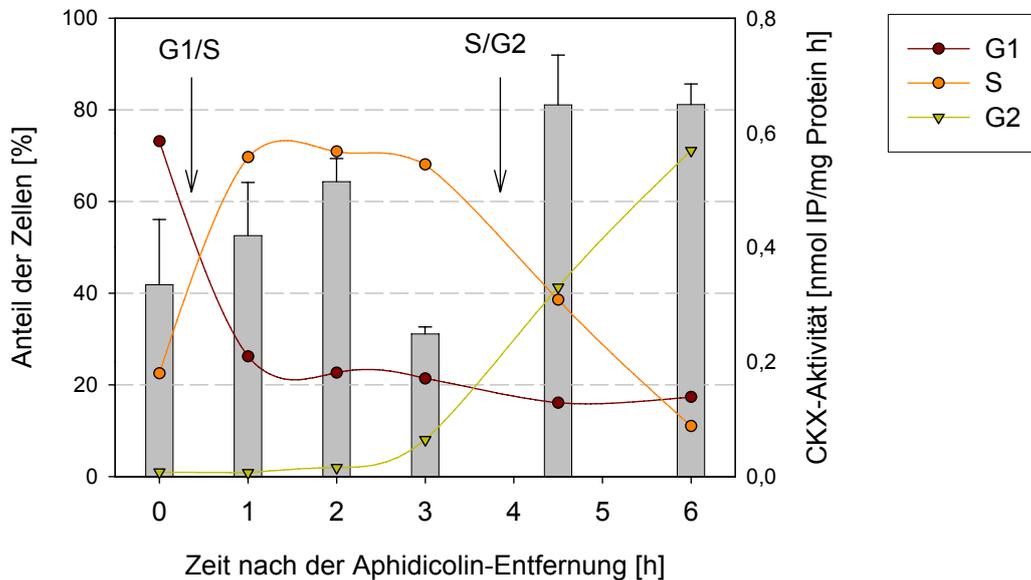
Gemäß der Tatsache, dass endogen nur sehr geringe Mengen an glukosidischen Cytokininen gefunden wurden, scheidet die reversible Umwandlung zwischen inaktiven und aktiven Cytokininen als Ursache für die oszillierenden Cytokinin-Konzentrationen im Zellzyklus-Verlauf aus (Abb. 36). Durch Messung der Aktivität des Cytokinin abbauenden Enzymes Cytokinin Oxidase/Dehydrogenase (CKX) sollte überprüft werden, ob die Regulation dieses Enzyms an der Entstehung des oszillierenden Cytokininspiegels beteiligt ist. Abb. 37 bildet den Verlauf der CKX-Aktivität Aphidicolin-synchronisierter Zellen ab. Erkennbar sind erhöhte Aktivitäten am G1/S-Übergang (30 min), am S/G2-Übergang (3 - 4 h) und während der Mitose (8 - 9 h). Insgesamt war jedoch während des gesamten Zellzyklus eine Basisaktivität von etwa 0,4 nmol IP/mg löslichem Protein messbar.



**Abb. 37: Cytokinin Oxidase/Dehydrogenase-Aktivität in mit Aphidicolin synchronisierten BY-2 Zellen im Verlauf des Zellzyklus (n=5).**

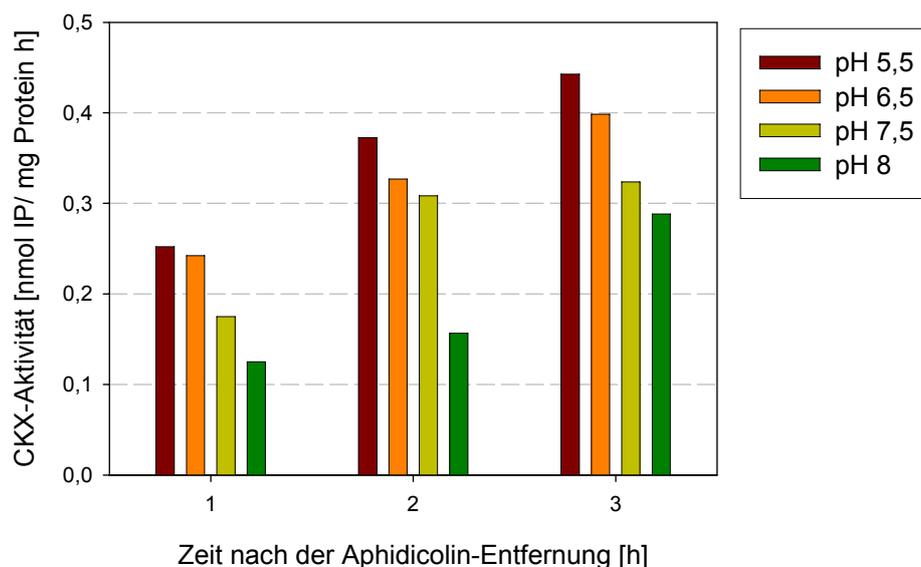
Um nachzuweisen, ob die erhöhten Aktivitäten der CKX tatsächlich zeitgleich mit den Übergängen von einer Zellzyklusphase zur nächsten auftreten, wurde der S/G2-Übergang durch Verwendung eines größeren Kultivierungsvolumens (500 ml Kultur statt 100 ml) verzögert. Die Volumenvergrößerung führt zu einer Verschlechterung der Belüftung der Zellen. Deren Folge ist eine verlangsamte

Zellteilung im Vergleich zu geringeren Kultivierungsvolumina (Dobrev et al.; 2003). In Abb. 38 ist deutlich erkennbar, dass die erhöhte CKX-Aktivität auch in diesem Fall zeitgleich mit den Übergängen zu finden war.



**Abb. 38:** Einfluss eines langsameren Zellzyklus auf die Verteilung der CKX-Aktivität. Die mit Aphidicolin synchronisierten BY-2 Zellen wurden in einem 500 ml-Kolben subkultiviert, wodurch sich der Ablauf des Zellzyklus insgesamt verlangsamt und der S/G2-Übergang anstatt bei 3 h bei 4,5 h stattfindet. (n=3).

Die Messung der CKX-Aktivität findet routinemäßig bei pH 7,5 statt. Um herauszufinden, welches pH-Optimum die aus den BY-2 Zellen isolierte CKX hat, wurde die pH-Abhängigkeit zu Beginn des synchronisierten Zyklus abgetastet (Abb. 39). Es zeigte sich, dass die Aktivität bei leicht saurem pH-Wert noch um ca. 20 - 25 % größer war, als bei dem gängigen Routinetest. Dies deutet darauf hin, dass das pH-Optimum der extrahierten CKX deutlich niedriger ist, als der im Messansatz verwendete pH-Wert von 7,5.



**Abb. 39: Einfluss des pH-Wertes (5,5; 6,5; 7,5 und 8) auf die CKX-Aktivität in mit Aphidicolin synchronisierten BY-2 Zellen.**

Die Untersuchung der Verteilung der CKX-Aktivitäten in verschiedenen Zellkomponenten ergab, dass die höchsten Aktivitäten in der löslichen Fraktion messbar sind. Diese Fraktion beinhaltet die Vakuolen, das Endoplasmatische Retikulum und cytoplasmatische Bereiche. Kaum messbare Aktivitäten (0,05 – 0,1 nmol IP/ mg Protein) wurden in der Partikel-Fraktion gefunden, welche Zellwände, Amyloplasten, Cytoplasma-Membranen und eventuell auch Zellkerne umfasst. Im Medium konnte keinerlei Aktivität nachgewiesen werden.

Die Erhebung der kinetischen Daten ergab, dass die CKX in der Lage ist Z, DHZ, IP und IPA abzubauen (Tab. 13). Mit ZR und DHZR als Substrat war keine CKX-Aktivität messbar. Der  $K_m$ -Wert, welcher mit Hilfe des Lineweaver-Burk Plots ermittelt wurde (siehe Material und Methoden), ist mit 2,2  $\mu\text{M}$  für IP am niedrigsten, gefolgt von Z mit 60  $\mu\text{M}$  und DHZ mit 72  $\mu\text{M}$ . IPA hat einen vergleichsweise hohen  $K_m$ -Wert von 153  $\mu\text{M}$ . Die maximalen Umsatzgeschwindigkeiten variieren von 2,9  $\text{nmol} \times \text{g FG}^{-1} \text{h}^{-1}$  für IP, bis 14,8  $\text{nmol} \times \text{g FG}^{-1} \text{h}^{-1}$  bei DHZ. Unter Verwendung der Gleichungen der Lineweaver-Burk Plots wurden ausgehend von den ermittelten Cytokinin-Konzentrationen (siehe Abb. 36) die Zeiten berechnet, die zum vollständigen Abbau dieser Cytokinine notwendig wären. Dabei wurde berücksichtigt, dass die realen Konzentrationen auf Grund des Volumens der Vakuole, die keine aktiven Cytokinine enthalten sollte (Kaminek et al; 1997), etwa 10-fach höher lagen. Die auf diese Weise berechneten Abbauezeiten liegen im Bereich von wenigen Minuten bis zu 3 h im Fall von Z (Tab. 13). Einschränkend zu berücksichtigend ist, dass die Aktivität der CKX in einem *in vitro*-Assay gemessen wurde. Dieses beinhaltet einen künstlichen Elektronenakzeptor und der pH-Wert entspricht nicht exakt dem Optimum des Enzyms.

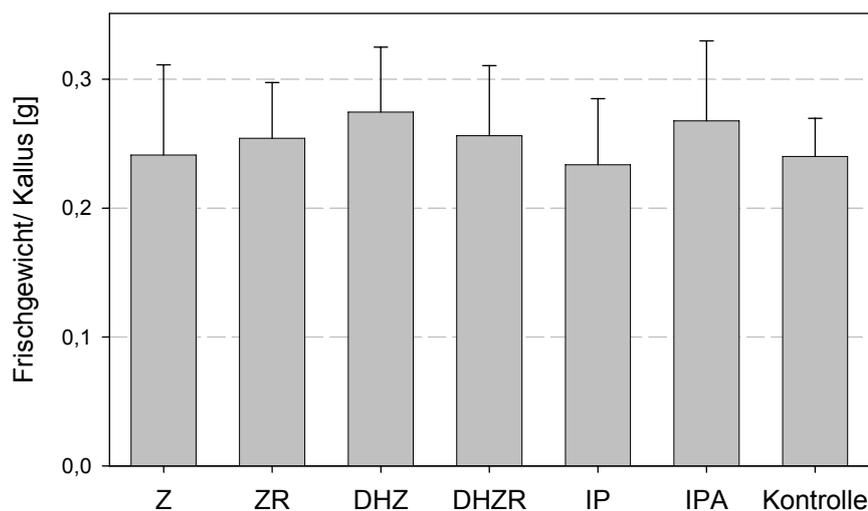
**Tab. 13: Kinetische Daten der CKX und berechnete Abbauzeiten für die intrazellulär vorliegenden Cytokinin-Konzentrationen.  $K_m$  und  $v_{max}$  wurden über die Lineweaver-Burk Auftragung ermittelt, wobei mit ZR und DHZR als Substrate kein Abbau durch die CKX festgestellt wurde.**

	$K_m$ ( $\mu\text{M}$ )	$V_{max}$ [nmol/g FG x h]	Cytokinin-Konzentration in den Zellen [nmol/g FG]	Abbauzeit [min]
Z	60	12,6	1	181
ZR	-	-	0,1	-
DHZ	72	14,8	0,05	6
DHZR	-	-	0,25	-
IP	2,2	2,9	0,1	32
IPA	153	11,2	0,17	58

### 3.2.3.3 Modifikationen des Cytokininsignals

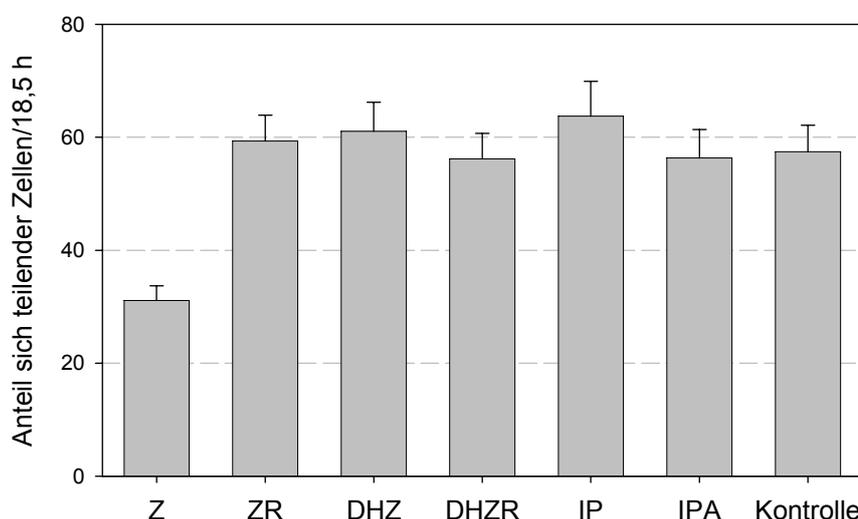
Um die Funktion des Cytokininsignals während des Zellzyklus zu untersuchen, ist es notwendig das endogene Signal zu modifizieren. Die Verstärkung des Signals wurde durch Zugabe verschiedener Cytokinine erreicht. Die Abschwächung des Signals wurde hingegen durch Verwendung von Lovastatin, einem Hemmstoff der Cytokinin-Biosynthese, erreicht.

Die Zugabe von DHZ, DHZR, Z, ZR, IP und IPA (je 6  $\mu\text{M}$ ) hatte einen nicht eindeutigen Effekt auf die Entwicklung der Zellzahl. Es gab für alle hier untersuchten Cytokinine Versuche, die eine geringfügig schnellere Entwicklung der Zellzahl im Vergleich zur Kontrolle zeigten. Es gab jedoch stets auch Versuche mit einer geringen hemmenden Wirkung auf die Entwicklung der Zellzahl. Vergleicht man das Wachstum von Kalli auf Medien mit den verschiedenen Cytokinin, wird bestätigt, dass es in der Summe keinen eindeutigen Effekt auf das Wachstum gibt (Abb. 40). Allerdings wurde auch bei den Kalli ein stark differenzierter Effekt der Cytokinine auf das Wachstum festgestellt, was sich im vergleichsweise großen statistischen Fehler niederschlägt.



**Abb. 40: Einfluss verschiedener Cytokinine (je 6  $\mu\text{M}$  Endkonzentration) auf das Frischgewicht von Kalli, die nach 1 Woche geerntet wurden (n=15).**

Um auszuschließen, dass eindeutige Effekte der Cytokinine nur kurzfristig nachweisbar sind, wurde der Anteil der sich teilender Zellen innerhalb von 18 h nach Cytokinin-Zugabe ermittelt (Abb. 41). Deutlich erkennbar ist der negative Effekt von zusätzlichem Z auf die Zellteilung, während die übrigen Cytokinine keinen erkennbaren Einfluss auf den Anteil sich teilender Zellen in diesem Zeitraum hatten.



**Abb. 41: Anteil sich teilender Zellen innerhalb von 18,5 h nach Applikation verschiedener Cytokinine (je 6  $\mu\text{M}$  Endkonzentration) (n=3).**

Die eben beschriebenen Versuche ergaben kein eindeutiges Ergebnis bezüglich der Wirkung zusätzlicher Cytokinine auf die Zellteilung der BY-2 Zellen. Es musste deshalb vermutet werden, dass der Zeitpunkt der Zugabe für den Effekt entscheidend ist. Daraufhin wurden die Effekte verschiedener

Cytokinine auf den Zellzyklus Aphidicolin-synchronisierter Zellen untersucht. Auf diese Weise konnte der Zugabezeitpunkt genau charakterisiert werden. Da neben dem Einfluss auf den Ablauf des Zellzyklus, ein Effekt der Cytokinine auf die Teilungsstimulation von G0-Zellen nicht auszuschließen war, wurden zur Synchronisierung Zellen der stationären Phase verwendet. Solche Zellen weisen einen vergleichsweise hohen Anteil an G0-Zellen auf, die während der synchronisiert ablaufenden Zellteilung im Durchflusscytometer als Basisanteil von ca. 20 % G1-Phasen Zellen sichtbar werden. Würde die Cytokinin-Zugabe den Anteil an G0-Zellen beeinflussen, so könnte man dies an der Veränderung des Basisanteils an G1-Phasen Zellen erkennen. In Abb. 42 wird deutlich, dass die Zugabe von Z unmittelbar nach der Aphidicolin-Entfernung keinen Effekt auf den Basisanteil an G1-Phasen Zellen hat. Allerdings bewirkt Z eine geringe Verzögerung des G1/S-Überganges, eine deutliche Verzögerung des Beginnes der Mitose und in der Folge ein verzögerter Start der zweiten G1-Phase.

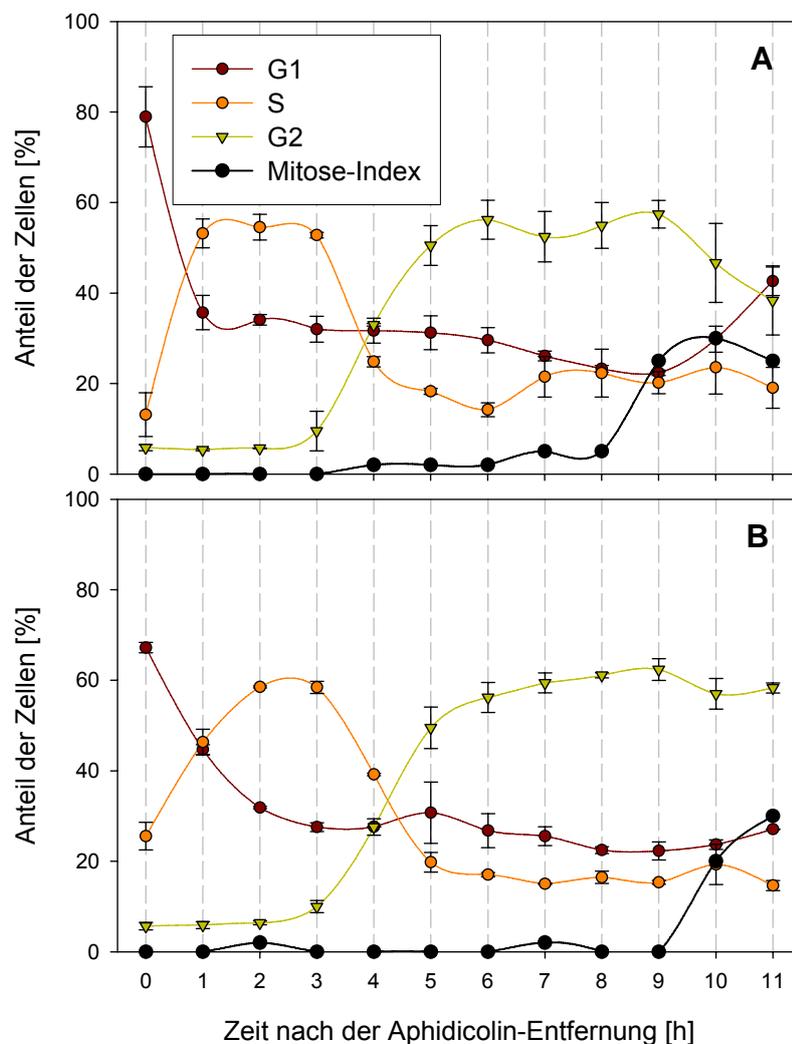


Abb. 42: Verlauf der G1-, S- und G2-Phasen und des Mitose-Index in mit Aphidicolin synchronisierten BY-2 Zellen nach Überimpfen in Medium ohne (A) und mit 6  $\mu\text{M}$  Endkonzentration Z (B). Der Anteil der Phasen wurde durch Quantifizierung von 5000 Zellkernen mittels Durchflusscytometrie ermittelt (n=3).

In Tab. 14 sind die Anteile der Zellen in den verschiedenen Zellzyklusphasen nach Zugabe von Z, ZR, DHZ, DHZR, IP und IPA aufgeführt. Um die Übergänge zwischen den verschiedenen Zellzyklusphasen exakt miteinander vergleichen zu können, wurde in allen Ansätzen die Zunahme des S-Phasen-Anteils ( $\Delta 2-0$ ), des G2-Phasen-Anteils ( $\Delta 4-2$ ) und des G1-Phasen-Anteils ( $\Delta 11-8$ ) berechnet. Wirklich deutliche Effekte sind erst nach 11 h, am Übergang zur zweiten G1-Phase, zu erkennen. Dieser Übergang findet nach Zugabe aller Cytokinine verzögert statt. Z wirkt bereits leicht hemmend auf den G1/S-Übergang, während die übrigen Cytokinine auf diesen Übergang keinen erkennbaren Einfluss haben. IP verzögert den S/G2-Übergang, während DHZ diesen geringfügig fördert. Der G2-M/G1-Übergang ist unabhängig vom zugegebenen Cytokinin im Vergleich zur Kontrolle verzögert. Mit Ausnahme von Z und DHZR bewirken die zugegebenen Cytokinine darüber hinaus eine Verringerung des Anteils sich nicht teilender G1-Zellen um 5 %.

**Tab. 14: Effekt verschiedener Cytokinine auf den Verlauf des Zellzyklus von mit Aphidicolin synchronisierten BY-2 Zellen. Die Cytokinine wurden zum Zeitpunkt 0 in einer Endkonzentration von 6  $\mu$ M zugesetzt. Der Anteil der Phasen wurde durch Quantifizierung von je 5000 Zellkernen mittels Durchflusscytometrie ermittelt (n=3).**

Zellzyklus- phase [%]		Zeit nach der Aphidicolin-Entfernung [h]								
		0	2	$\Delta 2-0$	4	$\Delta 4-2$	6	8	11	$\Delta 11-8$
Kontrolle	G1	79±6	34±1		32±3		30±3	23±0,7	42±3	19
	S	13±5	54±3	41	25±0,7		14±2	22±5	19±4	
	G2	6±0,7	6±0,1		33±0,3	27	56±4	55±5	38±7	
+ Z	G1	67±1	32±0,3		28±0,3		27±4	22±0,8	27±0,2	5
	S	26±3	58±0,3	32	39±0,3		17±0,5	16±1	15±1	
	G2	6±0,8	6±0,4		28±2	22	56±3	61±0,6	58±1	
+ DHZ	G1	79±6	31±2		23±4		23±3	18±1	27±3	9
	S	14±4	59±3	45	32±6		18±1	15±0,3	14±3	
	G2	5±0,9	6±0,9		40±4	34	59±2	66±1	59±0,5	
+ IPA	G1	62±5	25±0,2		22±0,5		23±0,9	18±1	27±3	9
	S	27±5	63±2	36	34±4		16±0,1	17±4	13±0,1	
	G2	6±0,9	7±0,2		38±3	31	61±1	65±5	60±3	
+ ZR	G1	71±2	28±1		22±7		19±1	16±1	28±4	12
	S	18±0,6	59±0,9	41	32±2		17±0,3	14±0,3	13±0,8	
	G2	6±1	7±1		39±0,9	32	64±0,9	69±0,9	59±3	
+DHZR	G1	75±9	31±2		29±4		29±0,4	25±0,9	28±2	3
	S	17±8	57±0,8	40	32±0,7		16±0,3	12±1	13±3	
	G2	6±0,7	7±1		31±2	24	55±0,1	63±0,4	59±5	
+ IP	G1	71±2	31±0,9		27±1		23±0,8	19±0,2	26±3	7
	S	21±1	59±1	38	43±1		21±3	18±0,5	16±0,9	
	G2	5±0,8	6±0,2		23±7	17	55±2	63±0,6	58±3	

Interessanterweise wird der hemmende Effekt der verschiedenen Cytokinine durch die Vorbehandlung der BY-2 Zellen mit Lovastatin (Inhibitor der endogenen Cytokinin-Biosynthese) verstärkt. Inkubiert man die BY-2 Zellen während der Aphidicolin-Behandlung mit 10  $\mu\text{M}$  Lovastatin, so verzögert sich der unmittelbar der Subkultivierung folgende G1/S-Übergang in den Ansätzen mit Cytokinin, mit Ausnahme von IP und DHZR, um 0,5 – 1 h (Abb. 43).

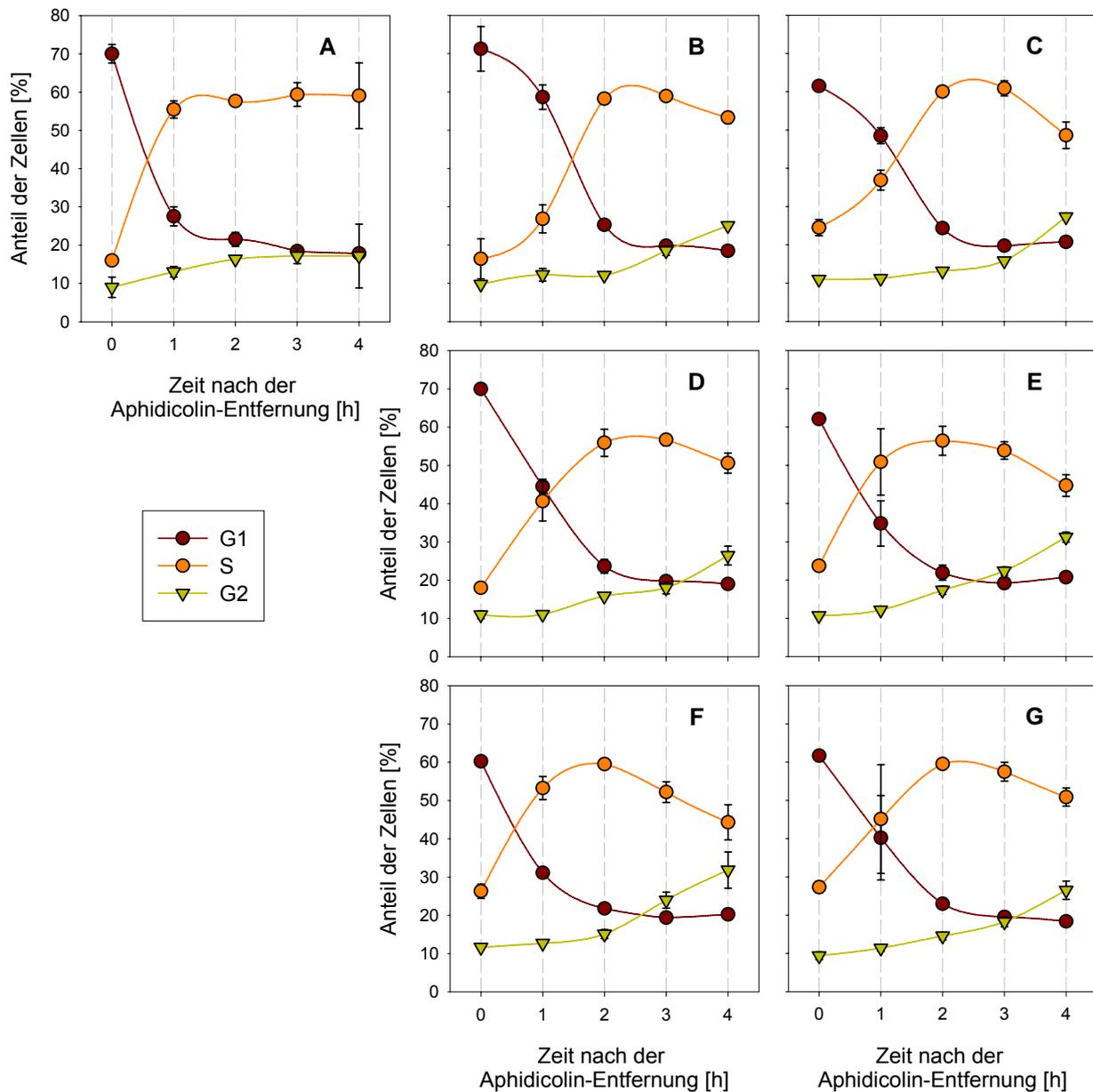
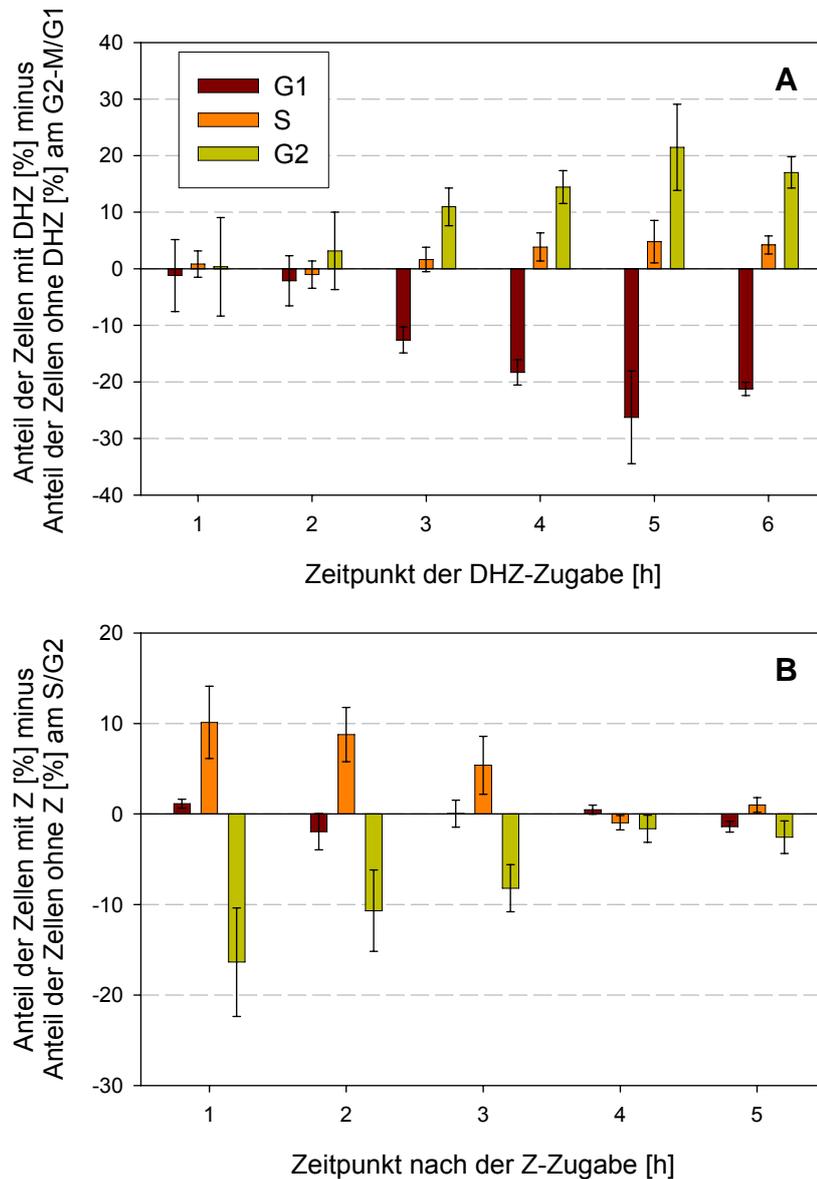


Abb. 43: Effekt verschiedener Cytokinine (je 6  $\mu\text{M}$  Endkonzentration) auf den Verlauf des Zellzyklus von mit Aphidicolin synchronisierten BY-2 Zellen, die 24 h mit Lovastatin (10  $\mu\text{M}$  Endkonzentration) vorbehandelt wurden. Kontrolle (A), mit Z (B), mit ZR (C), mit DHZ (D), mit DHZR (E), mit IP (F) und mit IPA (G). Der Anteil der Phasen wurde durch Quantifizierung von je 5000 Zellkernen mittels Durchflusscytometrie ermittelt.

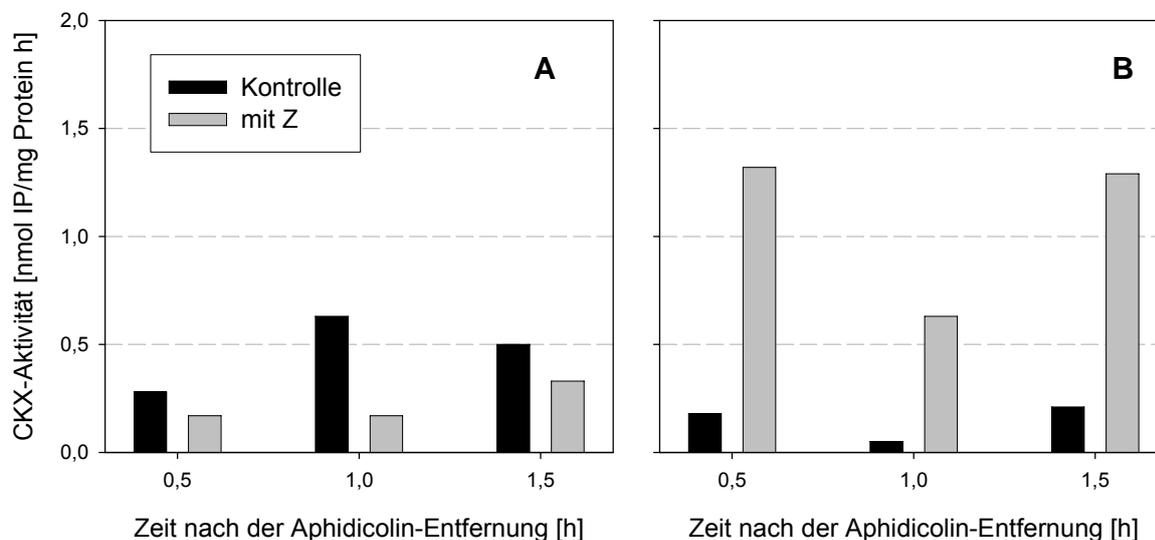
Die Wirkung von Z, als das mengenmäßig dominierende Cytokinin, und zum Vergleich die Wirkung von DHZ, wurde durch Variation des Zugabezeitpunktes innerhalb des Zellzyklus näher untersucht. Es stellte sich heraus, dass DHZ den stärksten hemmenden Effekt am G2-M/G1-Übergang und Z am S/G2-Übergang entfaltet, während die übrigen Übergänge zwischen den verschiedenen Zellzyklusphasen nur indirekt beeinflusst wurden (Abb. 44).



**Abb. 44: Zeitabhängiger Effekt von 6  $\mu$ M Endkonzentration DHZ auf den G2-M/G1-Übergang von mit Aphidicolin synchronisierten BY-2 Zellen (A) und von 6  $\mu$ M Endkonzentration Z auf den S/G2-Übergang (B). Der Effekt wurde aus der Differenz der Anteile an Zellen in den verschiedenen Zellzyklus-Phasen in Zellen mit und ohne zugesetztem Cytokinin ermittelt (n=3).**

Im Zusammenhang mit der Wirkung zugegebener Cytokinine ist die Reaktion der Cytokinin Oxidase/Dehydrogenase-Aktivität darauf von Bedeutung. Nach Zugabe von 6  $\mu$ M Z wurde festgestellt, dass sehr schnell – innerhalb von 30 Minuten – ein signifikanter Anstieg der CKX-

Aktivität in der Partikel-Fraktion stattfand (Abb. 45). Im gleichen Zeitraum sank die Aktivität in der löslichen Fraktion.



**Abb. 45: Veränderung der CKX-Aktivitäten in der (A) löslichen- und (B) Partikel-Fraktion in mit Aphidicolin synchronisierten BY-2 Zellen mit und ohne Z, welches in einer Endkonzentration von 6  $\mu$ M unmittelbar nach der Entfernung von Aphidicolin zugegeben wurde.**

Um die Bedeutung des potentiellen Cytokininsignals für den Ablauf der Zellteilung zu untersuchen mussten als nächstes Möglichkeiten zur Verminderung des endogenen Cytokininspiegels gefunden werden. Lovastatin hemmt die cytosolische Mevalonat-CoA-Reduktase und auf diese Weise den cytoplasmatischen Mevalonsäure-Biosyntheseweg, der auch den Isoprenrest für die Cytokinin-Biosynthese liefert. Bei der Untersuchung des Effektes von Lovastatin auf das endogene Cytokinin-Muster wird deutlich, dass bereits 10 Minuten nach Lovastatin-Zusatz die Menge an Z, ZRMP und IPA reduziert ist (Abb. 46). Die Z-Anreicherung bei 30 Minuten reduziert sich von 43 pmol/g FW auf 17 pmol/g FW und die Anreicherung bei 3 h von 20 pmol/g FW auf 9 pmol/g FW. Die Mengen zweier nicht näher identifizierbaren IP- und Z-Derivate vergrößerten sich hingegen durch die Behandlung mit Lovastatin.

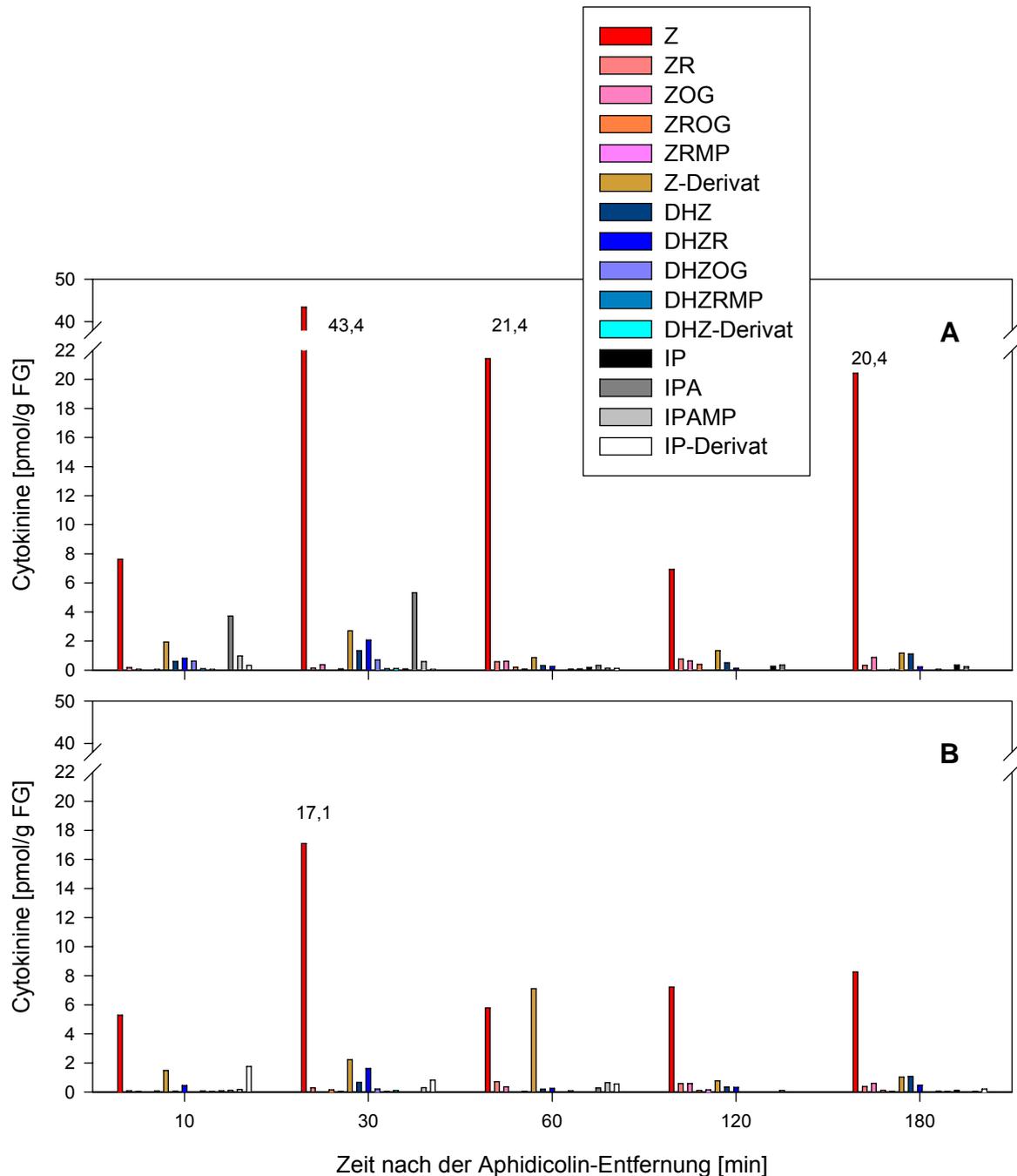
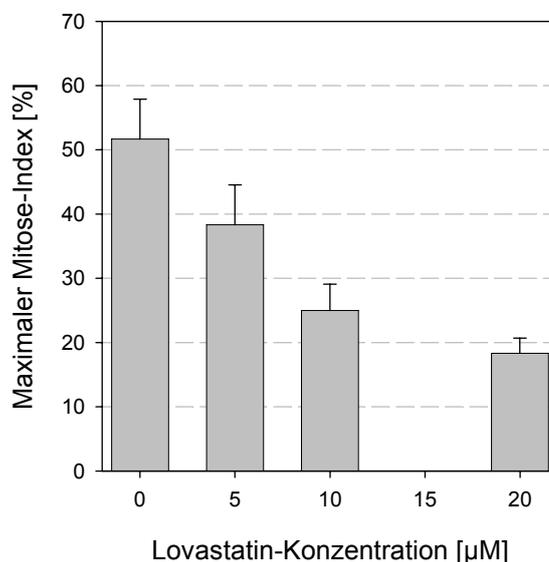


Abb. 46: Zeitkinetik des Effekts von Lovastatin auf die Cytokinin-Konzentrationen von mit Aphidicolin synchronisierten BY-2 Zellen. Kontrolle (A), mit 10 µM Lovastatin (B), welches unmittelbar nach Entfernung von Aphidicolin zugegeben wurde.

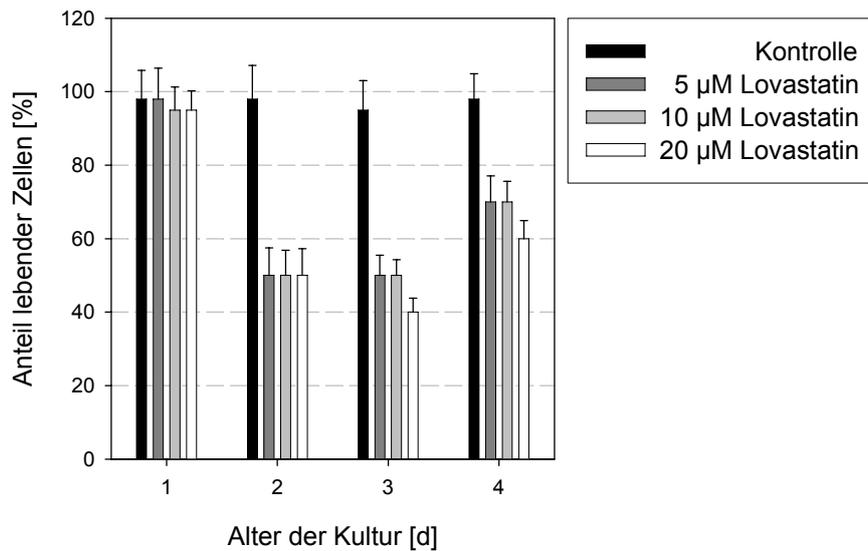
Z – *t*-Zeatin; ZR – Zeatinribosid; ZOG – Zeatin-O-Glukosid; ZROG – Zeatinribosid-O-Glukosid; ZRMP – Zeatinribosid-Nukleotid; DHZ – Dihydrozeatin; DHZR – Dihydrozeatinribosid; DHZOG – Dihydrozeatin-O-Glukosid; DHZRMP – Dihydrozeatin-Nukleotid; IP – Isopentenyladenin; IPA – Isopentenyladenosin; IPAMP – Isopentenyladenin-Nukleotid

In Folge der Lovastatin-Behandlung und damit verbundenen Verringerung des endogenen Cytokininspiegels wurde eine konzentrationsabhängige Verminderung der Teilungsaktivität beobachtet (Abb. 47). Auffällig ist dabei, dass selbst bei der höchsten verwendeten Konzentration von 20  $\mu\text{M}$  nicht alle Zellen beeinträchtigt werden – es gibt stets eine Population an Zellen, deren Teilung unverändert fortschreitet.

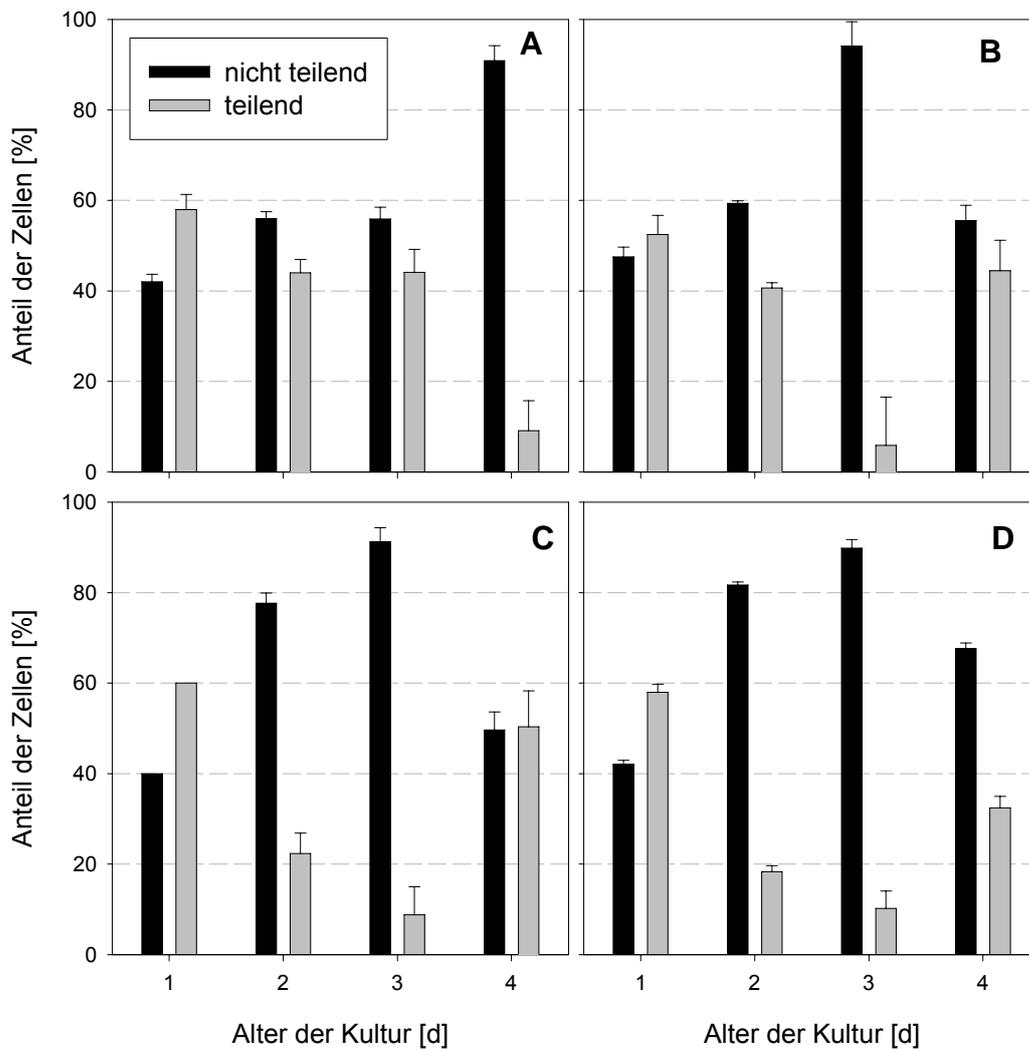


**Abb. 47: Maximaler Mitose-Index von mit Aphidicolin synchronisierten Zellen nach der Zugabe unterschiedlicher Lovastatin-Konzentrationen unmittelbar nach der Aphidicolin-Entfernung (n=3).**

Um zu überprüfen, ob bei einer längeren Inkubation mit Lovastatin eine vollständige Hemmung der Teilungsaktivität erreicht wird, wurden je 10 ml nicht synchronisierter Zellen in Medien mit verschiedenen Lovastatin-Konzentrationen subkultiviert. In diesen Kulturen wurden dann über vier Kulturtag hinweg die Vitalität und der Anteil sich teilender, bzw. sich nicht teilender Zellen erfasst. Dabei zeigte sich, dass der Anteil toter Zellen nach 48 h Inkubation mit Lovastatin, unabhängig von der verwendeten Konzentration auf 50 %, anstieg (Abb. 48). Ab 4. Kulturtag nahm aber der Anteil lebender Zellen wieder zu. Der Anteil sich teilender Zellen innerhalb der überlebenden Population wird durch Lovastatin nach 48 h konzentrationsabhängig vermindert, erhöhte sich aber ebenfalls ab dem 4. Kulturtag (Abb. 49).



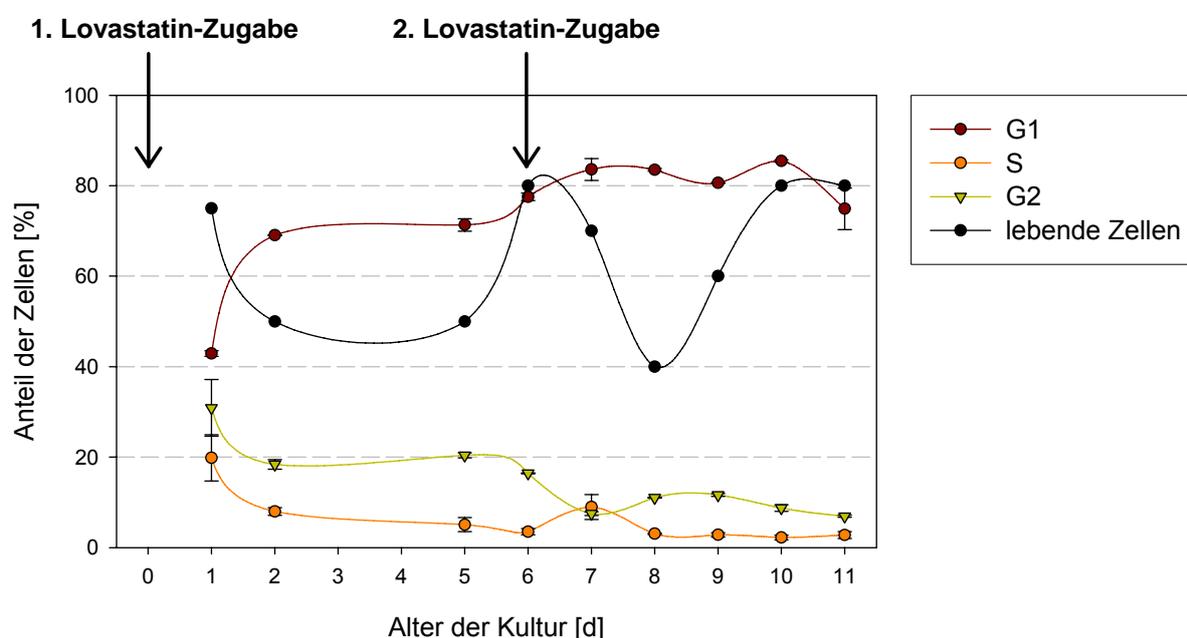
**Abb. 48: Einfluss der Lovastatin-Konzentration auf die Vitalität der Zellen im Verlauf der Kultivierung (n=3).**



**Abb. 49: Effekt verschiedener Lovastatin-Konzentrationen auf den Anteil sich teilender und nicht teilender Zellen. Kontrolle (A), 5 µM Endkonzentration Lovastatin (B), 10 µM Lovastatin (C), 20 µM Lovastatin (D). Der Anteil teilungsbereiter Zellen wurde über die Zunahme des G2-**

Anteils und der Anteil der sich nicht teilenden Zellen über den G1-Anteil nach 16 h Propyzamid-Behandlung durch Quantifizierung von je 5000 Zellkernen mittels Durchflusscytometrie ermittelt (n=3). Beide Anteile wurden auf die Lebendzellzahl bezogen.

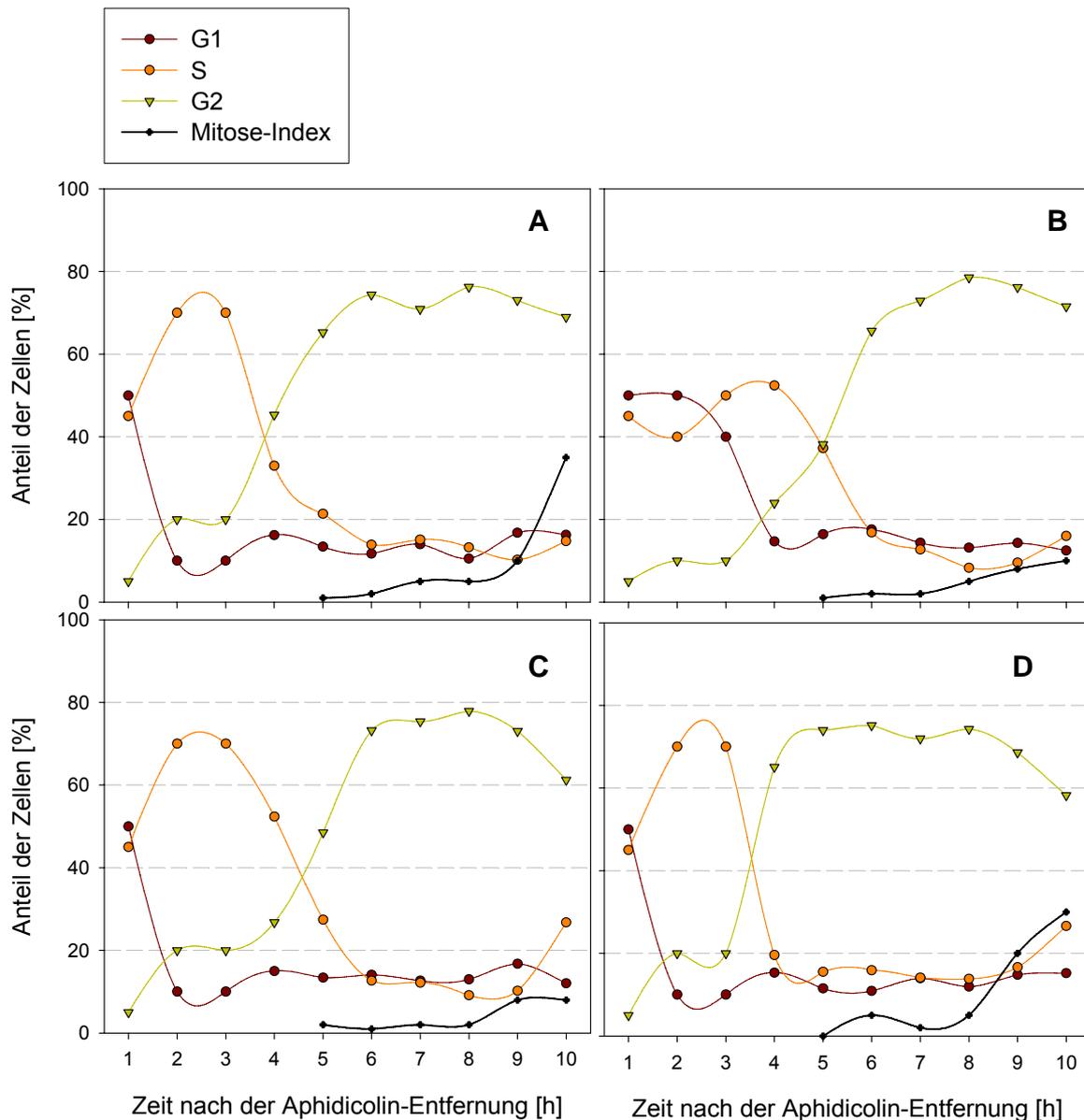
Versetzt man diese überlebenden Kulturen ein zweites Mal mit Lovastatin, so sterben wiederum etwa 50 % der Zellen ab. Die Erholung der überlebenden Population setzt jedoch schneller ein (Abb. 29). Darüber hinaus erkennt man vergleichbare Veränderungen der ersten und zweiten Behandlung des Anteils an Zellen in den verschiedenen Zellzyklus-Phasen. Mit jeder Behandlung steigt der Anteil an G1-Zellen zu Ungunsten des Anteils an G2-Zellen. Eine solche Veränderung weist auf eine Reduktion der Teilungsaktivität hin.



**Abb. 50:** Wirkung einer wiederholten Lovastatin-Applikation (10  $\mu$ M Endkonzentration an Tag 0 und 6) auf die Verteilung der Zellzyklus-Phasen und den Anteil lebender Zellen in nicht synchronisierten BY-2 Zellen im Verlauf der Kultivierung. Der Anteil der Zellen in den einzelnen Zellzyklus-Phasen wurde mittels Durchflusscytometrie durch Quantifizierung von je 5000 Zellkernen ermittelt (n=3).

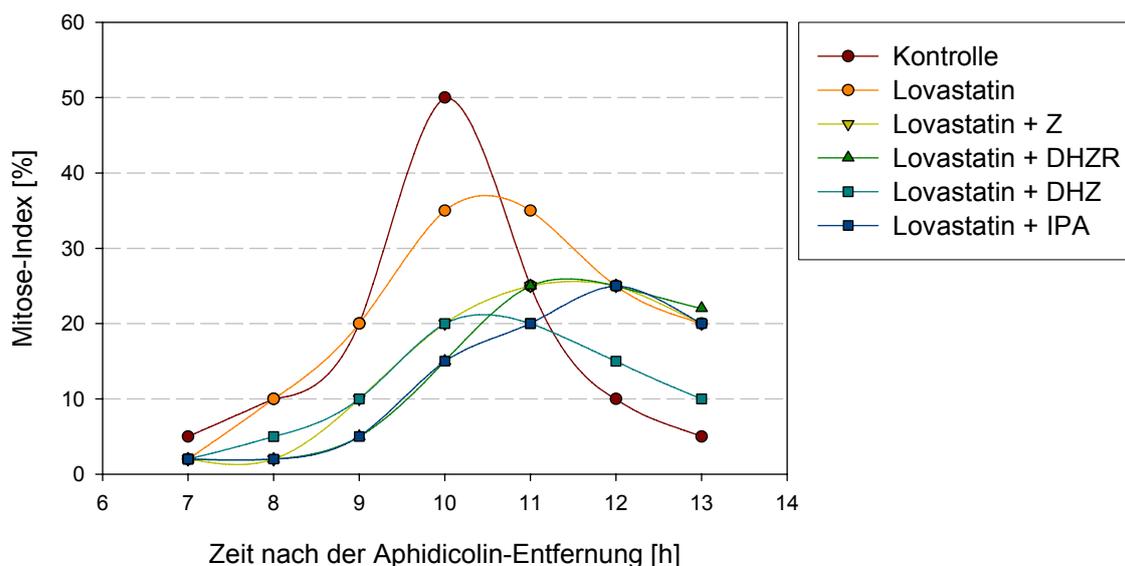
Da eine Konzentration von 20  $\mu$ M gegenüber 10  $\mu$ M keinen signifikant stärkeren Effekt auf die Teilungsfähigkeit der Zellen hatte, wurde in allen nachfolgenden Versuchen mit 10  $\mu$ M Lovastatin gearbeitet. Um die Wirkung eines reduzierten Cytokininspiegels auf den Zellzyklus genauer zu untersuchen, wurde Lovastatin zu unterschiedlichen Zeitpunkten zu mit Aphidicolin synchronisierten Zellen appliziert. Wie aus Abb. 51 B hervorgeht, bewirkt die Lovastatin-Zugabe unmittelbar nach der Entfernung des Aphidicolins eine Verzögerung des G1/S-Übergangs. Erfolgt die Zugabe von

Lovastatin dagegen während der frühen S-Phase, findet der S/G2-Übergang verzögert statt (Abb. 51 C). Beide Zugabe-Zeitpunkte bewirken einen verzögerten Start der Mitose, erkennbar am Verlauf des Mitose-Index. Gibt man allerdings Lovastatin am Ende der S-Phase zu, so beschleunigt sich der S/G2-Übergang und auch der Beginn der Mitose (Abb. 51 D). Die Wirkung von Lovastatin ist demnach abhängig vom Zeitpunkt der Zugabe.



**Abb. 51:** Einfluss des Zeitpunktes der Lovastatin-Applikation (je 10  $\mu$ M Endkonzentration) auf den Verlauf des Zellzyklus und den Mitose-Index von mit Aphidicolin synchronisierten BY-2 Zellen. Kontrolle (A), Zugabe bei 0 h (B), bei 2 h (C), bei 3 h (D). Die Anteile der G1-, S- und G2-Phasen wurden durch Quantifizierung von je 5000 Zellen mittels Durchflusszytometrie ermittelt.

Um eine eventuell spezifische Wirkung verschiedener Cytokinine am S/G2-Übergang verifizieren zu können, wurde zu Beginn der S-Phase Lovastatin zugegeben, um die endogene Cytokinin-Akkumulation am Ende der S-Phase zu unterbinden. Anschließend erfolgte in der Mitte der S-Phase die Zugabe verschiedener Cytokinine, um deren Effizienz hinsichtlich der Komplementierung der durch Lovastatin verursachten Hemmung des S/G2-Überganges zu überprüfen. Jedoch konnte keines der angebotenen Cytokinine (Z, ZR, DHZ, DHZR, IP, IPA) den hemmenden Effekt von Lovastatin auf den S/G2-Übergang ausgleichen. Die Hemmung der Mitose verstärkte sich sogar noch (Abb. 52).



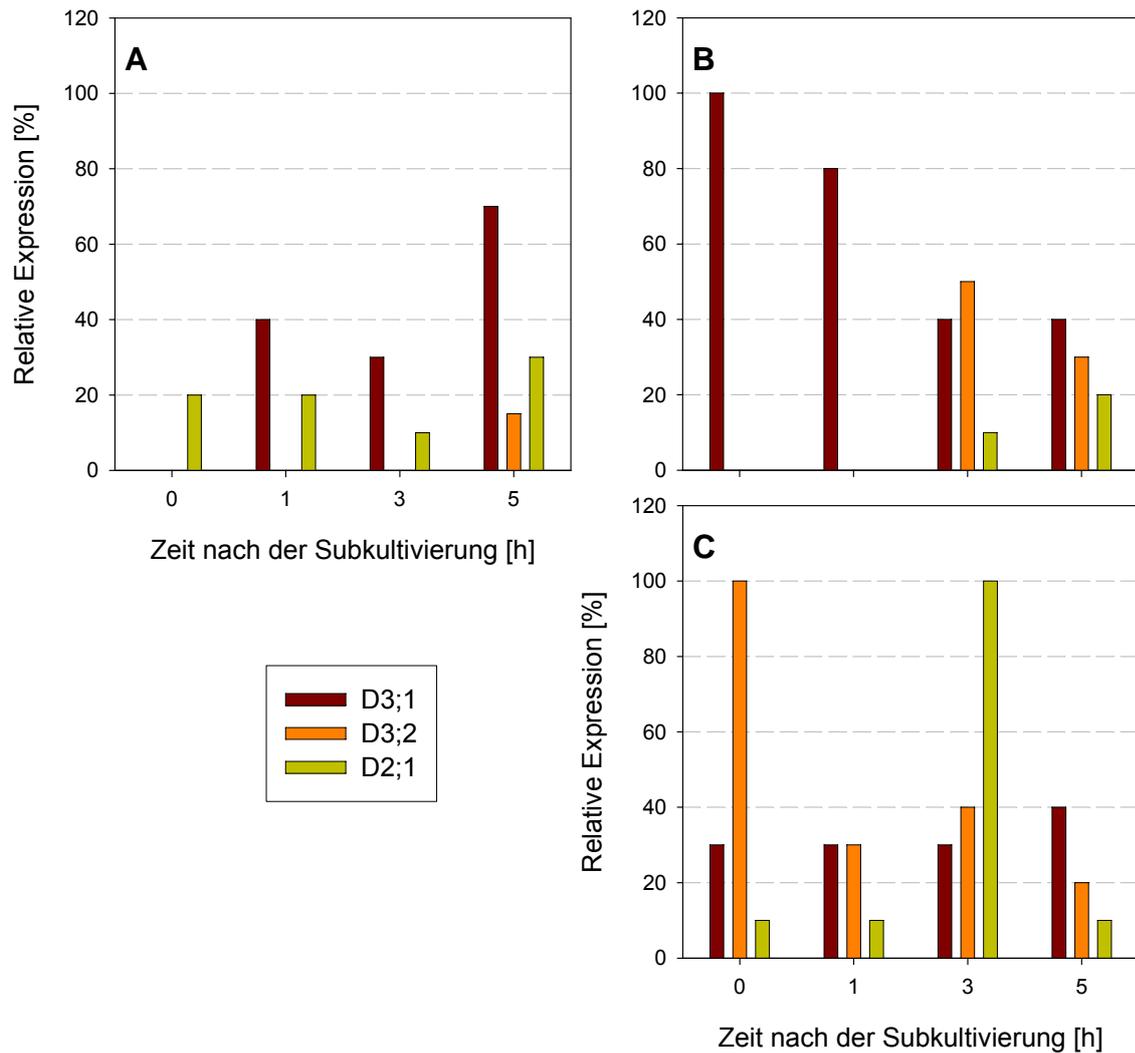
**Abb. 52: Mitose-Index von mit Aphidicolin synchronisierten BY-2 Zellen nach Zugabe von 10  $\mu\text{M}$  Lovastatin in der Mitte der S-Phase (2 h nach der Aphidicolin-Entfernung) und Zusatz von verschiedenen Cytokininen (je 6  $\mu\text{M}$  Endkonzentration) am Ende der S-Phase (2,5 h nach der Aphidicolin-Entfernung).**

Da durch die Verwendung von Lovastatin kein umfassender Einfluss auf den Zellzyklus erreicht werden konnte, wurde zusätzlich die Wirkung eines Anticytokinins (3-methyl-7-(3-methylbutylamino)pyrazolo[4,3-*d*]-pyrimidine) untersucht. Dieses Anticytokinin verursacht in Tabak-Kalluskulturen eine konzentrationsabhängige Hemmung des Wachstums, die durch Zugabe von Benzyladenin ausgeglichen werden kann (Hecht et al.; 1971). Die Applikation des Anticytokinin unmittelbar vor dem G1/S- und dem S/G2-Übergang von mit Aphidicolin synchronisierten BY-2 Zellen führte zur Hemmung dieser Übergänge. Diese waren allerdings nicht stärker als die Lovastatin-Effekte. Deshalb befinden sich die Untersuchungen im Anhang.

### **3.2.3.4 Einfluss des veränderten Cytokininsignals auf die Expression von Zellzyklus-Kontrollgenen**

Um die hemmenden Effekte von zusätzlichem Cytokinin und Lovastatin auf den Zellzyklus der BY-2 Zellen auf molekularer Ebene nachweisen zu können, wurde deren Effekt auf die Expression verschiedener Zellzyklus-Kontrollgene in subkultivierten Zellen der stationären Phase und in mit Aphidicolin synchronisierten Zellen untersucht. Die Expression der Gene wurde dabei durch semiquantitative RT-PCR verfolgt. Ziel dieses Teils der Untersuchungen war es, Cytokinin-sensitive Gene zu identifizieren und einen möglichen Zusammenhang zwischen der Veränderung des Cytokinin-Haushalts der Zellen und dem Expressions-Muster der Gene zu finden.

Zunächst wurde der Einfluss von Cytokinin und Lovastatin auf die Expression der drei D-Cycline in subkultivierten Zellen der stationären Phase überprüft (Abb. 54). Die Zugabe von Z bewirkt bei diesen Zellen, dass die Induktion der Expression der Cycline D3;1 und D3;2 deutlich früher und stärker einsetzt. Die Expression des Cyclin D2;1 hingegen wird abgeschwächt. Die Hemmung der endogenen Cytokininsynthese durch Lovastatin unterdrückt die Induktion des Cyclins D3;1, fördert allerdings die transiente Expression der Cycline D3;2 und D2;1.



**Abb. 53: Einfluss des Cytokininsignals auf die relative Expression (bezogen auf die stärkste Bande innerhalb des Versuches) der D-Cycline nach der Subkultivierung von unsynchronisierten Zellen der stationären Phase in Medium mit Kontrolle (A), mit 6 μM Endkonzentration Z (B), mit 10 μM Endkonzentration Lovastatin (C), welche zu Beginn der Subkultivierung zugesetzt wurden. Die Expression wurde mittels semiquantitativer RT-PCR ermittelt. Die Quantifizierung der Banden erfolgte mit Image Master 1D Gel Analysis.**

Im Anschluss daran wurden die Effekte von externem Cytokinin und Lovastatin auf die Expression der Cycline in mit Aphidicolin synchronisierten Zellen untersucht. In Abb. 54 wird veranschaulicht, dass die Expression aller untersuchten Cycline auf veränderte Cytokinin-Bedingungen reagierte. Besonders auffällig ist die Intensivierung der Expression des Cyclins D3;1 durch Anhebung des Z-Spiegels. Eine frühere Expression des Cyclins D3;2 ist ebenfalls eindeutig. Dagegen reagierte das Cyclin A3;2 Gen höchstens geringfügig auf den Zusatz von Z. Gegensätzlich verhielt sich die Transkription des Cyclins D2;1, dessen abgeschwächte Expression allerdings länger andauerte. Die Zugabe bewirkte eine dramatische Hemmung der Cyclin D3;1 Expression, wobei dieser Effekt durch

den Zusatz von Z revertiert werden konnte. Die Expression des Cyclin D3;2 erhöhte sich insgesamt nach der Lovastatin-Zugabe, während sich die Expression des Cyclins A3;2 stark verringerte. Die Cyclin D2;1 Transkription erhöhte sich und blieb insgesamt länger erhalten. Die vom Lovastatin verursachten Effekte auf die Expression der Cycline konnten durch den Zusatz von Z annähernd vollständig ausgeglichen werden.

Zusammenfassend bedeutet dies, dass der koordinierte Ablauf, bzw. der Wechsel der phasenspezifischen Transkript-Muster der Cycline sowohl durch die Zugabe von Z, als auch von Lovastatin empfindlich verändert wurden. Als Cytokinin-sensitiv können damit alle vier untersuchten Cycline eingestuft werden. Die ebenfalls untersuchten Kinasen Cdk2a und CdkB1-1 reagierten weder auf ein verstärktes, noch ein reduziertes Cytokinin-Signal mit einer Veränderung in der Expression.

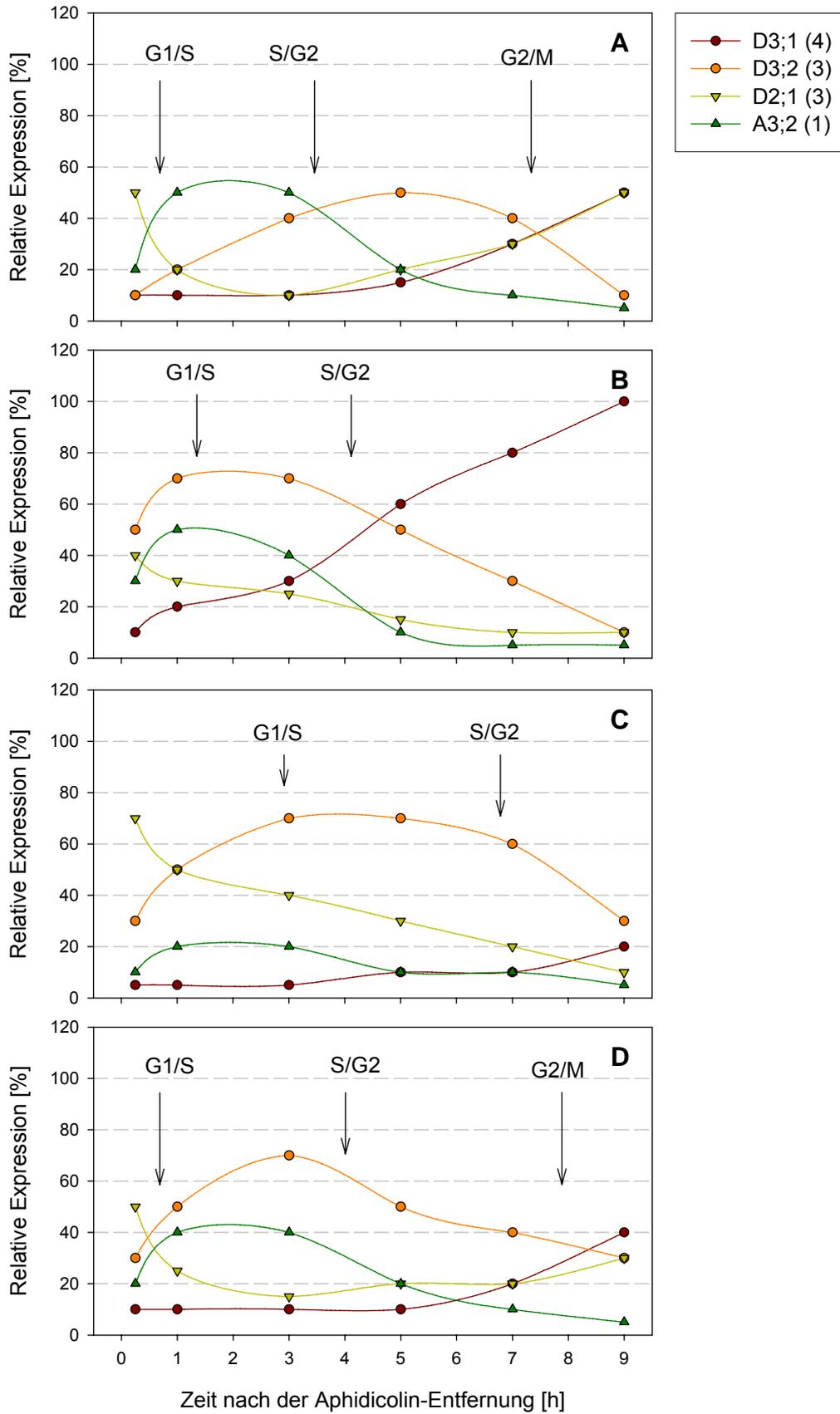


Abb. 54: Verlauf der Expression der Cycline in mit Aphidicolin synchronisierten Zellen bei verändertem Cytokininsignal. Kontrolle (A), mit 6 μM Endkonzentration Z (B), mit 10 μM

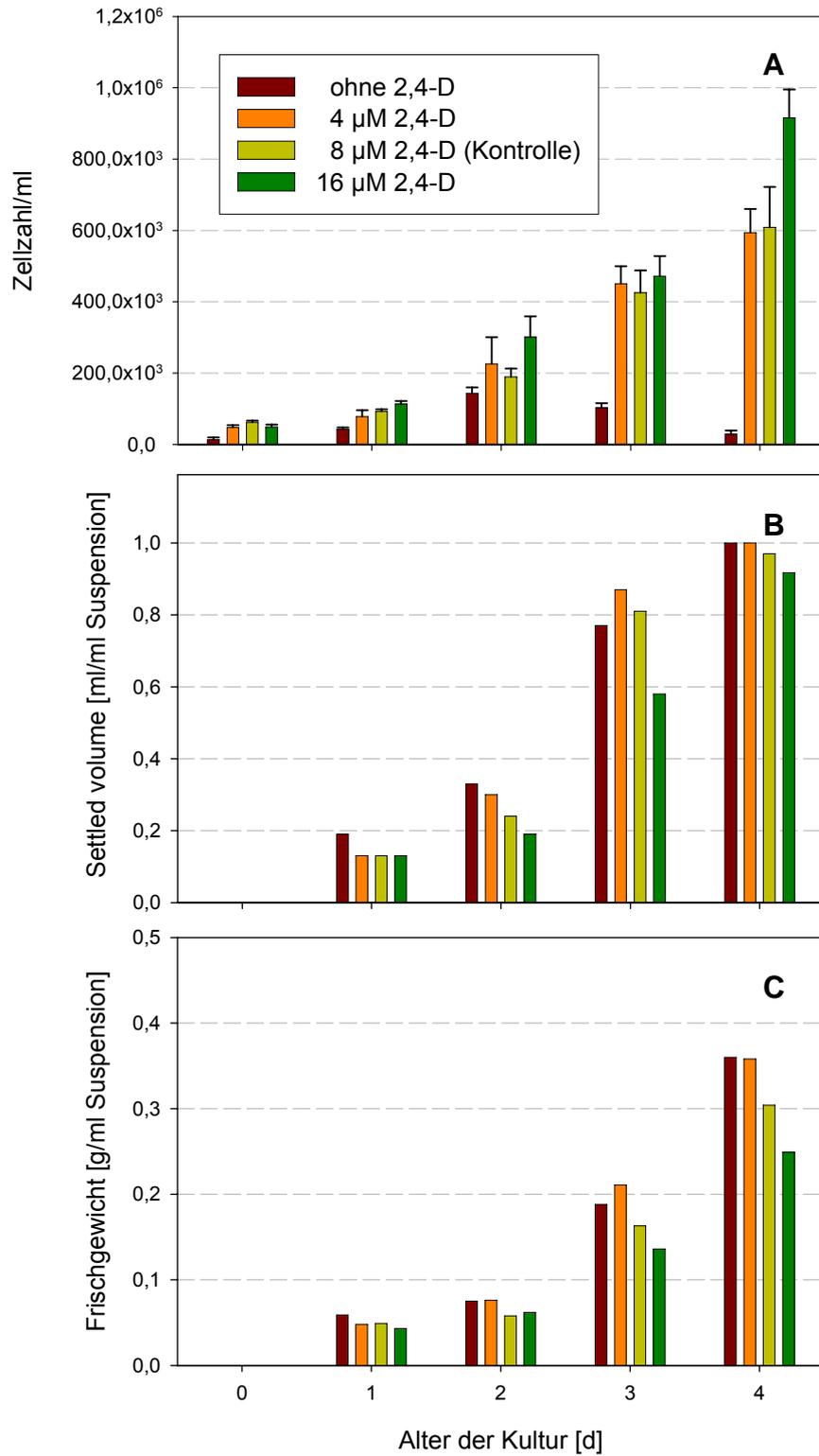
**Endkonzentration Lovastatin (C) und mit 10  $\mu$ M Lovastatin und 6  $\mu$ M Z (D), die direkt nach der Aphidicolin-Entfernung zugesetzt wurden. Die Expression wurde mittels semiquantitativer RT-PCR ermittelt. Die Quantifizierung der Banden erfolgte mit Image Master 1D Gel Analysis. In Klammern ist die Anzahl identischer Parallelversuche angegeben, die durchgeführt wurden.**

### **3.2.4 Charakterisierung des Auxinsignals als regulatorisches Signal im Zellzyklus der BY-2 Zellen**

Neben dem Zucker- und Cytokinin- stellt das Auxinsignal den dritten wichtigen Parameter dar, dessen Bedeutung bei der Regulation der Zellteilung in dieser Arbeit untersucht wurde.

#### **3.2.4.1 Variation des Auxinangebots im Medium und Auswirkungen auf die Zellteilung**

Die BY-2 Zellen erhielten Auxin in Form von 2,4-D im Medium, dessen Angebot auf diese Weise leicht verändert werden konnte. Das Fehlen von 2,4-D im Medium beeinflusste die Zellteilung zunächst kaum, erst ab dem zweiten Kulturtag ist keine Zunahme der Zellzahl mehr zu verzeichnen (Abb. 55 A). Trotz der geringeren Zellzahl bewirkt das Fehlen von 2,4-D keine nennenswerte Veränderung des „settled volume“ und des Frischgewichtes der Zellen (Abb. 55 C). Diese Tatsache lässt sich nur durch eine enorme Volumenzunahme der Einzelzelle erklären. Die Verdopplung der 2,4-D Menge im Medium führte zu einer geringfügig schnelleren Entwicklung der Zellzahl, bei allerdings deutlich geringerem „settled volume“ und Frischgewicht (Abb. 55 B).



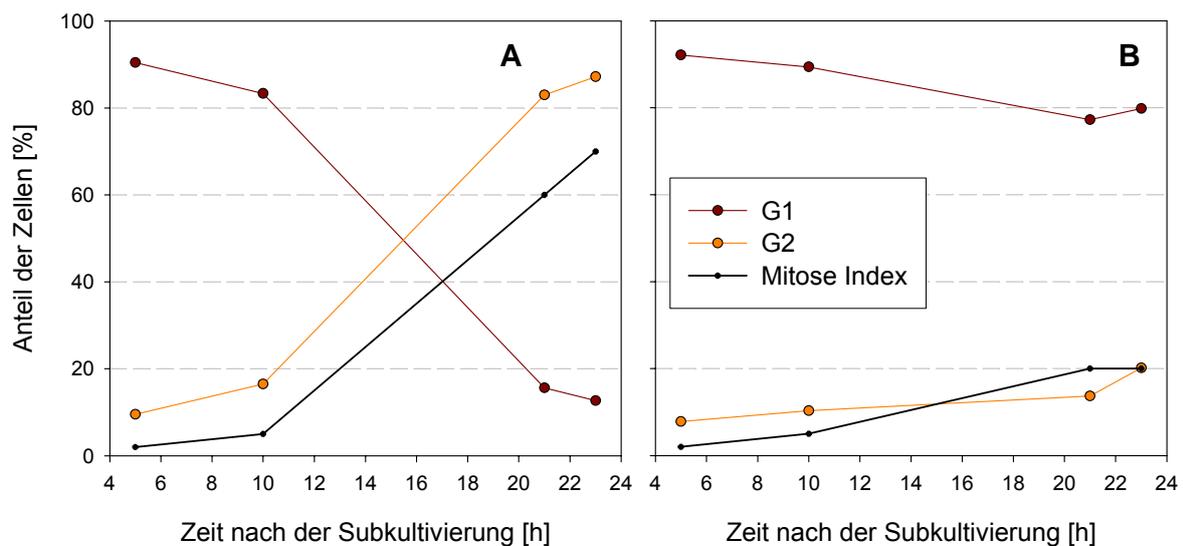
**Abb. 55:** Effekt verschiedener 2,4-D Mengen im Medium auf die Entwicklung der Zellzahl (n=3) (A), das „settled volume“ (B) und des Frischgewichtes (C).

Eine zu geringe 2,4-D Menge führte im Verlauf der Kultivierung auch zu morphologischen Veränderungen der Zellen. Das vermehrte Auftreten von schraubenförmigen oder lang gestreckten, voluminösen Zellen wurde beobachtet (Abb. 56).



**Abb. 56: Morphologie von Zellen einer 4 Tage alten Kultur. Kontrolle (A), ohne 2,4-D (B). Der Balken entspricht 100 µm.**

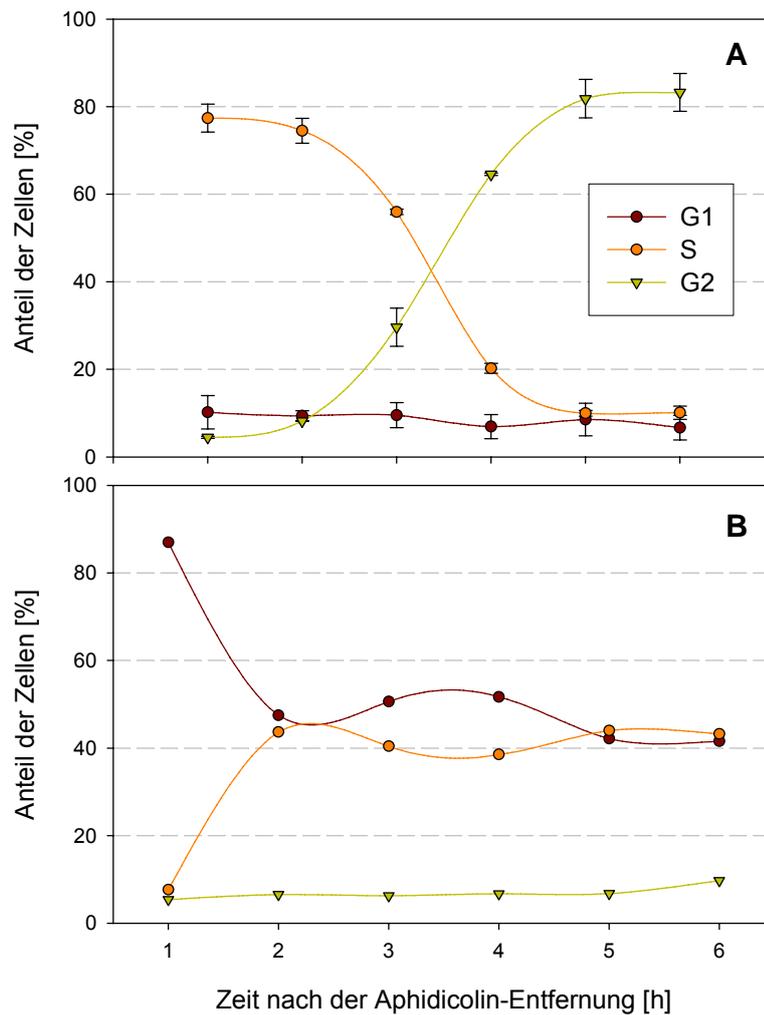
Die Auswirkung von fehlendem 2,4-D auf den Anteil teilungsfähiger Zellen wird in Abb. 57 dargestellt. Im Unterschied zur Kontrolle, in der innerhalb von 22 h etwa 70 % der Zellen, von der G1-Phase ausgehend, bis zur Mitose gelangen, sind es bei fehlendem 2,4-D im Medium nur 20 %. Sichtbar wird der Anteil durch die Zugabe von Propyzamid zu den Zellen, wodurch ein Arrest des Zellzyklus' in der Mitose verursacht wird. In Folge dieses Arrests akkumulieren sich teilende Zellen nach Quantifizierung mittels Durchflusszytometrie in der G2-Phase, während sich der Anteil an G1-Zellen vermindert. Eine derartige Akkumulation, dessen Ausmaß zur Ermittlung des Anteils sich teilender Zellen verwendet werden kann, lässt sich auch am Verlauf des Mitose-Index beobachten.



**Abb. 57: Einfluss von fehlendem 2,4-D im Medium auf den Anteil an G1- und G2-Phasen und den Mitose-Index. Die Anteile der G1-, und G2-Phasen wurden durch Quantifizierung von je**

**5000 Zellen mittels Durchflusszytometrie ermittelt. Kontrolle (A), ohne 2,4-D (B). Durch die Zugabe von Propyzamid wurden die Zellen in der Mitose arretiert. Die Zunahme des G2-Anteils, bzw. des Mitose-Index repräsentiert den Anteil sich teilender Zellen und der Anteil an G1-Zellen den Anteil sich nicht teilender Zellen.**

Betrachtet man den Zellzyklus von mit Aphidicolin synchronisierten Zellen in Medien mit und ohne 2,4-D bestätigt sich, dass ein großer Teil der Zellen - etwa 50 % - nicht mehr zur Teilung befähigt ist und in der G1-Phase verbleibt (Abb. 58). Die übrigen 50 % der Zellen treten zwar in die S-Phase über, scheinen dort allerdings zu verbleiben.

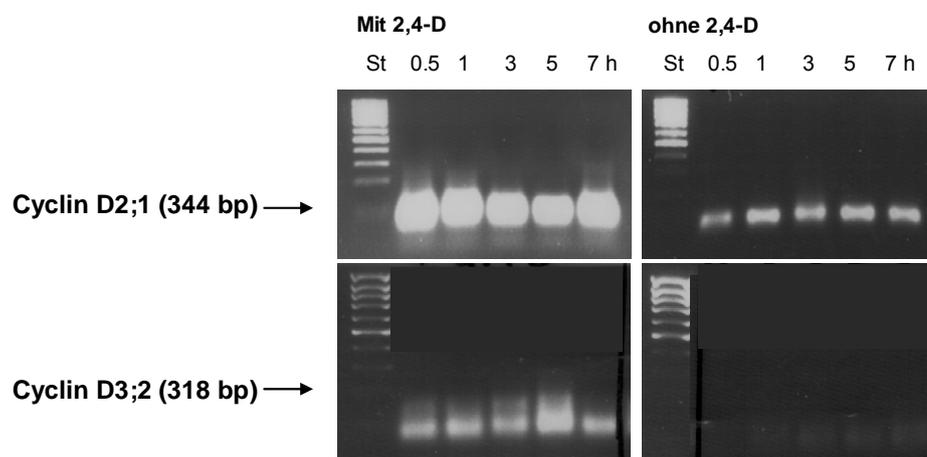


**Abb. 58: Einfluss des Fehlens von 2,4-D im Medium auf den Verlauf des S/G2-Übergangs von mit Aphidicolin synchronisierten BY-2 Zellen. Kontrolle (A), ohne 2,4-D (B). Die Anteile der G1-, S- und G2-Phasen wurden durch Quantifizierung von je 5000 Zellen mittels Durchflusszytometrie ermittelt.**

Der Versuch, 2,4-D durch IES vollständig oder teilweise zu ersetzen, gelang nicht. Die Zellen starben in den ersten 24 h nach Zugabe von 0,1  $\mu\text{M}$  IES ab.

### 3.2.4.2 Einfluss des veränderten Auxinsignals auf die Expression von Zellzyklus-Kontrollgenen

Die im vorangegangenen Kapitel erlangten Nachweise ergaben, dass eine optimale Menge an 2,4-D im Medium eine essentielle Voraussetzung für das Wachstum der Zellkultur darstellt. Weniger als 8  $\mu\text{M}$  2,4-D führt zum Verlust der Teilungsfähigkeit und zur Differenzierung der BY-2 Zellen. Das warf die Frage auf, ob nach der Subkultivierung von Zellen in auxinfreiem Medium Zellzyklus-Kontrollgene induziert werden könnten. Es zeigte sich, dass bei fehlendem 2,4-D die Expression von Cyclin D3;2 nicht und die von Cyclin D2;1 nur sehr schwach stattfand (Abb. 59).



**Abb. 59:** Expression der Cycline D2;1 und D3;2 in mit Aphidicolin synchronisierten BY-2 Zellen, die in Medium mit und ohne 2,4-D übertragen wurden. Die Expression wurde mittels semiquantitativer RT-PCR ermittelt. St – DNA-Standard

### 3.2.5 Die Vernetzung der die Zellteilung regulierenden Signale

Die Interaktion der den Zellzyklus regulierenden Zucker- und Hormonsignalen könnte auf verschiedenen Ebenen stattfinden. Zum einen wäre eine gegenseitige Beeinflussung auf der Ebene der Signal-Perzeption vorstellbar. Zum anderen könnte die Verknüpfung auf der Ebene der Transkription von Zellzyklus-Kontrollgenen, beispielsweise der Cycline stattfinden.

Um die Signalverknüpfung und deren Konsequenz auf die Zellteilung zu beschreiben, soll das Experiment, welches in Abb. 26 vorgestellt wurde, noch einmal unter einem anderen Gesichtspunkt betrachtet werden. Möglicherweise beeinflusst die Kombinationen von Zucker-, Cytokinin- und Auxinsignalen die gegenseitige Wirkung aufeinander. Interessant ist, ob der Effekt eines Signals sich durch ein anderes verändert. Hierfür wurden die in diesem Versuch ermittelten Anteile sich teilender

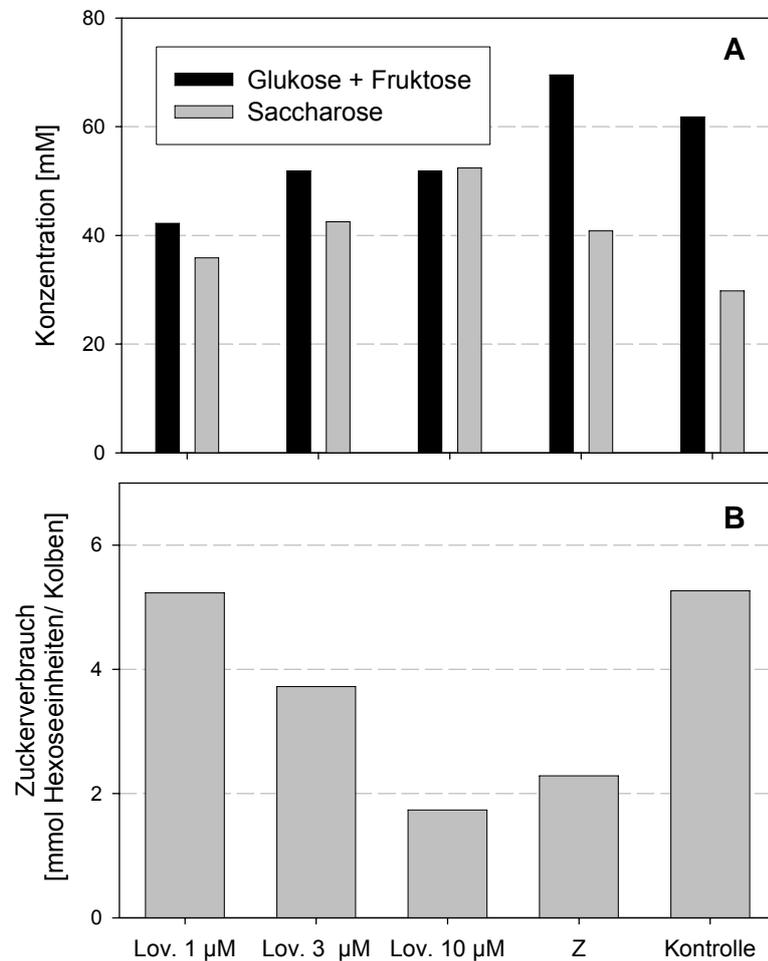
Zellen vergleichend betrachtet (Tab. 15). Mittels Überimpfen in frisches Medium wurde in etwa 4 % der Zellen die Teilung induziert. In Medium mit Saccharose teilten sich immerhin 72 % der Zellen. 14 % der Zellen teilten sich bei der Subkultivierung in Medium mit 2,4-D. Medium mit Z löste in 6 % der Zellen Teilung aus, der Zusatz von Cytokinin hatte demnach keinen zusätzlichen teilungsfördernden Effekt. Kombiniert man im Medium Saccharose und 2,4-D, so summiert sich der Anteil teilender Zellen auf 83 %. Demnach scheint es bei dieser Kombination keine synergistischen, bzw. antagonistischen Effekte zu geben. Kombiniert man allerdings Saccharose und Z so kommt der hemmende Effekt von Z zum Tragen – es teilen sich nur 59 % der Zellen. Dieser hemmende Effekt findet sich im vergleichbaren Ausmaß bei zusätzlichem Vorhandensein von 2,4-D. Z wirkt sogar dann hemmend auf den Zellzyklus, wenn im Medium nur 2,4-D vorhanden ist. Dies bedeutet im Ergebnis eine Verknüpfung der Cytokinin- und Auxin-Effekte, sowie der Cytokinin- und Zucker-Effekte hin.

**Tab. 15: Anteil sich teilender Zellen in subkultivierten 9 Tage alten Zellen. Die Medien enthielten Saccharose, 2,4-D und Z in verschiedenen Kombinationen. Die Betrachtung bezieht sich auf einen Zeitraum von 21,5 h.**

Saccharose	2,4-D	<i>t</i> -Zeatin	Anteil sich teilender Zellen [%]
-	-	-	4,2 ± 1,4
+	-	-	71,6 ± 2,2
-	+	-	14,4 ± 1
-	-	+	6 ± 0,9
+	+	-	82,6 ± 2 (Kontrolle)
+	-	+	59 ± 0,2
+	+	+	73 ± 1,8
-	+	+	11,3 ± 0,5

Eine Möglichkeit der Verknüpfung der Effekte auf der Ebene der Signalentstehung besteht darin, dass die Hormone die Zuckeraufnahme und Verfügbarkeit beeinflussen könnten. Hierfür gibt es bisher nur einen Hinweis. Die Expression der extrazellulären Invertase in *Chenopodium* Zellen wird durch Cytokinin erhöht (Roitsch & Gonzales; 2004). Um eine solche Interaktion zwischen Invertase und Cytokinin in BY-2 Zellen nachzuweisen, mussten indirekte Wege gesucht werden, weil das entsprechende Gen in BY-2 Zellen noch unbekannt ist. Deshalb wurden die Konzentrationen an Monosacchariden (Glukose und Fruktose) und Saccharose im Medium von Zellen bestimmt, deren Cytokinin-Haushalt durch Zusatz von Z, bzw. Lovastatin beeinflusst wurde. Einerseits kann an Hand der verschwindenden Menge an Saccharose die Invertase-Aktivität miteinander verglichen werden. Anderserseits ermöglicht, die Bilanz aus gespaltener Saccharose und im Medium vorhandenen Monosacchariden, die Berechnung der aufgenommenen Zuckermenge. In Abb. 60 wird aufgezeigt,

wie durch die Verringerung des endogenen Cytokininspiegels mit Lovastatin konzentrationsabhängig weniger Saccharose gespalten wird. Ebenfalls vermindert sich die Menge an metabolisierten Monosacchariden. Die Zugabe von Z beeinträchtigt offensichtlich ebenso die Invertaseaktivität und den Verbrauch an Kohlenhydraten.



**Abb. 60: Zucker-Konzentrationen im Medium (A) und Zucker-Verbrauch (B) von BY-2 Zellen, deren Medium verschiedene Lovastatin-Mengen (Endkonzentrationen 1; 5; 10  $\mu$ M), bzw. Z (Endkonzentration 1  $\mu$ M) zugesetzt wurden. Die Analysen wurden 2 Tage nach der Subkultivierung der Zellen durchgeführt.**

Ein eindeutiger „cross-talk“ der Zucker- und Hormonsignale findet auf der Ebene der Zellzyklus-Kontrollgene statt. In Tab. 16 sind die bereits in den vorangegangenen Kapiteln näher beschriebenen Regulationen der untersuchten Gene zusammengefasst. Es wird deutlich, dass alle drei untersuchten Signale – Zucker, Auxin und Cytokinin – die Expression der Zellzyklus-Kontrollgene beeinflussen. Erwartungsgemäß reagiert nur die Cyclin-Expression auf Veränderungen dieser Signale, hingegen nicht die Expression der beiden untersuchten Cdk. Vergleicht man die Effekte des Zucker- und Cytokininsignals, wird verständlich, dass es sowohl Gene gibt, die auf beide Signale positiv reagieren,

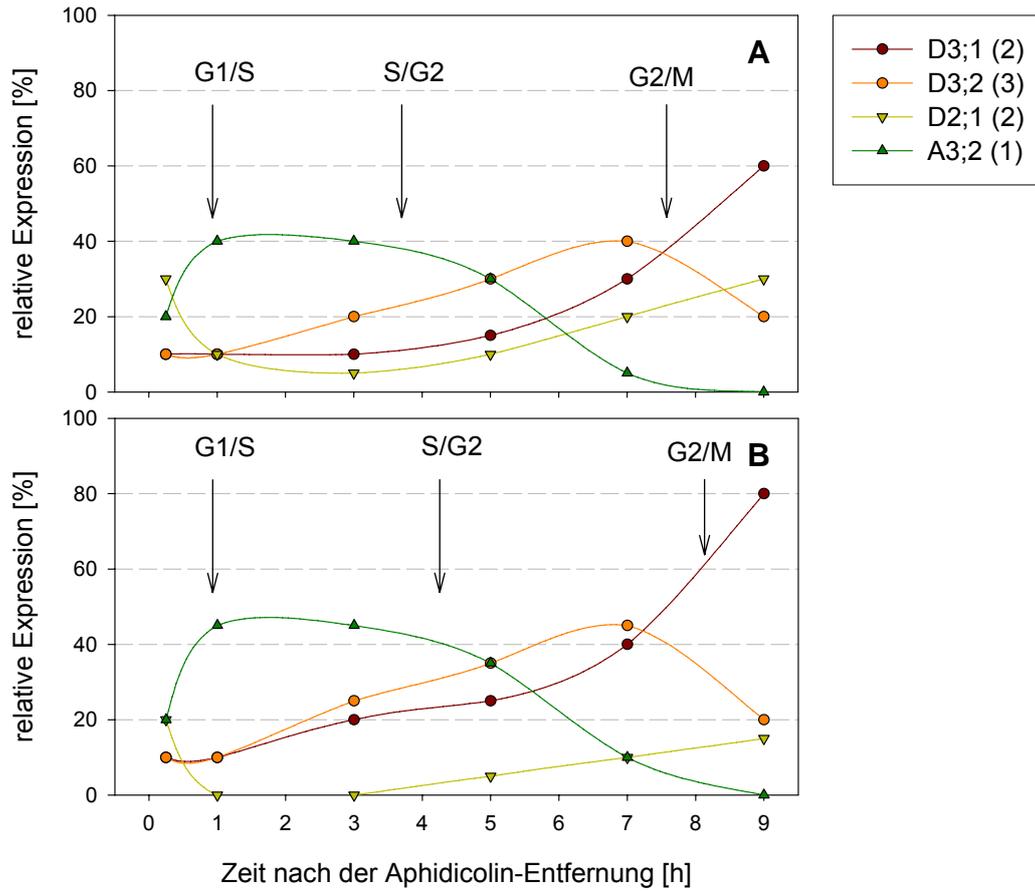
wie beispielsweise das Cyclin D3;2. Ebenso gibt es gegensätzlich regulierte Gene, wie z. B. das Cyclin D2;1.

**Tab. 16: Zusammenfassung der festgestellten Einflüsse der Zucker-, Cytokinin- und Auxinsignale auf die Expression der untersuchten Zellzyklus-Kontrollgene.**

-- negativer Einfluss; + – positiver Einfluss; k.E. – kein Einfluss; n.b. – nicht bestimmt

	Zucker	Cytokinin	Auxin
<b>D2;1</b>	+	-	+
<b>D3;1</b>	-	+	n.b.
<b>D3;2</b>	+	+	+
<b>A3;2</b>	+	+	n.b.
<b>B1;2</b>	+	n.b.	n.b.
<b>Cdk2a</b>	k.E.	k.E.	n.b.
<b>CdkB1-1</b>	k.E.	k.E.	n.b.

Um mehr über die Priorität der Signale bei der Regulation der Expression der Zellzyklus-Kontrollgene zu erfahren, wurde die Expression der Gene bei einer Kombination eines negativen Zuckersignals und eines positiven Cytokininsignals untersucht. Aus Abb. 61 geht hervor, dass der positive Einfluss von Cytokinin auf die Expression von Cyclin D3;1, bei fehlendem Zucker, noch verstärkt wurde. Die ohnehin negativen Einflüsse des fehlenden Zuckers und von Cytokinin auf die Expression von D2;1 kummulierten sich. Bei den Cyclinen D3;2 und A3;2 ergab sich kein deutlicher Unterschied zwischen beiden Experimenten. Konsequenz dieser veränderten Cyclin-Expression auf Ebene des Zellzyklus ist eine minimale zusätzliche Verzögerung.



**Abb. 61:** Verlauf der Expression der Cycline in mit Aphidicolin synchronisierten BY-2 Zellen. ohne Zucker (A), ohne Zucker, aber mit 6 µM Z (B), welches direkt nach der Aphidicolin-Entfernung zugesetzt wurde. Die Expression wurde mittels semiquantitativer RT-PCR ermittelt. Die Quantifizierung der Banden erfolgte mit Image Master 1D Gel Analysis. In Klammern ist die Anzahl identischer Parallelversuche angegeben, welche durchgeführt wurden.

## 4 Diskussion

### 4.1 Charakterisierung der Tabak BY-2 Zellkultur

#### 4.1.1 Tabak BY-2 Zellen – eine besonders schnell wachsende pflanzliche Zellkultur

Die Abfolge der Entwicklungsstufen der BY-2 Zellen im Verlauf der Kultivierung (Abb. 21) entsprechen der typischen Abfolge der Entwicklung von Zellkulturen. Nach der Subkultivierung der Zellen in frischem Medium beginnt die Entwicklung mit einer Initiationsphase oder *lag*-Phase. In dieser Zeit erfolgt die Anpassung an das Kulturmedium und die Vorbereitung auf die Teilung. Die Länge der *lag*-Phase ist abhängig von der Menge an überimpften Zellen, je kleiner das Inokulum, desto länger dauert die *lag*-Phase (Abb. 25). Diese Tatsache zeigt, dass für die Zellteilung ein stofflicher, bzw. informativer Austausch zwischen den Zellen, die so genannte Konditionierung notwendig ist. Nach der *lag*-Phase, folgt die Teilungsphase, in der die Vermehrung der Zellen stattfindet. Im Unterschied zum bakteriellen Wachstumsverhalten, bei dem die Teilung fast ausschließlich exponentiell abläuft, findet ein solches exponentielles Wachstum bei pflanzlichen Zellkulturen in der Regel nur zeitlich begrenzt am Beginn der Teilungsphase statt (Bhojwani & Razdan; 1983). Ursache dafür ist die Bildung von Mikrokalii, wodurch eine optimale Nährstoffversorgung nur für die in der Peripherie liegenden Zellen gewährleistet ist. Betrachtet man das Teilungsverhalten der BY-2 Zellen (Abb. 21), wird deutlich, dass während der gesamten Teilungsphase exponentielles Wachstum stattfindet. Das Teilungsverhalten der BY-2 Zellen ist demnach ungewöhnlich für pflanzliche Zellkulturen. Ein wichtiger Grund für dieses Verhalten ist die kaum vorhandene Bildung von Mikrokalii – die Mehrheit der Zellen hat optimalen Kontakt mit dem Nährmedium (Abb. 21). Die hohe Teilungsaktivität spiegelt sich auch in der relativen Teilungsrate wieder, deren höchste Werte mit 0,7 – 0,8 zwischen dem 4. und 7. Kulturtag, also während der gesamten Teilungsphase, gemessen wurden (Abb. 20). Im Gegensatz dazu findet man vergleichbare Teilungsraten bei *Arabidopsis*-Zellkulturen nur unmittelbar am Übergang zwischen *lag*-Phase und Teilungsphase (Menges & Murray; 2002). Damit zeichnen sich die BY-2 Zellkulturen durch ein besonders starkes Wachstum aus. Innerhalb von 7 Tagen Kultivierung vermehrt sich die Zellzahl um das 70- bis 80-fache. Eine hohe Zellteilungsrate ist die Grundvoraussetzung für eine gute Synchronisierbarkeit der Zellen (Nagata et al.; 1992). Die hier verwendeten BY-2 Zellen erreichen nicht ganz das von Nagata beschriebene Wachstum von einer 80- bis 100-fachen Zunahme der Zellzahl pro Woche (Nagata & Kumagai; 1999). Da es allerdings ohnehin trotz Kultivierung unter standardisierten Bedingungen gewisse Schwankungen des Wachstums gibt, kommt das durchschnittliche Wachstum der hier verwendeten Linie mit 70- bis 80-facher Vermehrung dem Optimum sehr nahe. Die Teilungsaktivität endet mit der Limitierung eines oder mehrerer Faktoren im Zuge der Kultivierung und es folgt die stationäre Phase. Im Fall der BY-2 Zellen handelt es sich um einen Mischeffekt aus der Limitierung von Platz, Zucker und 2,4-D (Abb. 26). Es folgt die Phase in der die Zellen absterben. Zwischen dem 11. und 12. Kulturtag beginnt die Zellzahl langsam zu sinken,

während der Anteil toter Zellen steigt (Abb. 20). Diese Phase wird als Absterbephase bezeichnet. Dabei fällt auf, dass die Abnahme der Zellzahl stärker ist als die Zunahme des Anteils toter Zellen. Der Grund hierfür muss ein methodisches Problem sein. Mit zunehmendem Alter werden die Zellen immer größer und fragiler, und ein Teil der Zellen wird bei der mechanischen Vereinzelung während der Zellzahl-Bestimmung zerstört und nicht erfasst. Die Ursachen für das langsame Absterben der Zellen sind wahrscheinlich vielfältig. Zum einen deutet der Verlauf des Stärkegehaltes (Abb. 27) darauf hin, dass zunehmend Zuckermangel herrscht, zum anderen kommt es durch die stetige Volumenzunahme der Zellen zu mangelhaftem Kontakt mit dem Kulturmedium. Die zunehmende Differenzierung zu Wurzelhauben-Zellen führt zur Produktion von Schleim, der den Stoffaustausch mit dem Medium zusätzlich erschweren könnte (Winicur et al.; 1998).

Das Frischgewicht folgt der Zellzahl im Abstand von etwa 2 Tagen (Abb. 20). Vergleichbare Beobachtungen findet man bei der Kultivierung von *Arabidopsis*- (Menges & Murray 2002) und *Chenopodium rubrum*-Zellen (Peters et al.; 2000). Die verzögerte Entwicklung des Frischgewichtes zeigt, dass das Streckungswachstum der Zellen erst nach Abschluss des Teilungswachstums stattfindet. Das anhaltend hohe Frischgewicht während der stationären- und Absterbephase kann auf Grund der osmotisch bedingten Volumenzunahme im Verlauf der Kultivierung erklärt werden.

#### **4.1.2 Erst die Synchronisierung macht den sequenziellen Ablauf des Zellzyklus sichtbar**

Eine hohe Synchronität ist die Grundvoraussetzung für die Untersuchung des Zellzyklus und potenzieller Signale. Laut Nagata & Kumagai (1999) kann diese Zellkultur zu 70 %, gemessen am Mitose-Index, synchronisiert werden. Andere Zellkulturen sind im Gegensatz dazu nur geringfügig synchronisierbar. Die *Arabidopsis*-Zelllinien MM1 und MM2d, die sich sowohl durch Zuckerverarmung als auch mittels Aphidicolin synchronisieren lassen, erreichen lediglich eine Synchronität von 15 % (Menges & Murray; 2002). Die in dieser Arbeit verwendete BY-2 Zellkultur konnte zu 50 %, gemessen am Mitose-Index, synchronisiert werden. In Veröffentlichungen finden sich Synchronitäten von 35 % - 70 % (Redig et al.; 1996, Laureys et al.; 1998, Swiatek et al.; 2002). Diese große Schwankungsbreite läßt sich durch die Tatsache erklären, dass die Ermittlung des Mitose-Index nicht einheitlich durchgeführt wird, und die Werte sehr subjektiv sind. Aus den hier parallel durchgeführten Durchfluscytometrie-Analysen lässt sich ableiten, dass die tatsächliche Synchronität der hier verwendeten BY-2 Zellen nach der Verwendung von Aphidicolin 80 % und nach der Verwendung von Propyzamid etwa 75 % betrug (Abb. 22 B und C). Diese Werte sind vergleichbar mit denen anderer Arbeitsgruppen (Hemmerlin & Bach; 1998). Da die Synchronität im Versuchsverlauf allmählich geringer wurde, konnte nach Verwendung von Aphidicolin der Zellzyklus vom G1/S-Übergang bis zur Mitose erfasst werden, während der Zellzyklus vom M/G1-Übergang bis zur G1-Phase durch Synchronisierung mit Propyzamid abgedeckt werden konnte (Abb. 22 C). Ein gewisses Problem stellt dabei die Tatsache dar, dass ein erheblicher Teil der Zellen durch die Propyzamid-

Behandlung irreversible Schäden davon trägt (Nagata & Kumagai; 1999). Sichtbar wird dieser Effekt durch den recht großen Anteil von Zellen – etwa 40 % - die in der G2-Phase zurückbleiben oder nur sehr verzögert in die G1-Phase übergehen (Abb. 22 C).

Die Länge der einzelnen Phasen wurde in dieser Arbeit als die Zeit von einem Kreuzungspunkt der betrachteten Phase mit der vorangegangenen, bis zum Kreuzungspunkt mit der folgenden Phase definiert. Die auf diese Weise ermittelten Perioden sind unvermeidlich länger als die realen Zeiträume, repräsentieren aber den Zellzyklusstatus der Mehrheit an Zellen in der Kultur. Insofern ist die tatsächliche Länge des Zellzyklus einer Zelle deutlich kürzer als die hier angegebenen 20 h. Summiert man nur die Plateaus der einzelnen Zellzyklusphasen so verbleiben etwa 13 – 14 h. Dies entspricht exakt der von Nagata et al. (1992) angegebenen Zeitspanne für den Zellzyklus optimal wachsender BY-2 Zellkulturen.

### **4.1.3 Die Expression der meisten Zellzyklus-Kontrollgene ist nicht konstant**

Die meisten bisher untersuchten Zellzyklus-Kontrollgene werden ausschließlich in aktiv teilenden Zellen exprimiert (Sorrell et al.; 1999). Auch das hier untersuchte Cyclin D3;2 zeigt diese Charakteristik (Abb. 23). Aus den Expressionsmustern der untersuchten Zellzyklus-Kontrollgene in synchronisierten Zellen (Abb. 24) ergibt sich eine phasenspezifische Verteilung. Demnach wird die Expression der D-Cycline sequenziell im Verlauf der G1-Phase induziert, mit dem Übergang zur S-Phase verringert sich deren Expression, während gleichzeitig die Expression des Cyclin A3;2 beginnt. Im Verlauf der G2-Phase sinkt die Expression des A-Cyclins und die Expression des Cyclin D3;2 erhöht sich transient. Die Expression der Cycline D2;1, D3;1 und B1;2 nimmt im Verlauf der G2-Phase zu und erreicht das Maximum während der Mitose. Während das Cyclin B1;2 noch bis in die folgende G1-Phase hinein exprimiert wird, verringert sich die Expression der zwei D-Cycline noch im Verlauf der Mitose. Im Gegensatz zur gleichmäßigen Expression der Cdk2a, wird die CdkB1-1 vor allem während der Mitose exprimiert. Die Expressionsmuster der Cycline D2;1, D3;1 und D3;2 im Zellzyklusverlauf werden von bereits veröffentlichten Untersuchungen von Sorrell et al. (1999) gestützt. Auch diese Autoren stellten fest, dass die Cycline D2;1 und D3;1 in BY-2 Zellen zusätzlich zur Expression in der G1-Phase auch während der Mitose verstärkt exprimiert werden. Sie postulieren eine mögliche Doppelfunktion dieser Cycline. Vorstellbar wäre z. B. die Kontrolle der Ploidie, also der Entscheidung zwischen der Einleitung der Mitose und einer weiteren Verdopplung der DNA (Joubes & Chevalier 2000). Es gibt auch Hinweise, dass zumindest das Cyclin D3;1 durch Bindung an Cdk-Inhibitoren deren Wirkung kontrollieren kann (Jasinski et al.; 2001). Die ungewöhnliche Expression der D-Cycline könnte allerdings auch eine für BY-2 Zellen spezifische Anomalie der Genexpression, vergleichbar mit Veränderungen in menschlichen HeLa-Zellen, darstellen (Nagata et al.; 1992). Der hier gefundene Verlauf der Expression des Cyclins A3;2 entspricht der bereits publizierten (Sorrell et al.; 1999, Reichheld et al.; 1996). Interessanterweise ersetzt dieses Cyclin die Funktion der in Pflanzen nicht vorhandenen E-Cycline, und ist aus diesem Grund an der Regulation

des G1/S-Übergang beteiligt (Yu et al.; 2003). Die hier gefundene geringfügige Erhöhung der Cyclin D3;2-Expression während der G2-Phase ist auch in den Untersuchungen von Sorrell et al. (1999) erkennbar, wird aber nicht diskutiert. Die lang anhaltende Expression des Cyclins B1;2, und der CdkB1;1, die noch während der G1-Phase exprimiert werden, könnte eine Folge der Propyzamid-Hemmung sein. Da ein größerer Prozentsatz an Zellen die Mitose nach der Behandlung nur sehr zögerlich verlassen, könnte eine künstlich verlängerte Expression von Mitose-Genen die Folge sein. Die bisher untersuchte Expression des nahe verwandten Cyclin B1;1 zeigten eine parallel mit der Mitose verlaufende Expression (Swiatek et al.; 2004, Menges & Murray; 2002). Das von Sorrell et al. (1999) gezeigte Muster dieses Cyclins zeigte im Unterschied dazu eine erhöhte Expression am G2/M-Übergang. Die Expressionen der Cdk2a und CdkB1-1 entsprechen den Mustern in *Arabidopsis*-Zellkulturen (Menges & Murray; 2002).

Die Expression der Zellzyklusgene sagt nur bedingt etwas über die phasenspezifische Funktion dieser Gene aus, denn die Menge an vorhandenem Protein könnte ein anderes Muster aufweisen. Da allerdings alle bisher zur Verfügung stehenden Untersuchungen ein übereinstimmendes Muster zwischen Cyclin-Expression und Proteinmenge zeigten, könnte man zunächst zur Vereinfachung auch bei den hier untersuchten Cyclinen davon ausgehen (Dewitte & Murray 2003). Im Gegensatz dazu wäre bei den Cdks die Aktivität und nicht die Expression der wichtigste Parameter. In so fern sagt der Verlauf der Expression der Cdk nur bedingt etwas über deren Funktion im Zellzyklusverlauf aus. Betrachtet man die bisher gewonnen Erkenntnisse über den pflanzlichen Zellzyklus, wird deutlich, dass es einige Unterschiede zur Regulation des tierischen Zellzyklus gibt. Während bei Tieren mehrere Cdks den Ablauf des Zellzyklus steuern, scheint die Regulation in Pflanzen über eine zentrale Cdk des Typs A abzulaufen, deren Bindungspartner - die Cycline – phasenspezifisch wechseln. Am G2/M-Übergang wird die Aktivität der Cdk durch eine zweite Cdk des B Typs ergänzt (Dewitte & Murray 2003). Auf Grund der zentralen Rolle einer Cdk käme der oszillierenden Expression der Cycline eine besonders wichtige Bedeutung zu.

Um die generelle Funktion ausgewählter Zellzyklusgene zu untersuchen, wurde durch Transformation der BY-2 Zellen mit Überexpressions- und RNAi-Konstrukten des Cyclin D2 und der Cdk2a versucht, deren Expression gezielt zu verändern. Die Folgen dieser Veränderung war ein stark reduziertes Wachstum, besonders der Cdk-RNAi- und der D2-Überexpressionslinien, das von einer Tendenz zur Verdopplung des DNA-Gehaltes der Zellen begleitet wurde (Abb. 65). Im Fall der CdkA, die eine zentrale Rolle im Zellzyklus spielt, lassen sich die negativen Effekte der zu geringen Expression auf die Teilung recht leicht erklären. Die Hemmung des Zellzyklus durch eine Überexpression des D2-Cyclins war jedoch tatsächlich überraschend. Bedenkt man allerdings die möglicherweise große Bedeutsamkeit der zyklischen An- und Abreicherung der Cycline, bzw. deren Rolle bei der Regulation der Endoreduplikation, könnte ein permanent hoher Level des Cyclins den Ablauf des Zellzyklus empfindlich stören.

## 4.2 Interne und externe Signale und deren Einfluss auf den Zellzyklus

### 4.2.1 Platz, Zucker, und Auxin limitieren die Teilungsaktivität der Kultur im Verlauf der Kultivierung

Um den Einfluss von Zucker, Auxin, und Cytokinin auf die Zellteilung der BY-2 Zellen untersuchen zu können, werden Kulturbedingungen mit variierenden Effekten dieser Signale benötigt. Aus diesem Grund wurde zunächst untersucht, ob die Verarmung an Zucker, 2,4-D oder Cytokinin am Übergang zur stationären Phase beteiligt ist. Der Zusatz von Zucker, 2,4-D, *t*-Zeatin oder Kombinationen dieser Faktoren zu Zellen der stationären Phase bewirkte allerdings keine Stimulation der Zellteilung. Die Verwendung verschiedener Animpfvolumina zeigte, dass eine Vergrößerung des Animpfvolumens zur Verkürzung der *lag*-Phase führte (Abb. 25). Der Verlust der Teilungsaktivität trat beim Erreichen einer Zelldichte von  $5 - 6 \times 10^6$  Zellen/ml ein. Somit zeigte sich, dass bei den BY-2 Zellen der fehlende Platz, bzw. fehlende Kontakt zum Medium die Hauptursache für den plötzlichen Verlust der Teilungsaktivität darstellt. Die Subkultivierung von Zellen der stationären Phase in frischem Medium (Abb. 26) zeigt weiterhin, dass die Initiierung der Teilungsaktivität besonders stark ist, wenn sich Zucker im Medium befindet. Gleichzeitig vorhandenes 2,4-D erhöht den Anteil sich teilender Zellen. Im Gegensatz dazu hemmt der Zusatz von Z die Teilungsaktivität. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass auch die Verfügbarkeit von Zucker und 2,4-D im Verlauf der Kultivierung limitierend wird und am Verlust der Teilungsaktivität beteiligt ist.

### 4.2.2 Zucker als Wachstumsressource und Signal für meristematische Aktivität

#### 4.2.2.1 Die Zuckerquelle variiert im Verlauf der Kultivierung

Betrachtet man das quantitative Zuckerspektrum des Mediums im Kulturverlauf, so wird deutlich, dass die BY-2 Zellen mindestens eine extrazelluläre Invertase besitzen, denn die im Medium angebotene Saccharose verschwindet innerhalb der ersten 4 Kulturtage, während Glukose und Fruktose im Verhältnis 1:1 auftauchen (Abb. 27 A). Vergleichbare Beobachtungen und der Nachweis von extrazellulären Invertasen wurden bereits bei Tomaten-, *Chenopodium*- (Roitsch et al.; 1995) und Zuckerrohr-Kulturen (Veith; 1989) erbracht. Trotz der Aktivität der extrazellulären Invertase kann die Möglichkeit einer gewissen Saccharoseaufnahme nicht vollständig ausgeschlossen werden. Allerdings müsste die Saccharose dann sofort nach der Aufnahme gespalten werden, denn endogen konnten nur sehr geringe Saccharose-Konzentrationen nachgewiesen werden (Abb. 28 A). Abb. 27 B zeigt, dass der Verbrauch von Zucker nicht gleichmäßig stattfindet, es gibt zwei Maxima während der frühen Teilungsphase und mit dem Beginn der stationären Phase. Zu erkennen ist dies auch am ansteigenden endogenen Zuckerspiegel, der am 5. Kulturtag maximal ist. Zwischen Tag 4 und 6 verringert sich die Aufnahme von Zucker aus dem Medium, während der endogene Zuckerspiegel zu sinken beginnt. Erst mit dem Abschluss der Zellteilung, am Übergang zur stationären Phase, beginnt der Zuckerverbrauch durch Aufnahme aus dem Medium wieder anzusteigen. Erklärt werden kann dies einerseits durch den

Bedarf an Osmolyten auf Grund des Streckungswachstums der Zellen, das sich der Zellteilung anschließt, und der mit der Differenzierung der Zellen verbundenen Bildung von Stärke (Abb. 28 B) (Winicur et al.; 1998). Zusammengefasst bedeutet dies, dass Zucker unmittelbar vor und nach der Zellteilung aus dem Medium aufgenommen wird, während der Zuckerbedarf während des Zellzyklus' aus dem endogenen Zucker-Pool gedeckt wird. Die Veränderung der Glukose- und Fruktose-Konzentrationen während der Kultivierung zeigt darüber hinaus, dass die Zellen eine entwicklungsabhängige Zuckerpräferenz besitzen (Abb. 27). Ab Tag 7 dominiert Fruktose gegenüber Glukose im Medium – ab Tag 9 verringert sich auch die Fruktose-Konzentration. Auch der endogene Zuckerspiegel zeigt höhere Fruktose- als Glukose-Konzentrationen ab Tag 8 an (Abb. 27). Diese Beobachtungen lassen sich nur über eine selektive Glukoseaufnahme ab Tag 7 und einer folgenden Fruktoseaufnahme ab Tag 8 erklären. Eine mögliche Erklärung für die bevorzugte Glukoseaufnahme ist die Tatsache, dass die bisher bekannten Hexose-Transporter Glukose effektiver als Fruktose transportieren (Büttner & Sauer, 2000).

#### **4.2.2.2 BY-2 Zellen haben entwicklungspezifische Zuckerpräferenzen**

Bereits aus dem Verlauf der Zuckerkonzentrationen während der Kultivierung wurde deutlich, dass es eine entwicklungspezifische Anpassung an die Aufnahme eines bestimmten Zuckers geben muss (Abb. 27). Nach der Spaltung von Saccharose durch eine extrazelluläre Invertase wird zunächst Glukose, später Fruktose aufgenommen. Abb. 29 bestätigt, dass Zellen einer 7 Tage alten Zellkultur mit Glukose, ältere Zellen mit Fruktose besonders schnell anwachsen können. Die bisher bekannten Hexose-Transporter bevorzugen Glukose gegenüber Fruktose (Büttner & Sauer; 2000). Dies könnte erklären, warum zunächst Glukose und erst später Fruktose aus dem Medium verschwindet. Es erklärt allerdings nicht ohne weiteres die Fruktosepräferenz älterer Zellen. Entweder existieren auch Hexose-Transporter die Fruktose bevorzugen, oder die Fruktose-Präferenz resultiert aus der Optimierung der Stoffwechselwege. Abb. 31 zeigt allerdings eindeutig, dass die angebotene Fruktose im Vergleich zu den anderen Zuckern schneller aufgenommen wird, was auf die Existenz spezifischer Hexose-Transporter hindeutet. Tatsächlich wurden zumindest in Hefen Hexose-Transporter mit Fruktose-Präferenz identifiziert (Berthels et al.; 2004). Interessanterweise unterbleibt die schnelle Aufnahme von Fruktose bei gleichzeitigem Angebot von Glukose (Abb. 31 C). Dies bedeutet, dass Glukose eine inhibitorische Wirkung auf die Fruktose-spezifischen Hexose-Transporter ausübt. In jedem Fall aber besteht bei den BY-2 Zellen ein Zusammenhang zwischen dem endogenen Zuckerspiegel und der Regulation des Zellzyklus (Abb. 32; Abb. 33). Ein hoher endogener Zuckerspiegel gewährleistet die rasche Initiierung und den schnellen Ablauf des Zellzyklus. Leider ist bisher noch immer ungeklärt auf welche Weise der Zuckerspiegel von den Zellen registriert wird. Entweder geschieht dies im Zusammenhang mit der Zuckeraufnahme oder über die Hexokinase (Schmeekens; 2000). Im Fall der BY-2 Zellen fungieren Glukose und Fruktose gleichberechtigt als Metabolit, denn intern wurde stets ausschließlich der extern angebotene Zucker gefunden (Abb. 32). Auf welche Weise der endogene

Zuckerspiegel den Ablauf des Zellzyklus beeinflusst ist bisher nicht bekannt. Man kennt lediglich die Funktion des Zuckers als Signal bei der Regulation der Cyclin D2 Expression, die zur Induktion der Teilung während der G1-Phase führt (Cockroft et al.; 2000). Eine wichtige Beobachtung in diesem Zusammenhang ist, dass in den hier untersuchten BY-2 Zellen nicht nur die Länge der G1-Phase vom endogenen Zuckerspiegel beeinflusst wurde, sondern auch die Länge der S- und G2-Phase (Abb. 33). Dies deutet darauf hin, dass Zucker als Signal an mehr als einer Stelle im Zellzyklus einfließt.

#### **4.2.2.3 Zucker ist nicht nur Metabolit, sondern auch ein wichtiges Signal bei der Regulation des Zellzyklus**

Zucker wird von den BY-2 Zellen aus dem Medium in Form von Glukose und Fruktose, den Spaltprodukten der Saccharose, aufgenommen (Abb. 27). Das von der Zelle wahrgenommene Signal muss der intrazelluläre Zuckerspiegel sein, denn die entwicklungspezifische Präferenz für bestimmte Zucker wurde vom raschen Anstieg der endogenen Zuckerkonzentration begleitet (Abb. 32). In der Folge beeinflusst Zucker als Signal die Induktion und die Expressionsstärke verschiedener Zellzyklusgene. Betrachtet man die Induktion der D-Cycline während der G0- bzw. G1-Phase subkultivierter Zellen der stationären Phase, so wird deutlich, dass die Adaption dieser Zellen an Fruktose und die dadurch schnellere Aufnahme von Zucker, zu einer früheren und stärkeren Expression der Cycline D2;1 und D3;2 führt (Abb. 34). Obwohl das dritte untersuchte D-Cyclin D3;1 entgegengesetzt reagiert, wird die Teilung in Fruktose-haltigem Medium schneller induziert. Eine solche negative Reaktion der Expression des D3-Cyclins wurde auch bei *Chenopodium rubrum* Zellen beschrieben (Fountain; 2000). Verfolgt man die Veränderung der Expressionsmuster der Cycline bei mit Aphidicolin-synchronisierten Zellen, so stellt man fest, dass die Cycline D2;1, D3;2, A3;2 und B1;2 in Fruktose-haltigem Medium stärker exprimiert werden (Abb. 35 B). Zudem verschieben sich die Muster dieser Cycline, auf Grund des schneller ablaufenden Zellzyklus, zeitlich nach vorn. Nur die Expression des Cyclin D3;1 reagiert negativ auf ein positives Zuckersignal. Demnach scheint die Expression dieses Cyclins für den Ablauf des Zellzyklus nicht limitierend zu sein. Ein reduziertes Zuckersignal im Medium verursacht eine Verringerung der Expression der Cycline D2;1, D3;2, A3;2 und B1;2 und eine zeitliche Verschiebung der Expressionsmuster nach hinten (Abb. 35 C). Im Gegensatz dazu wird das Cyclin D3;1 bei reduziertem Zuckersignal stärker und zeitlich früher exprimiert. Versucht man, auf Grund der Veränderung der Expressionsmuster der Cycline die variierende Geschwindigkeit des Zellzyklus bei unterschiedlichem Zuckerangebot zu erklären, fällt auf, dass der Übergang zwischen G1- und S-Phase vom Austausch des Cyclins D2;1 durch das Cyclin A3;2 begleitet wird. Der verzögerte G1/S-Übergang bei reduziertem Zuckersignal könnte von der geringen Expression des Cyclins A3;2 verursacht sein. Der Übergang von der S- zur G2-Phase steht im zeitlichen Zusammenhang mit dem Ersatz der Cyclin A3;2 Expression durch die Cyclin D3;2 Expression. Im Übergang zur Mitose wird die D3;2 Expression durch die beginnende Expression der Cycline D2;1 und B1;2 abgelöst. Die durch das Zuckersignal veränderten Expressionsmuster der

Cycline könnten demnach tatsächlich die veränderte Zellzyklusgeschwindigkeit verursachen. Einzig die Expression des Cyclin D3;1 besitzt keine Korrelation mit dem Ablauf des Zellzyklus. Die geringere Expression am G2/M-Übergang bei verstärktem Zuckersignal verhindert den beschleunigten Zellzyklus nicht und die stärkere Expression in Folge eines reduzierten Zuckersignals gleicht den verzögerten Zellzyklus nicht aus. Eine mögliche Erklärung für den differenzierten Effekt der D-Cycline auf das Zuckersignal könnte die Signalverknüpfung mit dem Cytokininsignal sein. Während ein zu starkes Zuckersignal im Verhältnis zum Cytokininsignal zur verringerten D3;1-Expression führt, bewirkt ein zu starkes Cytokininsignal bei unzureichender Zuckerversorgung eine Verringerung der D2;1-Expression. Würde der Zellzyklus nur bei einer ausgeglichenen Induktion aller D-Cycline ablaufen, wäre dies eine geeignete Schnittstelle. Auf Grund der Tatsache, dass bei variierender Signalstärke des Zuckers auch die Länge der S- und G2-Phase verändert ist, zeigt, dass Zucker nicht nur während der G1-Phase, bzw. bei der Induktion der Teilung, sondern auch im weiteren Verlauf des Zellzyklus regulatorische Funktionen besitzt (Abb. 33). Dieses Erkenntnis geht deutlich über den bisherigen Kenntnisstand hinaus, der nur den D2-Cyclinen eine Bedeutung bei der Übertragung des Zuckersignals am G1/S-Übergang zuschrieb (Cockcroft et al.; 2000).

### **4.2.3 Charakterisierung der Cytokinine als regulatorisches Signal im Zellzyklus der BY-2 Zellen**

#### **4.2.3.1 Der endogene Cytokininspiegel oszilliert im Zellzyklusverlauf**

Die Messung der endogenen Cytokininkonzentrationen synchronisierter Zellen ergab einen eindeutigen Zusammenhang zwischen dem Auftreten und Verschwinden der Cytokinine und den Zellzyklusphasen (Abb. 36). Kurz vor jedem Übergang beginnt die Konzentration von Z und im geringeren Umfang anderer Cytokinine zu steigen, mit dem Übergang sinkt die Konzentration. Des Weiteren wurde deutlich, dass das Muster der Glukoside nicht gegenläufig zu dem der Basen und Basenriboside ist, denn es konnten nur sehr geringe Mengen an Glukosiden nachgewiesen werden. Dies bedeutet, dass eine reversible Umwandlung zwischen inaktiven glukosidischen und aktiven Cytokinen, nicht die Ursache für die Oszillation des endogenen Cytokininspiegels sein kann. Auf Grund des stündlichen Abstandes zwischen den Probennahmen ist es möglich, dass die Cytokinin An- und Abreicherungen nicht in jedem Fall genau im Maximum, bzw. Minimum getroffen wurden und die tatsächlichen Höchst- und Mindestwerte höher, bzw. niedriger liegen. Hinzu kommt, dass die Zellen nicht zu 100 % synchron sind und aus diesem Grund die Oszillationen etwas abgeflacht sind. Der in dieser Arbeit gezeigte Verlauf der Cytokinin-Konzentrationen ergänzt die bereits 1996 veröffentlichten Ergebnisse von Redig et al. Diese Autoren beschrieben Anreicherungen von Cytokinen am Ende der S-Phase und während der Mitose. Eine andere Arbeit dokumentiert hohe Cytokinin-Konzentrationen während der S-Phase und am G2/M-Übergang (Dobrev et al.; 2003). In

beiden Veröffentlichungen wurden allerdings die ersten beiden Stunden nach der Aphidicolin-Entfernung nicht untersucht, und aus diesem Grund die in dieser Arbeit beschriebene Cytokinin-Anreicherung am G1/S-Übergang nicht gefunden. Auch die ansteigenden Cytokinin-Konzentrationen am Ende der Mitose wurden zwar von beiden Arbeitsgruppen gemessen, aber nicht diskutiert. Die Cytokinin-Muster in den erwähnten Veröffentlichungen differieren: Während bei Redig et al. Z, ZRMP, ZR, DHZR dominieren, sind es bei Dobrev et al. IP, IPAMP, DHZ, DHZR, ZOG und ZROG und in der prämitotischen Anreicherung *cis*-Z. In einer die vorliegende Arbeit ergänzenden Untersuchung (Reth; 2003) wurde die Kinetik des Cytokinin-Musters am S/G2-Übergang der BY-2 Zellen zeitlich stärker aufgelöst. Das Muster zeigte die klassische Biosynthesesequenz der Cytokinine, indem zunächst IPAMP akkumuliert, direkt gefolgt von IP und zeitlich etwas verschoben von Z. Diese Untersuchung deutet auf eine ansteigende Cytokinin-Neusynthese im Vorfeld der Cytokinin-Anreicherung am S/G2-Übergang hin.

#### **4.2.3.2 Der oszillierende Cytokinin Spiegel wird unter anderen durch die Regulation der Cytokinin Oxidase/Dehydrogenase Aktivität erzeugt**

Die Aktivität der CKX verändert sich im Verlauf des Zellzyklus, wobei hohe Aktivitäten mit den Zeitpunkten der Übergänge von einer Zellzyklusphase zur nächsten korrelieren (Abb. 37). Da dies exakt die Zeitpunkte sind, an denen eine Abnahme der Cytokinin-Konzentrationen (Abb. 36) zu verzeichnen ist, scheint eine Beteiligung der CKX an der Regulation der endogenen Cytokinin-Oszillation im Zellzyklusverlauf sehr wahrscheinlich. Dieses Ergebnis unterstützt die Feststellung, dass die Expression der CKX vor allem in teilungsaktiven Geweben zu finden ist (Schmülling et al.; 2003). Die CKX-Aktivität der BY-2 Zellen wurde bisher nur von Dobrev et al. (2002) gemessen. Diese Autoren fanden erhöhte Aktivitäten am S/G2- und M/G1-Übergang, allerdings waren die Aktivitäten insgesamt während der S- und G2-Phase höher als im übrigen Zellzyklus.

Obwohl in *Arabidopsis* insgesamt 7 verschiedene CKX-Gene existieren, konnte in Tabak bisher kein CKX-Gen auf der Basis von Sequenzhomologien gefunden werden. Diese Tatsache stellt insofern ein gewisses Problem für die Messung der CKX-Aktivität dar, indem die hier gemessene Aktivität eine Mischaktivität verschiedener CKX-Enzyme sein könnte. Für den Verlauf der CKX-Aktivität während des Zellzyklus ist dies nicht von Bedeutung, denn die Gesamt-Aktivität ist von Interesse. Einzig die Verwendung von IP als Substrat im CKX-Assay könnte ein gewisses Problem darstellen, da Z das eigentlich dominierende Cytokinin ist. Für die Bestimmung der Substratspezifität könnte die Existenz verschiedener CKX-Enzyme, mit eventuell verschiedener Substratspezifität und spezifischer Präsenz, allerdings durchaus zu falschen Ergebnissen führen. Aus diesem Grund wurden Extrakte aus allen Zellzyklusphasen vereinigt, um die dominierende Substratspezifität zu erfassen. Es zeigte sich, dass außer den Ribosiden von Z und DHZ die untersuchten Cytokinine in realistischen Zeitspannen von der CKX abgebaut werden könnten (Tab. 13). Die ermittelten  $K_m$ -Werte liegen mit 2,2  $\mu$ M bis 153  $\mu$ M im Bereich der bisher veröffentlichten CKX  $K_m$ -Werte. Diese variieren abhängig von Pflanzen- und

CKX-Spezies von 1,5  $\mu\text{M}$  bis 60  $\mu\text{M}$  (Schmülling et al.; 2003). Im Allgemeinen ist der  $K_m$ -Wert für IP und IPA niedriger als für die anderen Cytokinine. Dies gilt bei den BY-2 Zellen nur für IP. Die Substrataffinität der CKX zu IPA ist hingegen schwächer, dafür aber die Umsatzgeschwindigkeit höher. Aus den bisher veröffentlichten Untersuchungen wurde geschlussfolgert, dass Vertreter der DHZ-Familie, Glukoside und Nukleotide generell resistent gegen den CKX-Abbau sind. Da in dieser Arbeit eindeutig nachgewiesen wurde, dass DHZ Substrat der hier untersuchten CKX ist, muss diese Schlussfolgerung relativiert werden.

Aufschluss über die Funktion der CKX im Zusammenhang mit dem Zellzyklus gibt unter Umständen die Erkenntnis, in welchem Zellbestandteil sich die CKX befindet. Die höchsten gemessenen Aktivitäten wurden in der löslichen Fraktion und nur sehr geringe Aktivitäten in der Partikel-Fraktion gefunden (Abb. 45). Der größte Teil der CKX sollte sich demnach im Cytoplasma oder im Endoplasmatischen Retikulum, bzw. in Golgi-Vesikeln befinden. Die meisten bisher gefundenen CKX-Vertreter besitzen N-terminale Proteinsequenzen, die typisch für sekretorische Proteine sind (Schmülling et al.; 2003). Dies stimmt mit ihrer Natur als Glycoproteine überein. Motyka et al. (2003) zeigten, dass der Glycosylierungsgrad der CKX über die Verteilung zwischen Cytosol und den Export in den Apoplasten, und auch über das pH-Optimum des Enzyms entscheidet. Da das pH-Optimum der hier analysierten CKX deutlich unter pH 7 liegt, sollte es sich nicht um ein im Cytoplasma lokalisiertes Enzym handeln (Abb. 39). Die Beobachtung, dass sich nach Cytokininbehandlung der Zellen die Aktivität in der Partikel-Fraktion zu Ungunsten der in der löslichen Fraktion gefundenen Aktivität erhöht (Abb. 45), ließe sich dadurch erklären, dass sich die CKX in Golgi-Vesikeln im Cytoplasma befindet und bei Bedarf in die Zellwand sezerniert wird.

#### **4.2.3.3 Die endogenen Cytokinin An- und Abreicherungen haben eine regulatorische Funktion im Zellzyklus**

In der vorliegenden Arbeit konnten keine eindeutigen langfristigen Effekte der zugegebenen Cytokinine auf die Entwicklung der Zellzahl oder des Frischgewichtes festgestellt werden (Abb. 40). Betrachtet man den unmittelbaren Einfluss der zugegebenen Cytokinine auf die Teilungsaktivität, so findet man, dass die Zugabe von Z, dem endogen dominierenden Cytokinin, den Zellzyklus deutlich hemmt, während ZR, DHZ, DHZR, IP und IPA keinen nennenswerten Effekt auf den Anteil sich teilender Zellen hatten (Abb. 41). Betrachtet man die Wirkung der verschiedenen Cytokinine auf den Zellzyklus Aphidicolin-synchronisierter Zellen wird deutlich, dass alle getesteten Cytokinine eine Hemmung dieses ersten Zellzyklus' verursachen, die am stärksten am G2-M/G1-Übergang sichtbar wurde (Abb. 42). Gleichzeitig haben allerdings alle Cytokinine mit Ausnahme von Z und DHZR einen geringfügig positiven Effekt auf die Teilungsinduktion von G0-Zellen (Tab. 14). Die Tatsache, dass Z am effektivsten den S/G2-Übergang hemmt, DHZ jedoch den G2/M-Übergang, deutet darauf hin, dass es spezifische Wirkungen einzelner Cytokinine im Zellzyklus geben muss. Auch zeigt dieses Ergebnis, dass der Zeitpunkt der Zugabe einen Einfluss auf die Wirkung des Cytokinins hat. Dies könnte auch

die variierenden Effekte der Cytokinine auf die Zellzahl-Entwicklung nicht synchronisierter Zellen erklären, bei denen der Zustand der Zellen während des Zugabezeitpunktes nicht kontrolliert werden kann. Der hemmende Effekt zusätzlicher Cytokinine war ein zunächst unerwartetes Ergebnis, da Cytokinine die Zellteilung in vielen Geweben aktivieren (Francis & Sorrell; 2001). Negative Wirkung von Cytokininen auf den Zellzyklus der BY-2 Zellen wurden allerdings ebenfalls von Laureys et al. (1999) gefunden. Die Zugabe von Z, ZR oder IP während der frühen G1-Phase bewirkte eine Hemmung des G1/S-Überganges. Eventuell reagieren die BY-2 Zellen, als meristematische Wurzelzellen, generell negativ auf Cytokininzufuhr von außen. Dafür spricht, dass die Überexpression verschiedener CKX in *Arabidopsis* zur Verstärkung des Wurzelwachstums führt (Werner et al. 2003). Berücksichtigt man die in dieser Arbeit gefundenen endogenen Cytokininlevel im Verlauf des Zellzyklus, so könnte deren Oszillation durch die Zugabe von Cytokininen empfindlich gestört werden. Die hemmende Wirkung der Cytokinine deutet in so fern darauf hin, dass diesen endogenen Cytokinin-Oszillationen eine regulatorische Bedeutung zukommt.

Ein generelles Problem der Erhöhung des endogenen Cytokininspiegels durch Zugabe von außen ist, dass nicht genau kontrolliert werden kann wie viel Cytokinin tatsächlich in der Zelle ankommt und wirksam wird. Zwar gibt es Untersuchungen die zeigten, dass die Cytoplasma-Membran von *Chenopodium rubrum* Zellen uneingeschränkt permeabel für Basen- und Basenriboside ist (Fußeder et al.; 1989), aber die Existenz von entsprechenden Transportern (purine permease *PUP* 1 – 15) wurde bisher nur für sprossbürtige Gewebe gezeigt (Gillissen et al.; 2000). Die bisher analysierten Transporter zeigten auch Unterschiede in der Substratspezifität. Eine selektive Aufnahme von Cytokininen durch die BY-2 Zellen kann demnach nicht ausgeschlossen werden. Darüber hinaus könnten Teile der von außen zugegebenen Cytokinine durch Glukosylierung inaktiviert oder durch Erhöhung der CKX-Aktivität abgebaut werden. Die Tatsache, dass nach Z-Gabe die CKX-Aktivität in der Partikel-Fraktion, teilweise auf Kosten der CKX-Aktivität der löslichen Fraktion, zunimmt, deutet darauf hin, dass zumindest ein Teil des Cytokinins noch vor der Aufnahme abgebaut werden könnte (Abb. 45). Vergleichbare Umverteilungen der CKX-Aktivität finden auch Motyka et al. (2003) nach der Zugabe von Benzyladenin zu Tabak-Zellkulturen. Zu berücksichtigen ist darüber hinaus, dass eine rasche Umwandlung zwischen verschiedenen Cytokininen nicht ausgeschlossen werden kann (Chen; 1997). Unzureichend bekannt ist zudem die Reaktion der Cytokinin-Rezeptoren auf Cytokininzugabe von außen. Einiges deutet darauf hin, dass es eine gewisse Anpassung oder Aufrechterhaltung der Cytokinin-Homöostasis durch Veränderung der Rezeptordichte gibt (Laureys et al.; 1999). Es gibt eine Reihe von Arbeiten die zeigten, dass es schwierig ist die Menge an aktiven Cytokininen in diesbezüglich habituierten Zellen zu verändern. Blagoeva et al. (2004) zeigten beispielsweise, dass nach Behandlung von *Raphanus* mit Olomoucine oder Roscovitine (synthetische Cytokininaloga) zwar die N-Glycosylierung der Cytokinine unterbunden war und die CKX-Aktivität sank, aber die Menge an aktiven Cytokininen unverändert blieb. Diese Punkte machen die Interpretation der Cytokinineffekte bzw. besonders die Identifikation spezifischer Effekte schwierig.

Die negative Wirkung von Lovastatin, einem Inhibitor der cytosolischen 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl Coenzym A Reduktase, auf das Wachstum von pflanzlichen Zellen wurde bereits 1992 von Crowell und Salaz beschrieben. Der genaue Grund für die spezifische Inhibierung der Cytokinin-Biosynthese ist nicht bekannt, denn die Mevalonsäure-Biosynthese führt neben der Produktion von Cytokinen auch zur Synthese von Sesquiterpenen, Ubichinon, Phytosterolen, Gibberellinen, ABA, Chlorophyll und anderen wichtigen Stoffgruppen. Abb. 47 bestätigt den konzentrationsabhängigen negativen Einfluss von Lovastatin auf die mitotische Aktivität der BY-2 Zellen. Wie bereits Crowell und Salaz (1992) berichteten, wird darüber hinaus die Vitalität der Zellen beeinträchtigt (Abb. 48). Laureys et al. (1998) zeigten erstmals, dass nach Lovastatin-Gabe während der G2-Phase synchronisierter BY-2 Zellen der endogene Cytokininspiegel am G2/M-Übergang reduziert ist, und in der Folge der Mitose-Index sinkt. Aus Abb. 51 wird ersichtlich, dass dies auch für den Cytokininspiegel am G1/S-Übergang zutrifft. Unmittelbar nach der Subkultivierung synchronisierter BY-2 Zellen in frisches Medium akkumulieren Cytokine, vor allem Z (Abb. 36). Durch Lovastatin-Gabe wird diese Akkumulation verhindert und die Menge an Cytokinen auf ein Drittel reduziert (Abb. 46). Als Folge wird der Übergang zwischen G1- und S-Phase verzögert. Entsprechend dem G1/S- kann auf diese Weise auch der S/G2-Übergang verzögert werden. Daraus ergibt sich die Schlussfolgerung, dass die Cytokin-Akkumulationen vor jedem Übergang zur nächsten Zellzyklusphase an der Regulation des Überganges sein könnten. Des Weiteren zeigen diese Ergebnisse, dass die Akkumulation der Cytokine vor jedem Phasenübergang durch Neusynthese von Cytokinen erreicht wird. Ein interessanter Aspekt in diesem Zusammenhang ist, dass die Zugabe von Lovastatin am Ende der S-Phase den Übergang zur G2-Phase beschleunigt (Abb. 51). Die Wirkung von Lovastatin tritt auf Grund ihrer Hemmung der Mevalonat-abhängige Biosynthese der Cytokine verzögert ein, und trifft am Ende der S-Phase möglicherweise mit der endogenen Verringerung des Cytokininspiegels durch eine erhöhte CKX-Aktivität zusammen. Dies bedeutet, dass nicht nur die Cytokin-Anreicherung, wie es für den G2/M-Übergang bereits von Laureys et al. (1998) gezeigt wurde, essentiell für den ungestörten Teilungsablauf ist, sondern ebenso die Absenkung des Cytokininspiegels eine regulatorische Funktion besitzt. Auch Laureys et al. (1999) stellten fest, dass der Zusatz von Cytokinen den G1/S-Übergang in BY-2 Zellen effektiver hemmte als die Absenkung des Cytokininspiegels mit Lovastatin.

Ein generelles Problem der Anwendung von Lovastatin ist der nicht vollständige Effekt. Es gibt stets eine Population an Zellen, deren Wachstum durch Lovastatin nicht beeinflusst wird (Laureys et al. 1998). Die Folge ist, dass weder der endogene Cytokininspiegel vollständig reduziert werden kann, noch ein vollständiger Arrest der Zellen in einer bestimmten Zellzyklusphase eintritt. Hemmerlin & Bach (1998) beschrieben einem Arrest der BY-2 Zellen in der G1-Phase nach Lovastatin-Behandlung nach 48 h. Abb. 49 zeigt jedoch, dass es sich nur um eine vorübergehende Hemmung des Wachstums handelt und die überlebende Zell-Population die Teilung wieder aufnimmt. Der Grund dafür könnte der Ersatz der cytosolischen durch die plastidische Isoprenoid-Biosynthese sein. Damit könnte die Versorgung des Cytosols mit Isopentenylpyrophosphat von den Plastiden her erfolgen. Auf diese

Weise könnten trotz Blockierung des cytosolischen Mevalonat-Weges Cytokinine synthetisiert werden (Laule et al.; 2003). Für eine solche Anpassung spricht, dass der Anteil lebender Zellen nach einer zweiten Lovastatin-Behandlung schneller wieder ansteigt als nach der ersten Behandlung (Abb. 50). Dies kann über eine schnelle Wiederaufnahme der Teilungsaktivität der überlebenden Population erklärt werden. Da die Teilung der Plastiden zeitlich unabhängig von der Teilung der Zellen stattfindet, sollte es zu jedem Zeitpunkt Populationen mit mehr oder weniger Plastiden geben. In der Folge würde es stets eine Population an Zellen geben, denen der Ausgleich von fehlendem Cytokinin besser gelingt als der verbleibenden Population. Auf diese Weise könnte man den stets gleich hohen Anteil sterbender Zellen bei mehrfacher Lovastatin-Behandlung erklären. Eine weitere Möglichkeit die Lovastatin-Insensitivität einiger Zellen zu erklären ist die Erhöhung der Cytokinin-Sensitivität, beispielsweise durch die Erhöhung der Rezeptordichte. Dafür spricht, dass der hemmende Effekt mehrerer Cytokinine auf den S/G2-Übergang verstärkt wird, wenn die Zellen mit Lovastatin vorbehandelt wurden (Abb. 43).

#### **4.2.3.4 Die Oszillation der Cytokinine reguliert die phasenspezifische Expression der Cycline**

Wie in Abb. 42 und Abb. 51 gezeigt, verzögert eine zu geringe Cytokinin-Anreicherung, als auch ein zu hoher Cytokininspiegel zwischen diesen Anreicherungen den Ablauf des Zellzyklus. Diese Veränderungen können nicht mit Hilfe des Expressionsmusters einzelner Zellzyklus-Kontrollgene erklärt werden, vielmehr muss die Expression möglichst vieler Gene im Zusammenhang betrachtet werden. In Abb. 53 konnte gezeigt werden, dass die Expression aller drei D-Cycline auf ein verändertes Cytokininsignal reagiert. Allerdings spiegelte nur die Expression des Cyclins D3;1 die Stärke des Cytokininsignals wieder – die Expression findet bei verstärktem Cytokininsignal früher und stärker, bei vermindertem Cytokininsignal verzögert und in geringerem Ausmaß statt. Die Steuerung der D3-Expression durch Cytokinine wird durch Untersuchungen in *Arabidopsis* bestätigt (Cockroft et al.; 2000). Schwierig zu erklären sind die in dieser Arbeit gefundenen Reaktionen der Cycline D3;2 und D2;1 auf ein verändertes Cytokininsignal. Zwar reagiert die Expression des Cyclin D3;2 wie das Cyclin D3;1 positiv auf Cytokinin, allerdings auch positiv auf die Zugabe des Hemmstoffs Lovastatin. Die Expression des Cyclin D2;1 reagiert negativ auf Cytokinin und positiv auf eine Absenkung des endogenen Cytokininspiegels durch Lovastatin. Eine mögliche Erklärung findet sich in der genaueren Untersuchung der Expressionsmuster synchronisierter Zellen (Abb. 54). Die Expression des Cyclin D2;1 wird auch hier durch Cytokinin verringert, allerdings ist auffällig, dass die Expression dieses Cyclins deutlich länger anhält. Auch die Expression des Cyclins D3;2 findet nicht wie üblich während der G2-Phase statt, sondern nach Cytokinin- und Lovastatin-Applikation wesentlich früher. Die Zusammensetzung der Cycline in den einzelnen Zellzyklusphasen wird sowohl durch zusätzliches Cytokinin, als auch durch Lovastatin stark verändert. Geht man davon aus, dass der koordinierte Wechsel der Cycline von Phase zu Phase für den Ablauf des Zellzyklus bedeutsam ist, so könnten

diese Veränderungen der Grund für die beobachteten Hemmungen des Zellzyklus sein. Da sowohl die unzureichende Cytokininanreicherung durch Lovastatin, als auch die Erhöhung des endogenen Cytokininspiegels durch Zugabe von Cytokinen das Muster der Cycline verändert, könnte die endogene Cytokin-Oszillation am koordinierten Wechsel der Cycline beteiligt ist. Erforderlich wird dieser Austausch der Cycline, weil im pflanzlichen Zellzyklus eine zentrale Kinase – die Cdk2a - im gesamten Verlauf des Zellzyklus für mehrere differenziell geregelte Schritte benötigt wird. Die Funktion der Cdk2a wird nur am G2/M-Übergang von einer Kinase des B-Typs unterstützt. Um eine differenzierte Funktion der Kinase/Kinasen während des Zellzyklus zu ermöglichen, müssen die bindenden Cycline wechseln.

#### **4.2.4 Charakterisierung des Auxinsignals als regulatorisches Signal im Zellzyklus der BY-2 Zellen**

##### **4.2.4.1 Das Auxinangebot steuert die Entscheidung zwischen Zellteilung und Differenzierung**

Die BY-2 Zellen sind auf ein Auxinsignal von außen, in Form des synthetischen Auxins 2,4-D, angewiesen (Abb. 55). Dies entspricht dem Verhalten von teilungsaktiven Zellen in der Wurzel, die zumindest zum Teil auf vom Spross geliefertes Auxin angewiesen sind (Marchant et al.; 2002). Die Entwicklung von Volumen und Frischgewicht der BY-2 Zellen verhält sich umgekehrt proportional zur 2,4-D Konzentration im Medium (Abb. 55). Da die Entwicklung der Zellzahl sich allerdings proportional zur 2,4-D Konzentration verhält, kann die Volumenzunahme, bzw. die Zunahme des Frischgewichtes nur mit der Volumenzunahme der Einzelzelle erklärt werden. Mikroskopische Untersuchungen (Abb. 56) bestätigen diese Annahme und deuten darüber hinaus darauf hin, dass geringe 2,4-D Konzentrationen ein Signal zur Differenzierung der Zellen darstellen. Von Miyazawa et al. (2002) wurde gezeigt, dass niedrige 2,4-D Konzentrationen die Amyloplasten-Entwicklung, die ein Bestandteil der Differenzierung dieser Zellen zu Wurzelhaubenzellen ist, induziert (Winicur et al.; 1998). Dies ist kein unerwartetes Ergebnis, denn die Verteilung der Auxin-Konzentrationen innerhalb der Wurzel weisen Auxin den Charakter eines Morphogens zu (Friml et al.; 2002). Deshalb gibt es für die Zellteilung, sowie die Zellstreckung ein 2,4-D Optimum. Das Optimum der 2,4-D Menge bezüglich der Zellteilung war bei den BY-2 Zellen bei 16  $\mu\text{M}$  noch nicht erreicht (Abb. 55). Eine zu geringe Konzentration an 2,4-D verhindert die Teilung eines großen Anteils an Zellen, der Zellzyklus der sich teilenden Zellen findet mit deutlicher Verzögerung statt (Abb. 57).

Etwas problematisch ist die Abgrenzung zwischen der 2,4-D Wirkung und der Effekte, die durch endogen synthetisiertes IES bewirkt werden. Generell gibt es Unterschiede in der Wirkung von 2,4-D und IES (Ottenschläger et al.; 2002, Imhoff et al.; 2000). Diskutiert wird unter anderem, dass 2,4-D die endogene IES-Synthese induziert, so dass 2,4-D nur indirekt als Auxin wirksam wird. Tatsächlich

produzieren die BY-2 Zellen IES (50 pmol/g FW), wobei die endogenen Konzentrationen keine dem Cytokinin vergleichbaren Schwankungen im Zellzyklusverlauf aufwiesen (Redig et al. 1996). Ob 2,4-D selbst oder über den endogenen IES-Metabolismus wirksam wird, konnte in dieser Arbeit nicht geklärt werden, denn der Ersatz von 2,4-D durch IES gelang nicht – die Zellen starben rasch nach der Zufuhr von 0,1  $\mu\text{M}$  IES ab. Ähnliche Reaktionen auf die Zufuhr von IES zeigen auch anderen Zellkulturen, z.B. *Chenopodium rubrum* (Erwin Beck, Universität Bayreuth, pers. Mitteilung). Unklar ist dabei, warum die Zellen nach IES-Behandlung sterben. Möglicherweise wird das zugegebene IES abgebaut und in den starken Hemmstoff Oxindol umgewandelt. Auf Grund der Unmöglichkeit 2,4-D durch IES zu ersetzen konnte eine Variabilität des Auxinsignals ausschließlich über die Veränderung der 2,4-D Menge im Medium erreicht werden.

Ohne 2,4-D findet keine Teilung statt, was durch die stark reduzierte, bzw. nicht vorhandene Expression der Cycline D2;1 und D3;2 unterstrichen wird (Abb. 59). Ob die Menge an 2,4-D die Expression der Cycline direkt beeinflusst, kann nicht mit letzter Sicherheit gesagt werden. Der negative Effekt auf die Cyclin-Expression könnte ebenso indirekt, als Folge der Hemmung Zellteilunginduktion und der einsetzenden Differenzierung zustande kommen. Es gibt allerdings einige Hinweise, dass Auxinsignale sowohl in der G1- als auch in der G2-Phase des Zellzyklus benötigt werden (Koens et al.; 1995). Alternativ dazu wird die Vorstellung vertreten, dass Auxin eher indirekt auf den gesamten Zellzyklus wirkt (Everett et al.; 1981). Unabhängig von der Frage, ob die Wirkung nun direkt oder indirekt eintritt, wird durch diese Untersuchungen deutlich, dass eine optimale Menge an Auxin ein essentielles Signal für den Zellzyklus darstellt und im Sinne einer vorgelagerten Kontrolle die Expression von Zellzyklus-Kontrollgenen steuert.

#### **4.2.5 Der „cross-talk“ der Signale findet auf verschiedenen Ebenen statt**

Mitogene Signale müssen für eine effektive Regulation des Zellzyklus sinnvoll verknüpft sein, damit eine Entscheidung über die Induktion und den Fortgang der Teilung an die jeweiligen physiologischen Gegebenheiten angepasst werden kann. Nur wenn genügend Zucker als Baustoff und Energielieferant vorhanden ist, beginnt die Zelle sich zu teilen. Darüber hinaus reguliert ein ausgewogenes Verhältnis zwischen Auxin und Cytokinin die Abgrenzung von Teilung und Differenzierung (Frank et al.; 2000). In der Realität sind die Prozesse allerdings noch wesentlich komplizierter, denn sowohl Auxin als auch Cytokinine besitzen noch zusätzliche Funktionen innerhalb der Zelle (Miyazawa et al.; 2002; Zazimalova et al.; 1996; Yang et al.; 2002). Hinzu kommt der mögliche Einfluss weiterer Hormone wie Ethylen, GA, ABA, JA und von Brassinosteroiden, deren Bedeutung auf die meristematische Aktivität allerdings eher gewebe- oder entwicklungspezifisch sein dürfte. Auf Grund der molekularbiologisch noch wenig bekannten Signaltransduktionswege des Zucker-, Auxin- und Cytokininsignals sind die Komponenten der Signalverknüpfung schwierig zu identifizieren. Als Modell könnte man von den Cyclinen ausgehen, welche die Aktivität der Cdk steuern. Die Expression der in dieser Arbeit untersuchten D-, A- und B-Cycline wird sowohl vom Zucker-, Cytokinin- und

Auxinsignal beeinflusst (Tab. 16), während die Expression der Cdk2a und CdkB1-1 davon unbeeinflusst ist. Richard et al. (2002) untersuchten ebenfalls den Einfluss von Zucker-, Cytokinin- und Auxinsignalen auf die Expression verschiedener Zellzyklus-Kontrollgene in einer *Arabidopsis*-Zellkultur. Auch in dieser Arbeit gab es wenige Gene, deren Expression nur von einem Signal reguliert wurde. Die meisten Gene wurden im unterschiedlichen Maße von allen drei Signalen beeinflusst. Das Zusammentreffen vieler Signale an dieser Stelle wird auch an der Struktur des Promotors von Cyclinen, Cdk und Inhibitoren deutlich. Es finden sich sowohl Auxin-, GA-, Ethylen- als auch ABA-responsive *cis*-Elemente im Promotor (Richard et al.; 2002). Bei den in dieser Arbeit untersuchten Genen überwiegt bei den Cyclinen D2;1, D3;2 und A3;2 die Regulation der Expression durch das Zuckersignal. Die Expression des Cyclins D3;1 wird vor allem vom Cytokinin signal gesteuert. Interessant ist darüber hinaus, dass D2;1 zwar positiv auf Zucker, aber negativ auf zusätzliches Cytokinin reagiert, während die Expression des Cyclins D3;1 genau entgegengesetzt reguliert wird. Diese Art der Regulation könnte für die Zellen eine wichtige Möglichkeit der Signalverknüpfung darstellen. Eventuell muss ein bestimmtes Mengenverhältnis von D2- und D3-Cyclinen, die dann das Verhältnis von Zucker- und Cytokininsignal widerspiegeln, zur vollständigen Aktivierung der Cdk vorhanden sein. Ähnliches könnte für die verschiedenen A-Cycline gelten, von denen hier allerdings nur das Cyclin A3;2 untersucht wurde. Das Auxinsignal scheint bei den BY-2 Zellen eine eher grundlegende Bedeutung zu besitzen, die in der Verhinderung von Differenzierungsprozessen besteht. Ein fehlendes Auxinsignal führt zur starken Hemmung der Expression aller untersuchten Zellzyklusgene, weil Differenzierungsvorgänge eingeleitet werden. Neben der Signalverknüpfung auf der Ebene der Cycline, existieren noch weitere Ebenen auf denen „cross-talk“ zwischen Signalen stattfindet. In dieser Arbeit wurde zum Beispiel der Einfluss eines veränderten Cytokininsignals auf die Spaltung der Saccharose durch Invertase, bzw. die Aufnahme der Zucker, untersucht (Abb. 60). Roitsch & Gonzalez (2004) beschrieben, dass die Expression der extrazelluläre Invertase durch Cytokinin verstärkt werden kann. Auch in dieser Arbeit konnte ein Effekt des Cytokininsignals auf die Invertase-Aktivität gezeigt werden. Allerdings führt in BY-2 Zellen die externe Verstärkung des Cytokininsignals zu verminderter Invertase-Aktivität und erniedrigtem Monosaccharid-Verbrauch (Abb. 60). Demnach scheint der generell negative Einfluss eines extrazellulären Cytokininsignals bei Zellkulturen aus Wurzelgewebe, im Gegensatz zu solchen aus Sprossgeweben, nicht nur den Ablauf des Zellzyklus, sondern auch die Bereitstellung und Aufnahme von benötigten Kohlenhydraten zu betreffen. Diese Tatsache könnte auch erklären, warum die Hemmung des Zellzyklus durch Z bei gleichzeitigem Vorhandensein von Zucker im Medium verstärkt wird (Tab. 15).

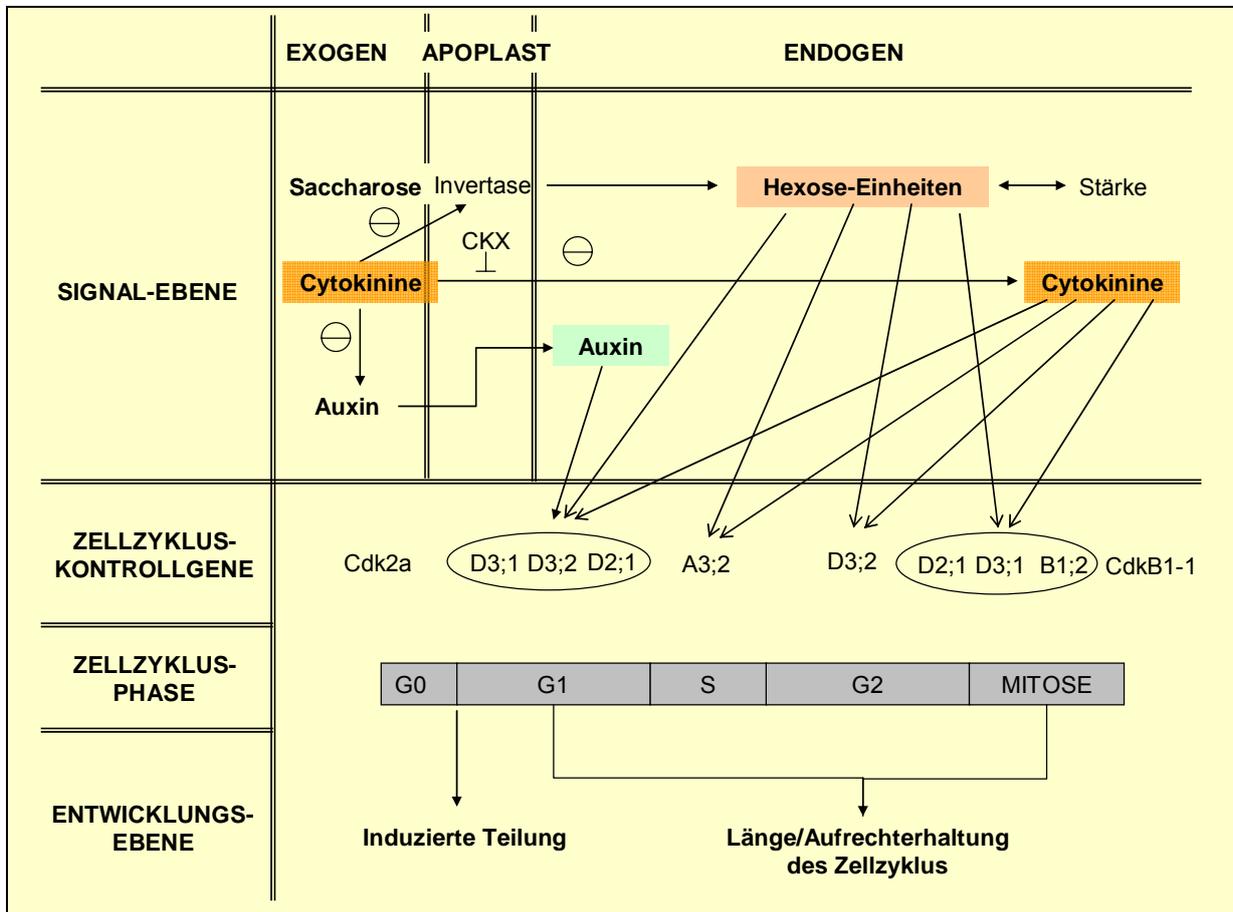
### 4.3 Schlussbetrachtungen

In den vergangenen Jahren wurden, zumeist auf der Basis von Sequenzhomologien zu tierischen Komponenten, eine Reihe von Zellzyklus-Kontrollgenen, Cycline, Cdk, CAK's, Inhibitoren, Phosphatasen, E2F und pRb in Pflanzen, identifiziert (Dewitte & Murray; 2003). Über die Funktion der entsprechenden Genprodukte im regulatorischen Netzwerk des Zellzyklus gibt es noch wenig gesicherte Kenntnisse. Besonders die Effekte der zahlreichen potentiellen intrazellulären und extrazellulären Signale, bzw. deren „cross-talk“ sind schwer zu einem Gesamtbild zusammenzufügen. Die Verknüpfung von wichtigen Signalen und deren Feinabstimmung zur Regulation der Zellteilungsaktivität in Meristemen, den so genannten „utilization sinks“, ist noch weitgehend Neuland. In dieser Arbeit sollte die Wechselwirkung essentieller mitogener Signale am Modell der BY-2 Zellkultur, die einem Wurzelmeristem entstammt und in physiologischer Hinsicht entsprechen sollte, untersucht werden. Fokussiert waren die Untersuchungen auf den Effekt von Zuckern und auf die regulatorische Bedeutung der Phytohormone der Cytokinin-Familie und des Auxins. Zucker als Metabolit ist als Energiequelle und Baustoff für die Zellteilung essentiell, spielt aber auch als Signal über die Steuerung der Cyclin D2-Expression eine Rolle (Riou-Khamlichi et al.; 2000). Auch Cytokinine und Auxine sind als mitogene Signale grundlegend in die Regulation des Zellzyklus involviert. Sie interagieren bei der Regulation von Expression und Aktivität der Cdk2a am G1/S-Übergang (John et al.; 1993) und am G2/M-Übergang. Cytokinin spielt darüber hinaus eine Rolle während der S-Phase und bei der Aktivierung der Cdc25-ähnlichen Phosphatase, die am G2/M-Übergang den Kinase/Cyclin-Komplex aktiviert (Zhang et al.; 2005). Auxin ist im Gegensatz dazu bei der Blockierung von Inhibitoren und an der Regulation des Cyclinabbau's über den Ubiquitin-Proteosom-Weg beteiligt (del Pozo & Estelle; 1999). Einige wenige Untersuchungen weisen auf einen „cross-talk“ des Cytokinin- und Auxinsignals mit dem Zuckersignal hin. Cytokinine aktivieren sowohl die extrazelluläre Invertase als auch Hexosetransporter der Plasmamembran, und verbessern auf diese Weise die Zuckeraufnahme (Roitsch & Ehneß; 2000).

In Abb. 62 werden die in dieser Arbeit gewonnen Erkenntnisse zusammengefasst und der „cross-talk“ der Signale verdeutlicht. Die Zuckereffekte werden vom intrazellulären Spiegel an Monosacchariden bestimmt, wobei Glukose und Fruktose gleichermaßen wirksam sind. Der Zuckerspiegel reguliert die Expression der Cycline D2;1, D3;2, A3;2, B1;2 und D3;1, während die Expression der Cdk2a und CdkB1-1 nicht beeinflusst wird. Die Effekte sind zeitliche Veränderungen bei der Teilungsinduktion und der Länge der S- und G2-Phase des Zellzyklus. In der Folge verändert sich die gesamte Dauer des Zellzyklus. Bedeutsam an diesen Erkenntnissen ist, dass Zucker nicht nur als mitogenes Signal am Beginn der Teilung, sondern auch noch an anderen Stellen, z.B. an der Expression von S-Phasen-, bzw. Mitose-spezifischen Cyclinen, regulatorisch beteiligt ist.

Die Zugabe von Cytokinin bewirkt eine zeitliche Verzögerung, bzw. Hemmung des Zellzyklus der BY-2 Zellen. Dies ist umso erstaunlicher, als Cytokinine ihrer Bezeichnung nach die Cytokinese

fördern. Die verschiedenen Cytokinine besitzen offenbar spezifische Funktionen, denn die Hemmung manifestiert sich nach *t*-Zeatin-Zugabe am S/G2-Übergang, die durch DHZ-Zugabe am G2-M/G1-Übergang. *t*-Zeatin beeinflusst die Expression der Cycline D3;1, D3;2, A3;2, B1;2 und D2;1, während die Expression der Cdk2a und CdkB1-1 nicht beeinflusst wird.



**Abb. 62: Modell der Verknüpfung der Zucker-, Cytokinin- und Auxinsignale bei der Regulation des Zellzyklus der BY-2 Zellen.**

⊖ - hemmender Einfluss; ⊥ - Abschwächung eines Effektes

Der endogene Cytokininspiegel der Cytokinin-autotrophen BY-2 Zellen zeigt auffällige Oszillationen im Verlauf des Zellzyklus, wobei die Konzentration mehrere Cytokinine unmittelbar vor jedem Phasen-Übergang ansteigt, während dazwischen kaum Cytokinine nachweisbar sind. Da die Aktivität der CKX ebenfalls Oszillationen aufweist, scheint nicht nur die Biosynthese sondern auch der Abbau von Cytokininen die oszillierenden Cytokininlevel zu erzeugen. Die Zugabe von Cytokininen und die Hemmung der Biosynthese durch Lovastatin führen zur Veränderung der Expressionsmuster der Cycline und in der Folge zur Veränderungen der Zellzyklusgeschwindigkeit. Die Abhängigkeit dieser Effekte vom Zugabezeitpunkt legt die Vermutung nahe, dass die Cytokininan- und Abreicherung den

Austausch von Phasen-bestimmenden Cyclinen an den Cdk auslösen und so phasenspezifische Funktionen dieser Kinasen ermöglichen.

Zur Induktion der Zellteilung benötigen die BY-2 Zellen eine bestimmte externe Konzentration von Auxin. Eine zu geringe Auxinkonzentration führt über die stark reduzierte Verringerung der Expression der Cycline D2;1 und D3;2 zum Erlöschen der Teilungsaktivität und zur Einleitung der Zelldifferenzierung. In diesem Sinne reguliert das externe Auxinsignal die Abgrenzung zwischen Zellteilung und Differenzierung und damit den G1/G0-Übergang.

Die Interaktion der Hormonsignale mit den Zuckereffekten erfolgt auf verschiedenen Ebenen. Auf der Ebene der Signalentstehung beeinflusst Cytokinin die Aktivität der Invertase und die Hexoseaufnahme. Zudem muss es eine Wechselwirkung zwischen Auxin und Cytokinin geben, denn der hemmende Effekt externer Cytokinine wird in Anwesenheit von Auxin verstärkt. Auf der Ebene der Zellzyklus-Kontrollgene erfolgt die Verknüpfung durch die gemeinsame Beeinflussung der Expressionsstärke der Cycline. Auxin hat dabei eine offenbar vorgeschaltete Funktion. Es gibt Cycline, deren Expression sowohl vom Zucker, als auch vom Cytokinin gleichermaßen reguliert wird. Zu diesen zählen die Cycline D3;2 und A3;2. Die Cycline D3;1 und D2;1 werden im Unterschied dazu antagonistisch gesteuert. Während das Cyclin D3;1 auf Cytokinin positiv und auf Zucker negativ reagiert, ist dies beim Cyclin D2;1 genau entgegengesetzt. Auf diese Weise könnte die Zelle über Expressionsstärke und Abbau der D-Cycline das Zucker- und Cytokinin signal gleichermaßen wahrnehmen. Aus den in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnissen lässt sich schlussfolgern, dass die Verknüpfung der Signale im Sinne eines Netzwerks auf verschiedenen Ebenen stattfindet, die letztlich in der Regulation der Expression der Cycline im Zellzyklus zusammenfließen.

Ausgehend von diesen neu gewonnenen Erkenntnissen könnte eine vergleichende Analyse der Zellzyklus-Regulation von Spross- und Wurzelmeristemen mögliche Unterschiede bezüglich der Funktion der Cytokinine aufklären. Im Rahmen der Arbeit wurden zudem Überexpressions- und Gensilencing Mutanten des Cyclin D2 und der Cdk2a hergestellt, die nach vorläufigen Untersuchungen interessante Phänotypen zeigen. Besonders wichtig ist dabei, dass die Überexpression des Cyclin D2;1 zu einer starken Hemmung des Zellzyklus und zur Polyploidie führt. Die weiterführenden Analysen dieser Zelllinien könnten zur Aufklärung der Funktion dieser Zellzyklusgene beitragen.

## 5 Zusammenfassung

Die Phytohormone Cytokinin und Auxin sind essentiell für die Zellteilungsaktivität in meristematischen Geweben. Trotz ihrer zentralen Bedeutung im pflanzlichen Zellzyklus, ist über deren Bedeutung und Wirksamkeit auf molekularer Ebene bisher nur wenig bekannt. Einige Untersuchungen deuten darauf hin, dass mit Hilfe hormoneller Signale die Zellteilungsaktivität der Meristeme an die physiologischen Gegebenheiten der gesamten Pflanze angepasst wird, und auf diese Weise der Verbrauch an Zucker, die sogenannte Sinkstärke des Meristems definiert wird. Besonders bedeutsam ist deshalb der „cross-talk“ der hormonellen Signale mit den metabolischen Signalen. Da diese Signalverknüpfung bisher kaum Ziel wissenschaftlicher Untersuchungen war, sollte diese Arbeit zur Aufklärung beitragen.

Die Untersuchungen wurden mit einer Tabak Zellkultur (BY-2) durchgeführt, die als Modell eines Wurzelmeristems dienen sollte. Ein großer Vorteil dieser Zellkultur ist die Möglichkeit, den Zellzyklus der Zellen durch auswaschbare Hemmstoffe synchronisieren zu können. Mit Aphidicolin, einem Inhibitor der DNA-Polymerase  $\alpha$ , konnte in dieser Arbeit eine Synchronität von 80 % erreicht werden. Dieser hohe Synchronisierungsgrad eröffnete die Möglichkeit, die Effekte von Cytokinen, Auxinen und Zucker auf den Ablauf des Zellzyklus mittels Durchfluscytometrie untersuchen zu können, in dem Qualität und Quantität dieser Faktoren variiert wurde. Parallel dazu wurde die Expression von Zellzyklus-Kontrollgenen (D-, A-, B-Cycline; *Cyclin dependent kinase 2a*; *Cyclin dependent kinase B1-1*) mittels semiquantitativer *Reverse-transcription-PCR* analysiert und entsprechend responsive Gene identifiziert. Ergänzt wurden die Untersuchungen der Regulation des Zellzyklus durch längerfristige Beobachtungen der Entwicklung der Zellzahl, des Frischgewichtes und des Volumens der Zellen. Zur Charakterisierung der Signalentstehung, wurden die extrazellulären und intrazellulären Konzentrationen der die Zellteilung steuernden Faktoren gemessen.

Es zeigte sich, dass die Teilung der BY-2 Zellen von einer optimalen Auxinkonzentration im Medium und einem bestimmten intrazellulären Zuckerspiegel abhängig ist. Eine zu geringe Auxinkonzentration im Medium führt zur Differenzierung der Zellen. Unerwartet war die hemmende Wirkung von zusätzlichem Cytokinin, dessen Bezeichnung sich ja ursprünglich von der Stimulierung der Cytokininese ableitete. Im Gegensatz zu sproßbürtigen Geweben, die auf externe Cytokininsignale angewiesen sind und in denen Cytokine die Zuckeraufnahme verbessern, reagierten die wurzelbürtigen BY-2 Zellen entgegengesetzt. Dieses Ergebnis deutet auf eine grundlegend verschiedene Regulation des pflanzlichen Zellzyklus durch Cytokine in Wurzel und Sproß hin. Charakteristisch für die G1-Phase der BY-2 Zellen ist die Expression der drei D-Cycline: D3;1, D3;2 und D2;1, für die S-Phase die Expression des Cyclins A3;2, für die G2-Phase eine erneute Induktion des Cyclins D3;2 und für den Übergang zur Mitose die Expression der Cycline: B1;2, D2;1 und D3;1. Die Expression der Cdk2a ist im Verlauf des Zellzyklus nahezu konstant, während die Expression der CdkB1-1 während des G2/M-Übergangs zunimmt.

Die Analyse des endogenen Cytokininspiegels ergab, dass die Konzentration mehrerer Cytokinine im Verlauf des Zellzyklus oszilliert. Cytokinianreicherungen befanden sich unmittelbar vor jedem Zellzyklusübergang, während Cytokinine im übrigen Zellzyklus kaum nachweisbar waren. Diese Cytokininan- und Abreicherungen werden durch variierende Biosyntheseaktivität, aber auch durch Veränderungen des Abbaus über die Cytokinin Oxidase/Dehydrogenase erzeugt. Die Modifikation dieser Cytokininoszillationen (Verringerung der Cytokinianreicherung; Verzögerung der Abreicherung) bewirkte eine Veränderung des phasenspezifischen Expressionsmusters der Cycline und die Verzögerung des entsprechenden Phasenüberganges. Diese Beobachtung legte den Schluß nahe, dass An- und Abreicherungen spezifischer Cytokinine den Austausch der Cycline an den beiden Cdk und den damit verbundenen Übergang von einer Phase zur nächsten steuern.

Durch Variation des Zuckerangebots wurde deutlich, dass Zucker im Bezug auf den Zellzyklus nicht nur metabolische Funktion hat, sondern auch ein wichtiges Signal für die Progression des Zellzyklus' darstellt, welches die Expression aller untersuchten Cycline beeinflusst. Die Cycline D2;1, A3;2, D3;2 und B1;2 werden bei erhöhtem Zuckerangebot stärker exprimiert, während die Expression des Cyclin D3;1 verringert wird. Die Expression der Cdk2a und CdkB1-1 scheint vom Zuckersignal unabhängig zu sein. Die Cytokininkonzentration beeinflusst die Expressionsstärke bestimmter Cycline. So wird die Expression der Cycline D3;1, D3;2 und A3;2 durch Cytokinin verstärkt, während die Expression des Cyclins D2;1 abgeschwächt wird. Auxin wird den BY-2 Zellen in Form von 2,4-D im Medium angeboten; es beeinflusst den Zellzyklus entweder direkt oder – wahrscheinlicher - indirekt über die Steuerung des endogenen Auxinhaushaltes. Bei fehlendem Auxinsignal im Medium unterbleibt die Expression der Cycline D3;2 und D2;1 und die Differenzierung der Zellen, d.h. der Übergang der Zellen von der G1- in die G0-Phase wird eingeleitet.

Der „cross-talk“ der untersuchten Cytokinin-, Auxin- und Zuckersignale findet auf verschiedenen Ebenen statt. Auf der Ebene der Signalentstehung beeinflusst Cytokinin im Medium eine Hemmung der apoplastischen Invertaseaktivität und eine verminderte Hexoseaufnahme. Die direkte Verknüpfung von Zucker- und Cytokinin- und Auxinsignalen findet auf der Ebene der Expression der Cycline statt. Die Cycline D3;2 und D2;1 werden nur bei ausreichender Auxinversorgung exprimiert. Des weiteren wird die Expression der untersuchten D-, A- und B-Cycline sowohl vom Zuckerangebot, als auch vom Cytokininsignal reguliert, während die Expression der Cdk2a und CdkB1-1 nicht beeinflusst werden. Dabei finden sich sowohl synergistische Regulationen, wie bei den Cyclinen D3;2, A3;2 und B1;2, als auch antagonistische Regulationen, wie bei den Cyclinen D3;1 und D2;1.

Die wichtigsten Erkenntnisse dieser Arbeit sind:

- Es gibt grundlegende **Unterschiede** der Regulation des Zellzyklus durch Cytokinine in **Wurzel- und Sprossmeristemen** (Cytokininzufuhr fördert im Spross und hemmt in der Wurzel die Zellteilung)
- Der endogene **Zuckerspiegel hat Signalfunktion** und nimmt, über die Expression der Cycline Einfluss auf alle Zellzyklusphasen
- **Auxin** induziert die Teilung, der Mangel an Auxin führt zum Arrest des Zellzyklus und zur **Differenzierung** der Zellen
- Die endogenen **Cytokininkonzentrationen oszillieren im Verlauf des Zellzyklus**, wobei maximale Konzentrationen jeweils unmittelbar vor jedem Phasenübergang auftreten
- Die Cytokinin An- und Abreicherungen besitzen regulatorische Funktionen: Sie induzieren den **phasenspezifischen Austausch der Cycline an den Cdk**
- Der „**cross-talk**“ **zwischen Zucker-, Cytokinin- und Auxinsignal** findet auf der Ebene der Signalentstehung (Cytokinin – Zuckerverfügbarkeit) und der Ebene der Expression der Cycline statt (Auxin induziert Expression; Cytokinin- und Zuckerkonzentration steuert Expressionsstärke der Cycline D3;2, A3;2 und B1;2 synergistisch und der Cycline D3;1 und D2;1 antagonistisch)

## 6 Summary

Cytokinins and auxins are essential for the cell division activity of plant meristems. Although these phytohormones play a central role in the plant cell cycle, little is known about how they act on the molecular level. Some investigations have suggested that hormonal signals serve to adjust the cell division activity of the meristems to the physiological situation of the plant as a whole, and that this determines the demand for carbohydrate, or sink strength, of the meristems. The "cross-talk" between hormonal and metabolic signals is particularly important in this regard. The present study aims to elucidate this "cross-talk", which has hardly been subjected to any scientific investigation up to the present.

The investigations were carried out with a cell culture of tobacco (BY-2), which serves as a model for a root meristem. An important advantage of this cell culture is that the cell cycle of the component cells can be synchronized with inhibitors that can be removed by washing. The cell cycle could be synchronized to an extent of 80% in the present study with the use of aphidicholine, an inhibitor of DNA polymerase  $\alpha$ . This high degree of synchronicity enabled the effects of different species and amounts of cytokinins, auxins and sugars on the progression of the cell cycle as measured by flow cytometry to be investigated. In parallel, the expression of cell cycle control genes (D-, A- and B-cyclins and the cyclin-dependent kinases Cdk2a and CdkB1-1) was analyzed by semi-quantitative reverse-transcription-PCR and genes responsive to the treatments were identified. The extracellular and intracellular concentrations of the factors which control cell division were measured to characterize how the controlling signals originate. The studies as to cell cycle regulation were complemented by long-term observations as to the development of cell number, cell volume and cell fresh weight.

The division of the BY-2 cells was shown to be dependent on an optimum concentration of auxin in the culture medium and on a specific intracellular sugar level. A deviation from the optimal auxin concentration inhibits cell division and leads to a differentiation of the cells. Application of exogenous cytokinin led to an inhibition of cell division. This was unexpected, in that the term "cytokinin" was originally derived from observations of the stimulation of cytokinesis. The reaction of the cells of the BY-2 culture, which originates from root tissue, to cytokinin is the opposite of that of tissues originating from the shoot, which require external cytokinin signals and in which cytokinins improve sugar uptake. This points to a fundamental difference in the regulation of the cell cycle by cytokinins in roots and shoots.

The expression of the three D-cyclins D3;1, D3;2 and D2;1 is characteristic of the G1-phase of the BY-2 cells, and that of cyclin A3;2 is typical of the S-phase. A renewed induction of cyclin D3;2 expression characterizes the G2-phase, and the expression of the cyclins B1;2, D2;1 and D3;1 is typical of the transition to mitosis. The expression of the cyclin-dependent kinase Cdk2a remains nearly constant throughout the course of the cell cycle, whereas that of CdkB1-1 increases during the G2 to M transition.

Analysis of the endogenous cytokinin level showed that the concentration of several cytokinin species oscillated during the course of the cell cycle. Cytokinins were found to increase in amount immediately prior to each transition from one cell cycle phase to the subsequent phase, whereas they were scarcely detectable otherwise. The increases and decreases in cytokinin concentration are due to differences in the activities of both the biosynthesis of the phytohormone and its degradation by cytokinin oxidase/dehydrogenase. Modifications of the cytokinin oscillations (e.g. decreases in the amount of cytokinin accumulated, delay in the depletion of the accumulated amounts) led to changes in the phase-specific expression patterns of the cyclins and in the delay of the corresponding phase transitions. This observation indicates that the accumulation and depletion of specific cytokinins control the exchange of the cyclins on the two cyclin-dependent kinases and the associated transitions from one cell cycle phase to the next.

Varying the sugar supply to the cells revealed that sugar does not have merely a metabolic function in the cell cycle, but that it also constitutes an important signal for the progression of the cell cycle which influences the expression of all investigated cyclins. The cyclins D2;1, A3;2, D3;2 and B1;2 are all expressed more strongly upon increased sugar supply, whereas the expression of the cyclin D3;1 decreases. The expression of Cdk2a and CdkB1-1 does not appear to be influenced by the sugar signal. The concentration of cytokinin has an influence on the extent of expression of specific cyclins: the expression of D3;1, D3;2 and A3;2 is increased by cytokinin, whereas that of the cyclin D2;1 is decreased. Auxin is supplied to the cells in the medium in the form of 2,4-D: it affects the cell cycle either directly or - more probably - indirectly via influencing the endogenous auxin budget. The lack of an auxin signal from the medium results in no expression of the cyclins D3;2 and D2;1 and in the differentiation of the cells, i.e. the transition from the G1- to the G0-phase is initiated.

The "cross-talk" between the investigated cytokinin, auxin and sugar signals takes place on various levels. On the level of signal formation, cytokinin effects an inhibition of apoplastic invertase activity and a decreased hexose uptake. The direct integration of the sugar, cytokinin and auxin signals takes place on the level of cyclin expression. The cyclins D3;2 and D2;1 are only expressed when the auxin supply is adequate. The expression of the investigated D-, A- and B-cyclins is regulated by both the sugar supply and the cytokinin signal, whereas the expression of Cdk2a and CdkB1-1 is not influenced by these factors. Sugar and cytokinin act to regulate cyclin expression both synergistically, as with the cyclins D3;2, A3;2 and B1;2, and antagonistically, with the cyclins D3;1 and D2;1.

The most important findings of this work are:

- There are fundamental differences in the regulation of the cell cycle by cytokinins in root and shoot meristems. Cytokinin application promotes cell division in the shoot and inhibits it in the root
- The endogenous sugar level has signal function and influences all phases of the cell cycle via the expression of cyclins
- Auxin induces cell division; auxin shortage leads to the arrest of the cell cycle and to cell differentiation
- Endogenous cytokinin concentrations oscillate during the course of the cell cycle. The maximum cytokinin concentrations are reached immediately prior to each phase transition
- Cytokinin accumulation and depletion have regulatory functions. They induce phase-specific exchange of cyclins at the cyclin-dependent kinases
- "Cross-talk" between sugar, cytokinin and auxin signals takes place on the level of signal formation (cytokinin - sugar availability) and on the level of cyclin expression. Auxin induces cyclin expression; cytokinin and sugar concentrations control the expression rate of the cyclins D3;2, A3;2 and B1;2 synergistically and that of the cyclins D3;1 and D2;1 antagonistically

## 7 Literatur

- Beck, E. (1996). Regulation of shoot/root ratio by cytokinins from roots in *Urtica dioica*. Opinion. Plant and Soil 185: 3-12
- Bergmeyer, H.U. & Bernt, E. (1974). Sucrose. In Bergmeyer, H.U., eds., Methods of Enzymatic Analysis II (3). Verlag Chemie, Weinheim, Academic Press, New York
- Berthels, N.J., Cordero Otero, R.R., Bauer, F.F., Thevelein, J.M. & Pretorius, I.S. (2004). Discrepancy in glucose and fructose utilisation during fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast strains. FEMS Yeast Research 4: 683-689
- Bhojwani, S.S. & Razdan, M.K. (1983). Cell culture. In Bhojwani, S.S. & Razdan, M.K., eds., Plant tissue culture: Theory and Practice. Elsevier, Amsterdam u.a., 63 ff
- Blagoeva, E., Dobrev, P.I., Malbeck, J., Motyka, V., Strnad, M., Hanus, J. & Vankova, R. (2004) Cytokinin N-glucosylation inhibitors suppress deactivation of exogenous cytokinins in radish, but their effect on active endogenous cytokinins is counteracted by other regulatory mechanisms. Plant Physiology 121(2): 215-222
- Bürkle, L., Cedzich, A., Döpke, D., Stransky, H., Okumoto, S., Gillissen, B., Kühn, C. & Frommer, W. B. (2003) Transport of cytokinins mediated by purine transporters of the PUP family expressed in phloem, hydathodes, and pollen of *Arabidopsis*. Plant Journal 34: 13-26
- Büttner, M. & Sauer, N. (2000) Monosaccharide transporters in plants: structure, function and physiology. Biochimica et Biophysica Acta 1465: 263-274
- Chen, C.-m. (1997) Cytokinin biosynthesis and interconversion. Physiologia Plantarum 101: 665-673
- Cockcroft, C.E.; den Boer, B.G.W., Healy, J.M.S. & Murray, J.A.H. (2000) Cyclin D control of growth rate in plants. Nature 405: 575-579
- Cohen, J.D., Slovin, J.P. & Hendrickson, A.M. (2003) Two genetically discrete pathways convert tryptophan to auxin: more redundancy in auxin biosynthesis. Trends in Plant Science 8(5): 197-199
- Coenen, C. & Lomax, T.L. (1997) Auxin-cytokinin interactions in higher plants: old problems and new tools. TRENDS in Plant Science 2(9): 351-354
- Colon-Carmona, A.; You, R.; Haimovitch, T. & Doerner, P. (1999) Spatio-temporal analysis of mitotic activity with a labile cyclin-GUS fusion protein. The Plant Journal 20(4): 503-508
- Criqui, M.C.; Parmentier, Y.; Derevier, A.; Shen, W.-H.; Dong, A. & Genschik, P. (2000) Cell cycle-dependent proteolysis and ectopic overexpression of cyclin B1 in tobacco BY2 cells. The Plant Journal 24(6): 763-773
- Crowell, D.N. & Salaz, M.S. (1992) Inhibition of growth of cultured tobacco cells at low concentrations of Lovastatin is reversed by cytokinin. Plant Physiology 100: 2090-2095
- Del Pozo, J.C. & Estelle, M. (1999) Function of the ubiquitin-proteasome pathway in auxin response. Trends in Plant Science 4(3): 107-111

- Dewitte, W. & Murray, J.A.H. (2003) The plant cell cycle. *Annual Review of Plant Biology* 54: 235-264
- Dobrev, P., Motyka, V., Gaudinova, A., Malbeck, J., Travnickova, A., Kaminek, M. & Vankova, R. (2003) Transient accumulation of *cis*- and *trans*-zeatin type cytokinins and its relation to cytokinin oxidase activity during cell cycle of synchronized tobacco BY-2 cells. *Plant Physiology and Biochemistry* 40: 333-337
- Estelle, M. (2001) Plant hormones. Transporters on the move. *Nature* 413(6854):374-375
- Everett, N., Whang, T. & Street, H. (1981) Studies on the control of the cell cycle in cultured plant cells. II. Effect of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D). *Protoplasma* 106: 16-22
- Fernie, A.R., Roessner, U. & Geigenberger, P. (2001) The sucrose analog palatinose leads to a stimulation of sucrose degradation and starch synthesis when supplied to discs of growing potato tubers. *Plant Physiology* 125(4):1967-1977
- Fountain, M. (2000) Zellteilungszyklus und Altern in einer Suspensionskultur von *Chenopodium rubrum*. Dissertation Lehrstuhl Pflanzenphysiologie, Universität Bayreuth
- Francis, D. & Sorrell, D.A. (2001) The interface between the cell cycle and plant growth regulators: a mini review. *Plant Growth Regulation* 33: 1-12
- Frank, M., Rupp, H.-M., Prinsen, E., Motyka, V., van Onckelen, H. & Schmölling, T. (2000) Hormone autotrophic growth and differentiation identifies mutant lines of *Arabidopsis* with altered cytokinin and auxin content or signalling. *Plant Physiology* 122: 721-729
- Frebort, I., Sebela, M., Galuszka, P., Werner, T., Schmölling, T. & Pec, P. (2002) Cytokinin oxidase/cytokinin dehydrogenase assay: optimized procedure and applications. *Analytical Biochemistry* 306: 1-7
- Frebortova, J., Fraaije, M.W., Galuszka, P., Sebela, M., Pec, P., Hrbac, J., Novak, O., Bilyeu, K.D., English, J.T. & Frebort, I. (2004) Catalytic reaction of cytokinin dehydrogenase: preference for quinones as electron acceptors. *Journal of Biochemistry* 380:121-30
- Friml, J., Benkova, E., Blilou, I., Wisniewska, J., Hamann, T., Ljung, K., Woody, S., Sandberg, G., Scheres, B., Jurgens, G. & Palme, K. (2002) AtPIN4 mediates sink-driven auxin gradients and root patterning in *Arabidopsis*. *Cell* 108(5):661-673
- Gaff, D.F. & Okong'o-Ogola, O. (1971) The use of non-permeating pigments for testing the survival of cells. *Journal of Experimental Botany* 22: 756-758
- Gerlach, D. (1984) Botanische Mikrotechnik. Eine Einführung. 3. Auflage. Georg Thieme Verlag, Stuttgart
- Gillissen, B., Burkle, L., Andre, B., Kuhn, C., Rentsch, D., Brandl, B. & Frommer, W.B. (2000) A new family of high-affinity transporters for adenine, cytosine, and purine derivatives in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 12(2):291-300
- Goddijn, O. & Smeekens, S. (1998) Sensing trehalose biosynthesis in plants. *Plant Journal* 14(2):143-6

- Guilfoyer, T.; Hagen, G., Ulmasov, T. & Murfett, J. (1998) How does auxin turn on genes? *Plant Physiology* 118: 341-347
- Halford, N.G.; Purcell, P.C. & Hardie, D.G. (1999) Is hexokinase really a sugar sensor in plants? *Trend in Plant Science* 4(3): 117-119
- Hecht, S.M., Bock, R.M., Schmitz, R. Y., Skoog, F. & Leonhard, N.J. (1971) Cytokinins: Development of a potent antagonist. *PNAS* 68(10): 608-2610
- Hemmerlin, A. & Bach, T. (1998) Effects of mevinolin on cell cycle progression and viability of tobacco BY-2 cells. *The Plant Journal* 14(1): 65-74
- Houssa, C., Bernier, G., Pieltain, A., Kinet, J.M. & Jaquard, A. (1994) Activation of latent DNA-replication origins – a universal effect of cytokinins. *Planta* 193: 247-250
- Ikegami, S., Taguchi, T. & Ohashi, M. (1978) Aphidicolin prevents mitotic cell division by interfering with the activity of DNA polymerase- $\alpha$ . *Nature* 275: 458-460
- Imhoff, V., Muller, P., Guern, J. & Delbarre, A. (2000) Inhibitors of the carrier-mediated influx of auxin in suspension-cultured tobacco cells. *Planta* 210(4):580-588
- Jang, J.C. & Sheen, J. (1997) Sugar sensing in higher plants. *Trends in Plant Science* 2: 208-214
- Jang, J.C.; Leon, P.; Zhou, L. & Sheen, J. (1997) Hexokinase as a sugar sensor in Higher Plants. *The Plant Cell* 9: 5-19
- Jasinski, S., Riou-Khamlichi, C., Roche, O., Perennes, C., Bergounioux, C. & Glab, N. (2001) The CDK inhibitor NtKIS1a is involved in plant development, endoreduplication and restores normal development of cyclin D3;1-overexpressing plants. *Journal of Cell Science* 115: 973-982
- John, P.C.L.; Zhang, K.; Dong, C.; Diederich, L. & Wightman, F. (1993) p34<sup>cdc2</sup> related proteins in control of cell cycle progression, the switch between division and differentiation in tissue development, and stimulation by auxin and cytokinin. *Australian Journal of Plant Physiology* 20: 503-526
- Joubes, J.; Lemaire-Chamley, M.; Delmas, F.; Walter, J.; Hernould, M.; Mouras, A.; Raymond, P. & Chevalier, C. (2001) A new C-type cyclin-dependent kinase from tomato expressed in dividing tissues does not interact with mitotic and G1 cyclins. *Plant Physiology* 126: 1403-1415
- Joubes, J. & Chavalier, C. (2000) Endoreduplication in higher plants. *Plant Molecular biology* 43: 735-745
- Kakimoto, T. (2001) Identification of plant cytokinin biosynthetic enzymes as dimethylallyl diphosphat: ATP/ ADP isopentenyltransferase. *Plant Cell and Physiology* 42(7): 677-685
- Kaminek, M., Motyka, V. & Vankova, R. (1997) Regulation of cytokinin content in plant cells. *Physiologia Plantarum* 101: 689-700
- Koens, K.B., Nicoloso, F.T., Hartevelde, Libbenga, K.R. & Kijne, J.W. (1995) Auxin starvation results in G2-arrest in suspension-cultured tobacco cells. *Journal of Plant Physiology* 147: 391-396

- Laule, O., Fürholz, A., Chang, H.Ss, Zhu, T., Wang, X., Heifetz, P.B., Gruissem, W. & Lange, M. (2003) Crosstalk between cytosolic and plastidial pathways of isoprenoid biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. PNAS 100(11):6866-71
- Laureys, F., Dewitte, W., Witters, E., van Montagu, M., Inze, D. & van Onckelen, H. (1998) Zeatin is indispensable for the G2-M transition in tobacco BY-2 cells. FEBS Letters 426: 29-32
- Laureys, F., Smets, R., Lenjou, M., van Bockstaele, D., Inze, D. & van Onckelen, H. (1999) A low content in zeatin type cytokinins is not restrictive for the occurrence of G1/S transition in tobacco BY-2 cells. FEBS Letters 460: 123-128
- Leon, L. & Sheen, J. (2003) Sugar and hormone connections. Trends in Plant Science 8(3): 110-116
- Li, Y.; Wu, Y.H.; Hagen, G. & Guilfoyle, T. (1999) Expression of the auxin-inducible GH3 promotor/GUS fusion gene as a useful molecular marker for auxin physiology. Plant Cell and Physiology 40(7): 675-682
- Marchant, A., Bhalerao, R., Casimiro, I., Eklof, J., Casero, P.J., Bennett, M. & Sandberg, G. (2002) AUX1 promotes lateral root formation by facilitating indole-3-acetic acid distribution between sink and source tissues in the *Arabidopsis* seedling. Plant Cell 14(3):589-597
- Menges, M. & Murray, J.A.H. (2002) Synchronous *Arabidopsis* suspension cultures for analysis of cell cycle gene activity. The Plant Journal 30(2): 203-212
- Mironov, V.; de Veylder, L.; van Montagu, M. & Inze, D. (1999) Cyclin-dependent kinases and cell division in plants – The nexus. The Plant Cell 11: 509-521
- Miyazawa, Y., Kato, H., Muranaka, T. & Yoshida, S. (2002) Amyloplast formation in cultured tobacco BY-2 cells requires a high cytokinin content. Plant Cell and Physiology 43(12): 1534-1541
- Mok, D.W.S. & Mok, M.C. (2001) Cytokinin metabolism and action. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 52: 89-118
- Motyka, V., Vankova, R., Capkova, V., Petrasek, J., Kaminek, M. & Schmölling, T. (2003) Cytokinin-induced upregulation of cytokinin oxidase activity in tobacco includes changes in enzyme glycolysation and secretion. Physiologia Plantarum 117: 11-21
- Nagata, T. & Kumagai, F. (1999) Plant cell biology through the window of the highly synchronized tobacco BY-2 cell line. Methods in Cell Science 21: 123-127
- Nagata, T., Hasezawa, S. & Inze, D. (2004) Tobacco BY-2 cells. In Biotechnology in Agriculture and Forestry 53, Springer, Heidelberg
- Nagata, T., Nemoto, Y. & Hasezawa, S. (1992) Tobacco BY-2 cell line as the “HeLa” cell in the cell biology of Higher plants. International Review of Cytology 132: 1-30
- Nakagami, H., Sekine, M., Murakami, H. & Shinmyo, A. (1999) Tobacco retinoblastoma-related protein phosphorylated by a distinct cyclin-dependent kinase complex with Cdc2/ cyclin D *in vitro*. The Plant Journal 18(3): 243-252

- Ottenschläger, I., Wolff, P., Wolverton, C., Bhalerao, R.P., Sandberg, G., Ishikawa, H., Evans, M. & Palme, K. (2002) Gravity-regulated differential auxin transport from columnella to lateral root cap cells. *PNAS* 100: 2987-2991
- Peters, W., Ritter, J., Tiller, H., Valdes, O., Renner, U., Fountain, M. & Beck, E. (2000) Growth, ageing and death of a photoautotrophic plant cell culture. *Planta* 210(3):478-87
- Planchais, S., Glab, N., Inze, D. & Bergounioux, C. (2000) Chemical inhibitors: a tool for plant cell cycle studies. *FEBS Letters* 476: 78-83
- Qin, L.-X.; Richard, L.; Perennes, C.; Gadal, P. & Bergounioux, C. (1995) Identification of cell cycle-related genes in *Nicotiana tabacum* (L.). *Plant Physiology* 108: 425-426
- Redig, P.; Shaul, O.; Inze, D.; van Montagu, M. & van Onckelen, H. (1996) Levels of endogenous cytokinins, indole-3-acetic acid and abscisic acid during the cell cycle of synchronized tobacco BY-2 cells. *FEBS Letters* 391: 175-180
- Reichheld, J.-P.; Chaubet, N.; Shen, W.H.; Renaudin, J.-P. & Gigot, C. (1996) Multiple A-type cyclins express sequentially during the cell cycle in *Nicotiana tabacum* BY2 cells. *PNAS* 93: 13819-13824
- Renaudin, J.-P., Doonan, J.H., Freeman, D., Hashimoto, J., Hirt, H., Inze, D., Jacobs, T., Kouchi, H., Rouze, P., Sauter, M., Savoure, a., Sorrell, D.A., Sundaresan, V. & Murray, J.A.H. (1996) Plant cyclins: a unified nomenclature for plant A-, B- and D-cyclins based on sequence organisation. *Plant Molecular Biology* 32: 1003-1018
- Reth, J. (2003) Charakterisierung und mögliche Funktionen von Cytokinen am S/G2-Übergang des Zellzyklus' bei Tabak BY-2 Zellsuspensionskultur. Diplomarbeit Lehrstuhl für Pflanzenphysiologie, Universität Kaiserslautern
- Richard, C., Granier, C., Inze, D. & de Veylder, L. (2001) Analysis of cell division parameters and cell cycle gene expression during the cultivation of *Arabidopsis thaliana* cell suspension. *Journal of Experimental Botany* 52: 1625-1633
- Richard, C., Lescot, M., Inze, D. & de Veylder, L. (2002) Effect of auxin, cytokinin, and sucrose on cell cycle gene expression in *Arabidopsis thaliana* cell suspension cultures. *Plant Cell, Tissue and Organe Culture* 69: 167-176
- Riou-Khamlichi, C., Menges, M., Healy, J.M. & Murray, J.A. (2000) Sugar control of the plant cell cycle: differential regulation of *Arabidopsis* D-type cyclin gene expression. *Molecular and Cell Biology* 20(13):4513-4521
- Riou-Khamlichi, C.; Huntley, R.; Jacquemard, A. & Murray, J.A.H. (1999) Cytokinin activation of *Arabidopsis* cell division through a D-type cyclin. *Science* 283: 1541-1544
- Roef, L. & van Onckelen, H. (2004) Hormonal control of the plant cell cycle. In Nagata, T., Hasezawa, S. & Inze, D. eds., Tobacco BY-2 cells. Springer, Heidelberg
- Roitsch, T. & Ehneß, R. (2000) Regulation of source/sink relations by cytokinins. *Plant Growth Regulation* 32: 359-367

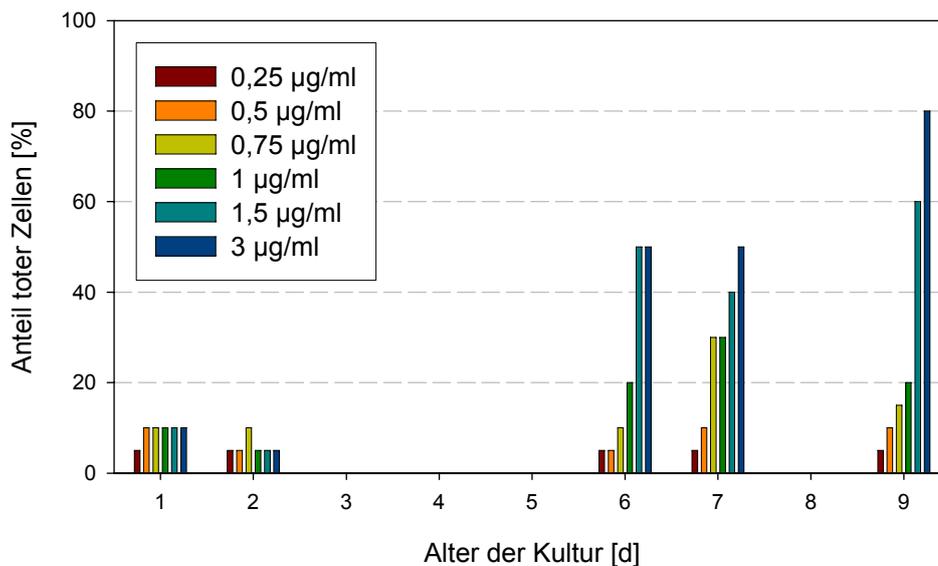
- Roitsch, T. & Gonzalez, M.C. (2004) Function and regulation of plant invertases: sweet sensations. *Trends in Plant Science* 9(12):606-613.
- Roitsch, T., Bittner, M. & Godt, D.E. (1995) Induction of apoplastic invertase of *Chenopodium rubrum* by D-glucose and a glucose analog and tissue-specific expression suggest a role in sink-source regulation. *Plant Physiology* 108: 285-294
- Roitsch, T. & Tanner, W. (1996) Cell wall invertase: Bridging the gap. *Botanica Acta* 109: 90-93
- Rolland, F., Moore, B. & Sheen, J. (2002) Sugar sensing and signalling in plants. *The Plant Cell* 14: 185-205
- Schaz, U. (2003) Analyse des Wachstums von Tabakpflanzen bei ambienter (360 ppm) und erhöhter (700 ppm) CO<sub>2</sub>-Konzentration. Dissertation Lehrstuhl für Pflanzenphysiologie, Universität Bayreuth
- Schmülling, T. (2001) CREAm of cytokinin signalling: receptor identified. *Trends in Plant Science* 6(7): 281-284
- Schmülling, T., Werner, T., Riefler, M., Krupkova, E. & Bartrina y Manns, I. (2003) Structure and function of cytokinin oxidase/dehydrogenase genes of maize, rice, *Arabidopsis* and other species. *Journal of Plant Research* 116: 241-252
- Setiady, Y.Y.; Sekine, M.; Hariguchi, N.; Kouchi, H. & Shinmyo, A. (1996) Molecular cloning and characterization of a cDNA clone that encodes a Cdc2 homolog from *Nicotiana tabacum*. *Plant Cell Physiology* 37(3): 369-376
- Shaul, O.; Mironov, V.; Burssens, S.; van Montagu, M. & Inze, D. (1996) Two *Arabidopsis* cyclin promoters mediate distinctive transcriptional oscillation in synchronized tobacco BY-2 cells. *PNAS* 93: 4868-4872
- Smeekens, S. & Rook, F. (1996) Sugar sensing and sugar-mediated signal transduction in plants. *Plant Physiology* 115: 7-13
- Smeekens, S. (2000) Sugar-induced signal transduction in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 51: 49-81
- Stitt, M., Bulpin, P.V. & Ap Rees, T. (1978) Pathway of starch breakdown in photosynthetic tissues in *Pisum sativum*. *Biochemica et Biophysica Acta* 544: 200-214
- Sorrell, D.A.; Combettes, B.; Chaubet-Gigot, N. Gigot, C. & Murray, J.A.H (1999) Distinct cyclin D genes show mitotic accumulation or constant levels of transcripts in tobacco BY-2 cells. *Plant Physiology* 119: 343: 351
- Swiatek, A., Azmi, A., Stals, H., Inze, D. & van Onckelen, H. (2004) Jasmonic acid prevents the accumulation of cyclin B1;1 and CDK-B in synchronized tobacco BY-2 cells. *FEBS Letters* 572(1-3):118-22
- Swiatek, A., Lenjou, M., van Bockstaele, D., Inze, D. & van Onckelen, H. (2002) Differential effect of jasmonic acid and abscisic acid on cell cycle progression in tobacco BY-2 cells. *Plant Physiology* 128(1):201-11

- Takai, K., Sakakibara, H. & Sugiyama, T. (2001) Identification of genes encoding adenylate isopentenyltransferase, a cytokinin biosynthesis enzyme, in *Arabidopsis thaliana*. The Journal of Biological Chemistry 28: 26405-26410
- Tonini, T., Hillson, C. & Claudio, P.P. (2002) Interview with the retinoblastoma family members: do they help each other? Journal of Cell Physiology 192(2):138-50
- Veith, R. (1989) Wachstum und Saccharosespeicherung der Zuckerrohrzellen in Suspensionskultur. Dissertation Lehrstuhl für Pflanzenphysiologie, Universität Bayreuth
- Vogler, H. & Kuhlemeier, C. (2003) Simple hormones but complex signalling. Current opinion in Plant Physiology 6: 51-56
- Wagner, B.M. & Beck, E. (1993) Cytokinins in the perennial herb *Urtica dioica* L. as influenced by its nitrogen status. Planta 190: 511-518
- Weiler, E.W. & Zenk, M.H. (1976) Radioimmunoassay for the determination of digoxin and related compounds in *Digitalis lanata*. Phytochemistry 15: 1537-1545
- Werner, T., Motyka, V., Laucou, V., Smets, R., van Onckelen, H. & Schömlling, T. (2003) Cytokinin-deficient transgenic *Arabidopsis* plants show multiple developmental alterations indicating opposite functions of cytokinins in the regulation of shoot and root meristem activity. The Plant Cell 15: 2532-2550
- Winicur, Z.M., Zhang, G.F. & Staehelin, L.A. (1998) Auxin deprivation induces synchronous Golgi differentiation in suspension-cultured tobacco BY-2 cells. Plant Physiology 117: 501-513
- Wobus, U. & Weber, H. (1999) Sugars as signal molecules in plant seed development. Biological Chemistry 380(7-8):937-44
- Yang, S.W., Jin, E.S., Chung, I.K. & Kim, W.T. (2002) Cell cycle-dependent regulation of telomerase activity by auxin, abscisic acid and protein phosphorylation in tobacco BY-2 suspension culture cells. The Plant Journal 29(5): 617-626
- Yu, Y., Steinmetz, A., Meyer, D., Brown, S. & Shen, W.-H. (2003) The tobacco A-type cyclin, Nicta;CYCA3;2, at the nexus of cell division and differentiation. The Plant Cell 15: 2763-2777
- Zazimalova, E., Brezinova, A., Holik, J. & Opatrný, Z. (1996) Partial auxin deprivations affects endogenous cytokinins in a auxin-independent tobacco cell strain. Plant Cell Reports 16: 76-79
- Zhang, K.; Diederich, L. & John, P.C.L. (2005) The cytokinin requirement for cell division in cultured *Nicotiana plumbaginifolia* cells can be satisfied by yeast Cdc25 protein tyrosine phosphatase. Implications for mechanisms of cytokinin response and plant development. Plant Physiology 137: 308-316

## 8 Anhang

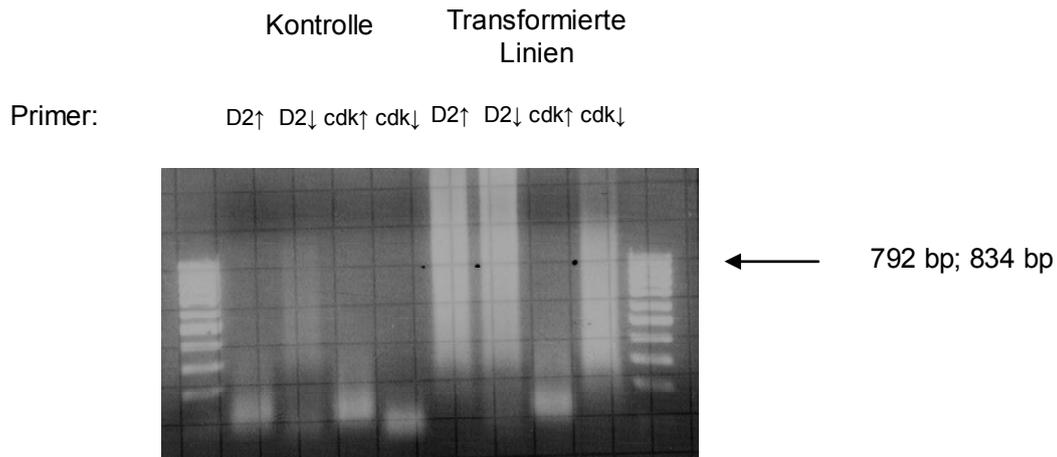
### 8.1 Veränderung der Expression von Cyclin D2;1 und Cdk2a durch Überexpression und Gen-silencing

Um die Rolle einzelner Zellzyklusgene während des Ablaufes des Zellzyklus näher zu charakterisieren, wurden die Expression des Cyclin D2;1 und der Cdk2a durch Transformation der BY-2 Zellen mit Überexpressions- und RNAi-Vektoren verändert. Da die transformierten Zellen auf Grund einer BASTA-Resistenz selektiert wurden und die optimale hierfür zu verwendende BASTA-Konzentration nicht bekannt war, wurde zunächst der Einfluss von BASTA auf die Vitalität der BY-2 Zellen untersucht (Abb. 63). Es zeigte sich, dass Konzentrationen ab 1,5 µg/ml zum Absterben der größten Menge untransformierter Zellen führten. Da 3 µg/ml kaum stärkere Effekte als 1,5 µg/ml verursachten wurde die Selektion der Transformanten mit 1,5 µg/ml durchgeführt.



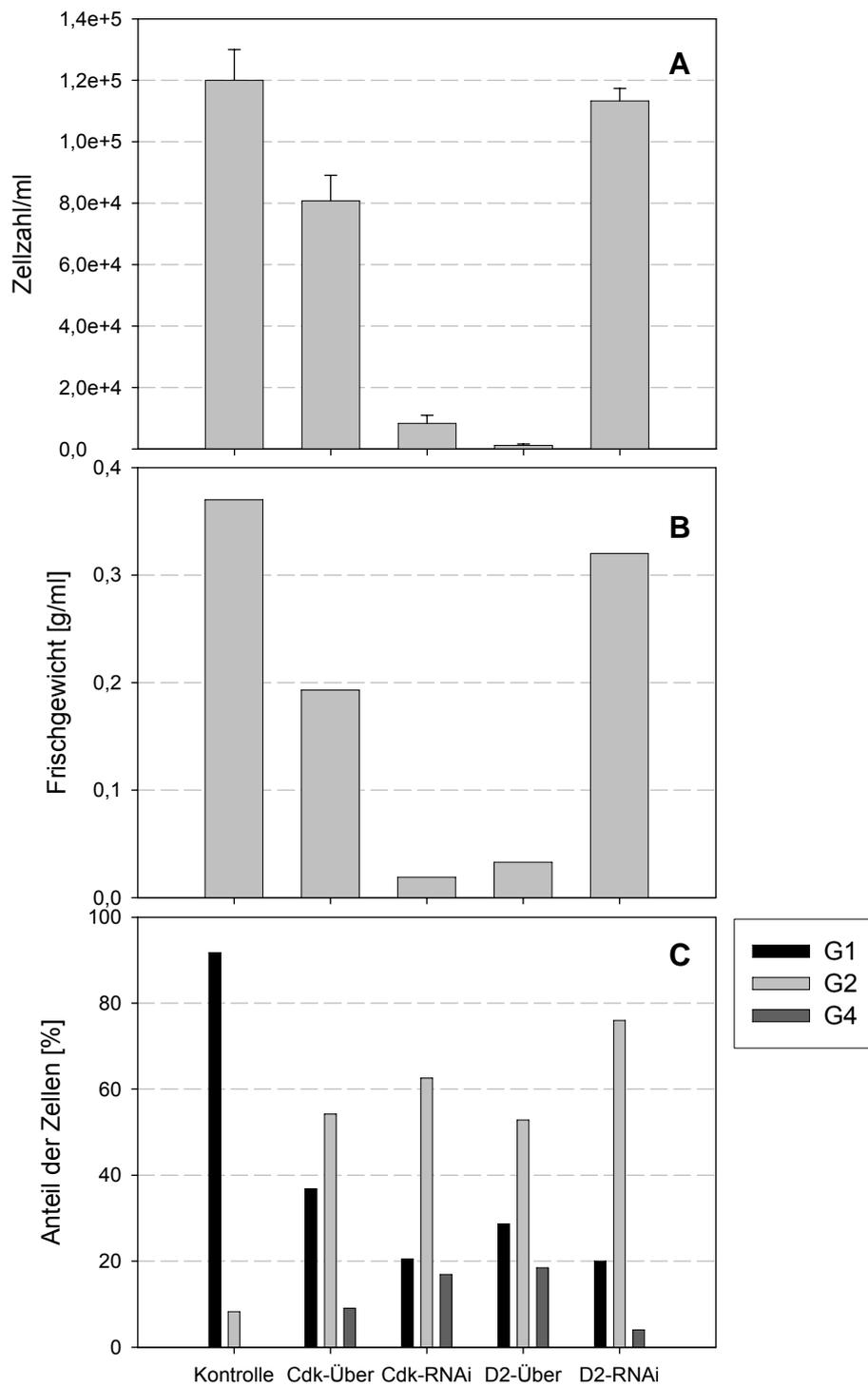
**Abb. 63: Einfluss der BASTA-Konzentration im Medium auf den Anteil toter Zellen der BY-2 Zellen in Suspensionskultur. Zur Selektion transformierter Zellen mit BASTA-Resistenz wurden 1,5 µg/ml ausgewählt.**

Um zu überprüfen, ob die BASTA-resistenten Linien tatsächlich das gewünschte Konstrukt enthielten wurde die DNA isoliert und mit spezifischen Primern eine PCR durchgeführt. Abb. 64 zeigt, dass die Linien, mit Ausnahme der mit dem Cdk-Überexpressions-Konstrukt transformierten Zellen, im Unterschied zur Kontrolle PCR-Produkte bildeten. Der Nachweis des Transformationserfolges dieser Linie konnte bisher nicht gezeigt werden, obwohl deutlich sichtbare Veränderungen des Zellzyklus (Abb. 65) vorhanden waren.



**Abb. 64: Transformationskontrolle.** Mit spezifischen Primern für die Cyclin D2 und Cdk2a Überexpressions- und RNAi-Konstrukten wurden PCR-Reaktionen mit DNA der transformierten Zellen, bzw. von Kontroll-Zellen durchgeführt. In den transformierten Linien (Ausnahme: Cdk-Überexpression) bildeten sich im Gegensatz zur Kontrolle die gewünschten PCR-Produkte bei 792 bp (D2-Primer) und 834 bp (Cdk-Primer).

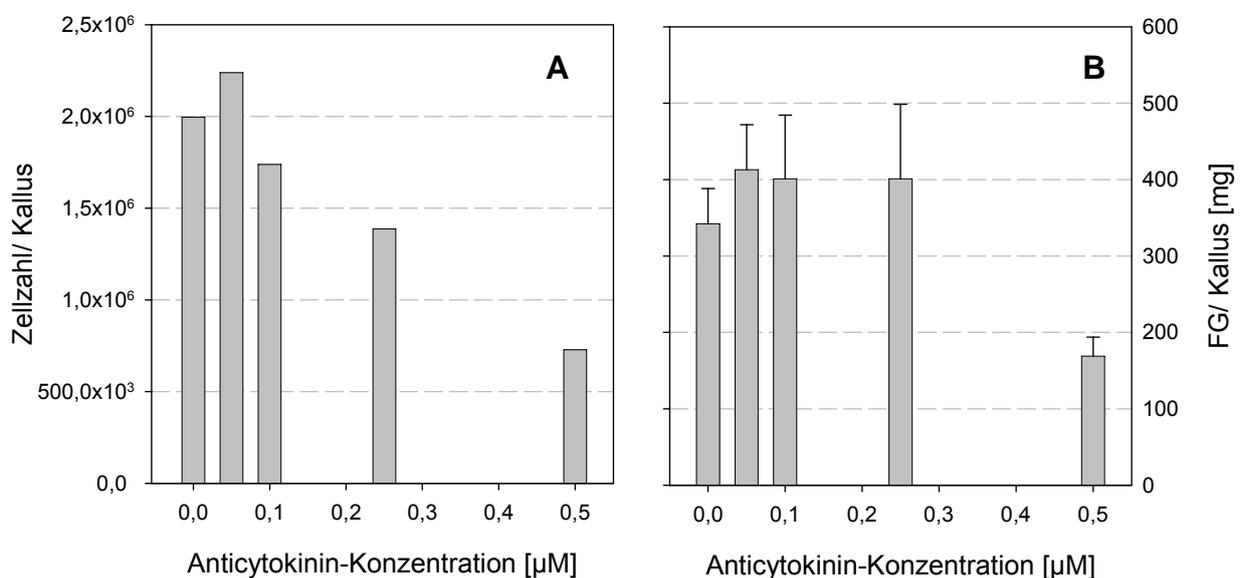
Die BASTA-resistenten Linien wurden anschließend hinsichtlich ihres Wachstumsverhaltens und des Ablaufs des Zellzyklus untersucht (Abb. 65). Es zeigte sich, dass die verminderte Cdk2a-Expression einen deutlich negativen Einfluss auf die Entwicklung der Zellzahl und des Frischgewichtes der BY-2 Zellen, während die Cdk2a-Überexpression nur zu einem geringfügig verringerten Wachstum führte. Die reduzierte Cyclin D2-Expression hatte keinen signifikanten Einfluss auf das Wachstum, aber das Wachstum der D2-überexprimierenden Zellen war nahezu vollständig gehemmt. Alle vier Linien zeigten eine Verdopplung der Ploidie. Darüber hinaus zeigten die Analysen des Zellzyklus der synchronisierten Linien, dass sich bei Cdk-RNAi und D2-Überexpression nur etwa 10 % der Zellen teilten, bei Cdk-Überexpression etwa 20 % und bei D2-RNAi etwa 60 %, was vergleichbar mit der Kontrolle ist. Die Länge des Zellzyklus der teilenden Zellen war unbeeinflusst (Daten nicht gezeigt). An dieser Stelle muss erwähnt werden, dass es nicht möglich war die Kulturen mit unveränderter Morphologie dauerhaft zu kultivieren. Im Verlauf der Kultivierung wurden die Unterschiede zwischen den Linien immer geringer, was auf eine Adaptierung an die veränderten Genexpressionen bzw. eine nicht stabile Transformation hinweist.



**Abb. 65: (A) Zellzahl, (B) Frischgewicht und des (C) DNA-Gehaltes der transformierten Linien im Vergleich zur Kontrolle.**

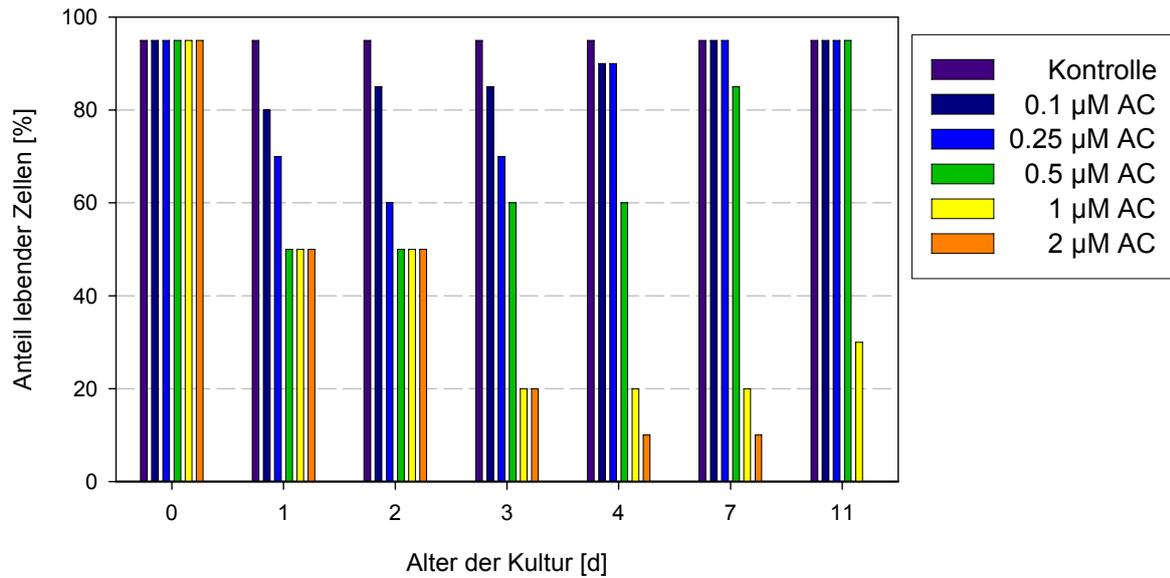
## 8.2 Untersuchung der Wirkung des Anticytokinins 3-methyl-7-(3-methylbutyl-amino)Pyrazolo[4,3-*d*]-pyrimidine auf das Wachstum und die Zellteilung der Tabak BY-2 Zellen

Auf Grund der Tatsache, dass bei Verwendung von Lovastatin kein vollständiger Effekt auf den Zellzyklus erreicht werden konnte, wurde zusätzlich die Wirkung eines Anticytokinins (3-methyl-7-(3-methylbutylamino)pyrazolo[4,3-*d*]-pyrimidine) untersucht. Dieses Anticytokinin verursacht in Tabak-Kalluskulturen eine konzentrationsabhängige Hemmung des Wachstums, die durch Zugabe von Benzyladenin ausgeglichen werden kann (Hecht et al.; 1971).



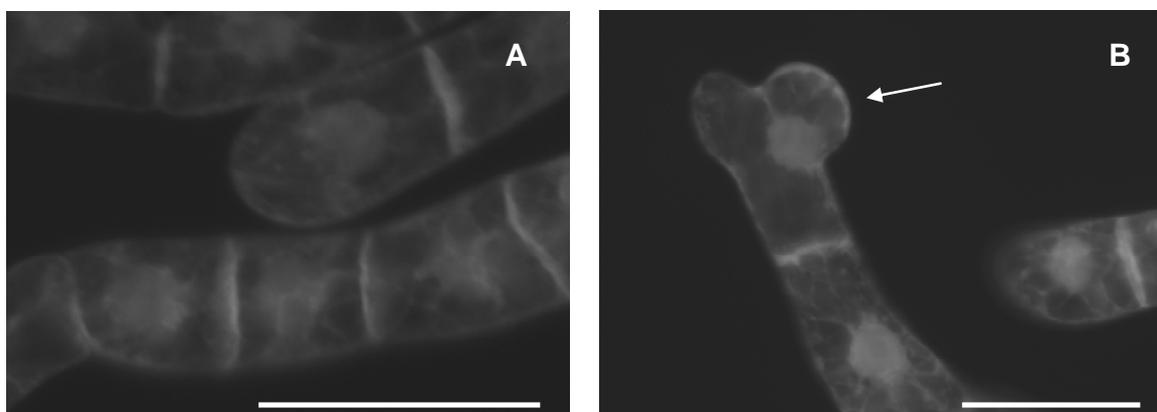
**Abb. 66: (A) Zellzahl und (B) Frischgewichtes (n=6) von Kalli, die mit verschiedenen Anticytokinin-Konzentrationen angezogen wurden. Die Kalli wurden nach einer Woche Kultivierung geerntet.**

Das Anticytokinin hemmt die Zellteilung und Biomasseproduktion in einer konzentrationsabhängigen Weise (Abb. 66). Dabei wird die Zellzahl bereits ab 0,1  $\mu\text{M}$  beeinflusst, das Frischgewicht jedoch erst bei 0,5  $\mu\text{M}$ . Wie bereits bei der Wirkung von Lovastatin beschrieben kommt es zu einer Verminderung der Vitalität der Zellen, wobei sich in diesem Fall allerdings eine deutliche Konzentrations-Abhängigkeit zeigt (Abb. 67). Konzentrationen über 1  $\mu\text{M}$  führen zum vollständigen Absterben der Kultur.



**Abb. 67: Einfluss verschiedener Anticytokinin (AC)-Konzentrationen auf den Anteil lebender Zellen einer BY-2 Kultur.**

Zusätzlich zu den Effekten auf das Wachstum und die Vitalität der Zellen, wurde eine morphologische Besonderheit nach Inkubation der Zellen mit dem Anticytokinin beobachtet (Abb. 68). Etwa 20 % der Zellen zeigten „Blasen-artige“ Auswüchse, die in Kontroll-Kulturen nicht beobachtet wurden. Ein Grund für diese morphologische Auffälligkeit könnte eine durch das Anticytokinin verursachte Veränderung des Cytoskeletts sein. Um die Verteilung des Tubulin-Anteils des Cytoskelettes nach der Applikation des Anticytokinins untersuchen zu können, wurde die BY-2 Linie GT16 verwendet. Diese Linie exprimiert ein  $\alpha$ Tubulin-GFP Fusionsprotein und ermöglicht damit die Beobachtung der Tubulinverteilung innerhalb der Zelle. In Abb. 68 kann man erkennen, dass die morphologisch veränderten Zellen deutlich weniger  $\alpha$ Tubulin besitzen. Bei paralleler Behandlung mit 6  $\mu$ M Z wurde die Ausprägung dieser morphologischen Veränderungen verzögert.



**Abb. 68: Wirkung des Anticytokinins auf die  $\alpha$ Tubulin-Verteilung der Zelllinie BY-GT 16. (A) Kontrolle, (B) 48 h Inkubation mit 0,25  $\mu$ M Anticytokinin. Der Pfeil markiert eine Zelle, die morphologische Veränderungen aufweist. Der Balken entspricht 100  $\mu$ m.**

Um die Effekte des Anticytokinins auf den Zellzyklus genauer zu untersuchen, wurde die Konzentration von 0,25  $\mu\text{M}$  ausgewählt und zu verschiedene Zeitpunkten zu Aphidicolin-synchronisierten BY-2 Zellen gegeben. Die hierbei gefundenen Effekte waren nicht stärker als die vom Lovastatin verursachten. Bei der Zugabe des Anticytokinins zu Beginn der S-Phase wurde der S/G2-Übergang um maximal 1 h verzögert.

## Danksagung

Besonders möchte ich mich bei Herrn Prof. Erwin Beck bedanken, der mir die Möglichkeit zur Bearbeitung dieses hochinteressanten Themas gegeben und mich durch Interesse und Anteilnahme stets motiviert hat.

Einen großen Anteil am Gelingen und experimentellen Umfang dieser Arbeit trägt Frau Renate Krauß, bei der ich mich auf diese Weise recht herzlich bedanken möchte.

Des Weiteren bedanke ich mich bei allen Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen des Lehrstuhls Pflanzenphysiologie für die Herzlichkeit, das Teilen von Freund und Leid des wissenschaftlichen Lebens und die Hilfsbereitschaft.

Bedanken möchte ich mich auch bei Sebastian Fettig, Daniel Souza-Canada, Ulrich Sentner, Christiane Reinbothe, Alfons Weig, Shi-Long Yan, Susanne Bauer, Christiane Jakob, Ewald Komor und Dang Khoa Tran für die interessanten, heiteren und ernsten mittäglichen Tischgespräche.

Ein besonderer Dank gilt Ulrike Schaz, Gabriele Ohrlich, Christiane Reinbothe und Paul Ziegler für die kritische Auseinandersetzung und Diskussion während des Zusammenschreibens der Arbeit.

Meiner Familie und besonders meinen Eltern danke ich für die finanzielle und moralische Unterstützung während meines gesamten Studiums.

Einen nicht unerheblichen Anteil an dieser Arbeit trägt mein Mann Alexander, für dessen großartige Unterstützung, besonders beim Versuch der Vereinbarkeit von Familie und Arbeit, ich mich recht herzlich bedanken möchte.

## Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Ferner bestätige ich, dass ich nicht anderweitig oder ohne Erfolg versucht habe, eine Dissertation einzureichen oder mich einer Doktorprüfung zu unterziehen.

Bayreuth, den 09. März 2005

.....  
(Katja Hartig)