Signalaufnahme und Transduktion

2

Today, signal transduction research contributes to all aspects of plant science, linking many fields of study in much the same way that signal transduction pathways link myriad cellular processes.

Anthony Trewavas [17]

Eine Vielzahl interner Signale sind notwendig für die Koordination der Expression von Genen während der Entwicklung ebenso wie für die Fähigkeit der Pflanze, auf Umweltreize zu reagieren. Solche internen (ebenso wie externen) Signalstoffe bewirken ihre Effekte typischerweise durch biochemische Reaktionsketten: ***Signaltransduktionswege****, die das ursprüngliche Signal hochgradig verstärken und letztlich zur Aktivierung oder Hemmung von Genen führen. [150]*

Der Signalaufnahme kommt in der Pflanze eine besondere Bedeutung durch ihre sessile Lebensweise zu. Da sie sich in aller Regel nicht wegbewegen kann, muß sie sich mit ihrer Umwelt arrangieren. Dazu gehört ein umfangreiches System zur Signalaufnahme und –verarbeitung, um angemessen auf Veränderungen der Umwelt reagieren zu können.

Lange Zeit waren die Signaltransduktionswege in planta nur sehr oberflächlich bekannt. Das hat sich im letzten Jahrzehnt langsam gewandelt, und mittlerweile sind z.B. fast alle Komponenten des Ethylen–Signalweges bekannt. Trotzdem sind wir noch weit von einem Verständnis der Zusammenhänge entfernt, da ihre Komplexität (cross–talking) *gerade bei den Pflanzen immens ist.*

Mini–Glossar

amphipathisch *amphiphil*, Bez. für Moleküle, die aus zwei funktionellen Teilen aufgebaut sind. [58]

cross talk Verknüpfung mehrerer Signaltransduktionswege miteinander

epigenetisch Bez. für Information, die nicht auf der primären Ebene des genetischen Materials, sondern auf einem untergeordneten Niveau niedergelegt wird.

Kinasen Transferasen, die die Übertragung von Phosphorylgruppen von Nukleosidphosphaten (meist ATP) katalysieren [62]

Mitogen die Zellteilung induzierende Substanz

Perzeption *Signal–*, Aufnahme bzw. Wahrnehmung von Signalen; wird durch einen Rezeptor verwirklicht

Protooncogen Gen, das bösartige Tumoren verursachen kann, wenn es mutiert ist. [150]

second messenger kurzlebige Moleküle, die in vielen Signaltransduktionswegen auftreten und das ursprüngliche Signal hochgradig verstärken.

Transduktion *Signal–*, Weiterleitung des Signals

Turgor *Zellinnendruck*, entsteht durch den osmotischen Druck der Vakuole. Wesentlicher Faktor für die Stabilität insbesondere krautiger Pflanzen.

Obwohl in den vergangenen Jahren viele Fortschritte bei der Erforschung pflanzlicher Signaltransduktion gemacht wurden, sind die meisten Systeme in Einzellern bzw. bei Tieren zuerst entdeckt worden.

Daher werden die Systeme zunächst an nichtpflanzlichen Beispielen beschrieben und wo immer möglich Verbindungen zu adäquaten Systemen in Pflanzen gezogen.

2.1 Übersicht, allgemeine Prinzipien

Die Signalaufnahme und Transduktion umfaßt drei Teilaspekte: die Signalperzeption (Wahrnehmung), die Signaltransduktion (Weiterleitung) und die Signalantwort (Response), vgl. Abb. 2.1. Signale werden molekular von einem Rezeptor perzipiert, der daraufhin direkt oder über Zwischenglieder, sogenannte *second messenger* (sekundäre Botenstoffe), Veränderungen in der Zelle initiiert.

▲ **second messenger** kurzlebige Moleküle, die in vielen Signaltransduktionswegen auftreten und das ursprüngliche Signal hochgradig verstärken. Die häufigsten *second messenger* sind cAMP, cGMP, NO, cADPR, DAG, IP_3 und Ca^{2+} [150]

Typischerweise bewirkt das Signal eine Veränderung des Genexpressionsmusters der Zelle. Es können aber auch physiologische Reaktionen wie das Schließen der Stomata oder die Reaktion der Fiederblätter von *Mimosa punica* auf Reize ausgelöst werden, die über eine Modifikation vorhandener Enzyme verwirklicht werden (und wesentlich schneller ablaufen als die Genexpression).

Perzeption →	**Transduktion** →	**Antwort (response)**
Rezeptoren: – enzyme–linked – G protein–linked – ion channel–linked	G–Proteine second messenger (cAMP, cGMP, Ca^{2+}, cADPR) Proteinkinasen	Genexpression Enzymmodulation physiologische Reaktionen (Stomata, Mimose)

Abb. 2.1: Allgemeines Schema der Signaltransduktion. Die Aufnahme und Weiterleitung läßt sich in drei Teilaspekte untergliedern: Signalperzeption (Wahrnehmung), Signaltransduktion (Weiterleitung) und Signalantwort (Response).

➤ Das Endresultat einer Signaltransduktionskette ist typischerweise die Regulation eines Transkriptionsfaktors, der wiederum die Genexpression reguliert. [150]

Historisch wurden kurz– und langfristige Antworten auf Reize völlig unabhängig voneinander betrachtet. Mit der zunehmenden Aufdeckung der molekularen Hintergründe der Signaltransduktion stellt sich diese Trennung als künstlich und falsch heraus: Langsamen und schnellen Reizantworten liegen die gleichen molekularen Mechanismen der Signaltransduktion zugrunde. [17]

Verkompliziert wird die Betrachtung der Signaltransduktion dadurch, daß es Gene gibt, die ihrerseits andere Gene in ihrer Expression beeinflussen. Die Genprodukte **epistatischer Gene** beeinflussen die Expression unabhängig vererbter Gene, **pleiotrope Gene** beeinflussen viele Merkmale.

Diese Ebene der Information wird auch als **epigenetische Ebene** bezeichnet, im Gegensatz zur *genetischen Ebene* der auf den Genen direkt codierten Information.

▲ **epigenetisch** gr. $\varepsilon\pi\iota$, auf, $\gamma\varepsilon\nu\varepsilon\tau\eta$ Geburt; Bezeichnung für Information, die nicht auf der primären Ebene des genetischen Materials, sondern auf einem untergeordneten Niveau niedergelegt wird. Von C. H. Waddington 1940 eingeführter Begriff. [57]

2.1.1 Signaltransduktionswege sind hochspezifisch und zeigen einen hohen Grad an Plastizität

Signaltransduktionswege sind zu einem hohen Grad gewebespezifisch. Zudem reagieren Zellen unterschiedlich auf dasselbe Signal in Abhängigkeit von ihrem Entwicklungszustand, den Umweltbedingungen und ihrer endogenen Uhr.

Diese Spezifität wird sowohl durch die An– oder Abwesenheit der Rezeptoren als auch derer nachgeschalteter (*downstream*) Elemente vermittelt.

➤ Gewebespezifische Signaltransduktionswege werden nicht nur durch An– oder Abwesenheit von Rezeptoren festgelegt, sondern auch durch die An–

oder Abwesenheit nachgeschalteter (*downstream*) Elemente. [17]

Signale wirken synergetisch oder kooperativ, d.h. ...

- zwei Beispiele
  - Chloroplastengenese (DET/COP–Mutanten)
  - Abhängigkeit der Nitrataufnahme (Wachstum/Licht)

Die Sensitivität der Zelle für ein bestimmtes Signal ist variabel. Zum einen kann die Konzentration der Rezeptoren variiert werden, was zu einer Veränderung der Dosis–Wirkungs–Kurve führt. Zum anderen variiert die Signalwirkung abhängig von den Umweltbedingungen, der endogenen Uhr (→ *Phasenresponse Kurve* (PRC); vgl. NlDyn) und dem Alter der Zelle/des Organismus. *Dosis–Wirkungs–Kurve*

➤ Die Bestandteile der Signalketten sind vorwiegend negativ reguliert.

2.1.2 Pflanzen nehmen eine Vielzahl exogener und endogener Signale wahr

Signalperzeption ist besonders bei sessilen Organismen (Pflanzen) wichtig. Zu den exogenen (äußeren) Signalen, die auf die Pflanze einwirken, gehören die **Schwerkraft**, das **Licht**, das Qualität und Quantität (Photoperiode, Wellenlänge) wahrgenommen wird und sowohl als Energiequelle als auch Signal dient, **Mikroorganismen** (Pathogene, Symbionten), **Mineralien** (toxische, Nährstoffe), **Wasser** und eine Reihe von **Gasen**, darunter das Hormon Ethylen und CO_2. *exogene Signale*

Mit Ausnahme der Schwerkraft ändern sich alle diese Stimuli ständig. Die Zeitskalen der Variation der Reize schwankt dabei zwischen Sekunden (z.B. Licht unter Bäumen) und bis zu einem Jahr (z.B. Photoperiode).

Neben den exogenen gibt es auch noch eine Reihe endogener Signale: Hormone, Kohlenhydrate, allgemein bestimmte Metabolite und der Turgor (Wasserstatus). *endogene Signale*

CONCEPT CHECK 2.1

✓ Die Signalaufnahme und –weiterleitung (Transduktion) läßt sich in drei Teilaspekte untergliedern: Signalperzeption (Wahrnehmung), Signaltransduktion (Weiterleitung) und Signalantwort.

✓ Die auf die Pflanze einwirkenden Stimuli variieren (mit Ausnahme der Schwerkraft) ständig auf verschiedenen Zeitskalen.

✓ Proteinkinasen kommt große Bedeutung in der intrazellulären Signalgebung zu.

✓ Die Bestandteile der Signalkette sind vorwiegend negativ reguliert.

2.2 Rezeptoren der Signalaufnahme

Der erste Schritt in der Signaltransduktion ist die Perzeption (Wahrnehmung) des Signals. Sie wird durch Rezeptoren vermittelt. Entsprechend der großen Vielfalt von Signalen gibt es gleichfalls eine große Vielfalt von Rezeptoren.

2.2.1 Die große Mehrheit der Rezeptoren ist membrangebunden

Meist handelt es sich bei den Rezeptormolekülen um Proteine. Allgemein können wir membrangebundene von intrazellulären Rezeptoren unterscheiden. Erstere stellen die überwiegende Mehrheit dar. Es sind amphipathische Moleküle, die aus (hydrophilen) extra– und intrazellulären sowie (hydrophoben) Transmembran–Domänen aufgebaut sind.

intrazelluläre Rezeptoren

Die prominentesten Vertreter **intrazellulärer Rezeptoren** sind bei Tieren die Steroid–Rezeptoren. Mittlerweile wurden auch bei Pflanzen Steroidhormone entdeckt, ihre bekanntesten Vertreter sind die Brassinolide. Im Gegensatz zu den tierischen Steroiden sind die Rezeptoren pflanzlicher Steroide membrangebundene Rezeptoren [9].

Allerdings gibt es biophysikalische Studien, die darauf hindeuten, daß bei der Perzeption von Abscisinsäure (ABA) in den Schließzellen von Stomata intrazelluläre Rezeptoren eine Rolle spielen [49].

2.2.2 Membrangebundene Rezeptoren lassen sich in drei Klassen einteilen

G protein–linked receptors

Die erste Gruppe sind die **G protein–linked receptors**, Moleküle mit sieben Transmembran–Domänen. Sie werden daher häufig auch als *seven–spanning*, *seven–pass* oder *serpenine receptors* bezeichnet. Sie interagieren mit **hetero-**

BOX 2.1: *Methoden — Library screening & multiple alignment*

Durch den jüngsten Fortschritt bei der Sequenzierung von Pflanzengenomen wie z.B. *Arabidopsis* und Reis ist es möglich geworden, Computer zur Suche nach DNA–Sequenzen, die den Aminosäure–Sequenzen von Proteinen anderer Organismen entsprechen, zu nutzen. [150]

Library screening

Beim *library screening*, auch *alignment approach* genannt, wird eine Sequenz–Datenbank nach passenden homologen Sequenzen zur gegebenen Sequenz durchsucht. Die diesem Ansatz zugrundeliegende Technik ist das *multiple alignment*.

Multiple alignment

Durbin et al. [35, pp. 134–159]

Literatur

Durbin R, Eddy SR, Krogh A, Mitchison G (1998) Biological sequence analysis, Cambridge University Press, Cambridge

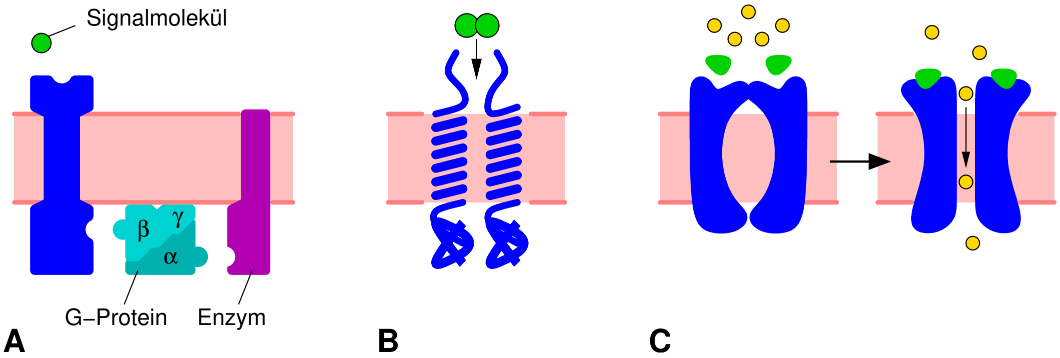

Abb. 2.2: Membrangebundene Rezeptoren lassen sich in drei Klassen einteilen. (A) G protein–linked receptors; (B) enzyme–linked receptors; (C) ion channel–linked receptors. Für Details vgl. den Text. Stark schematisierte Darstellung. Nach [17], verändert.

trimeren G–Proteinen, GTP–bindenden regulatorischen Proteinen, die das Signal weiterleiten, indem sie ein Effektor–Enzym aktivieren [150], vgl. Abschnitt 2.5.1, S. 55.

Eine zweite, große Gruppe stellen die **enzyme–linked receptors** (auch: *catalytic receptors*) dar. Diese Rezeptoren sind strukturell typischerweise durch eine einzige Transmembrandomäne gekennzeichnet. Sie interagieren nicht mit heterotrimeren G–Proteinen.

enzyme–linked receptors

In tierischen Organismen können sechs Hauptklassen solcher katalytischen Rezeptoren unterschieden werden: (1) receptor tyrosine kinases, (2) receptor tyrosine phosphatases, (3) receptor serine/threonine kinases, (4) tyrosine kinase–linked receptors, (5) receptor guanylate cyclases und (6) cell surface proteases [150].

Bisher wurden keine receptor tyrosine kinases (RTK) in Pflanzen identifiziert [150]. Stattdessen existieren hier sogenannte receptor–like kinases (RLK), die in ihrer grundlegenden Struktur tierischen RTKs ähneln [161, 140], vgl. Abschnitt 2.2.4, S. 52.

Prinzipiell gehören auch die His–Kinasen der Zwei–Komponenten–Systeme

BOX 2.2: *Methoden — Two–hybrid system*

Wichtige Methode zum Auffinden und zur Untersuchung von Protein–Protein–Interaktionen.

Prinzip Transkriptionsfaktoren besitzen zwei wichtige Domänen: die DNA–Bindungsdomäne (DBD) und die Aktivierungsdomäne (AD). Durch Fusionierung dieser Domänen mit je einem der beiden zu untersuchenden Proteine kann die erfolgreiche Interaktion durch die Expression eines Reportergens mit zur DBD passenden Regulationssequenz nachgewiesen werden.

Praxis Als Reportergen kommt entweder lacZ oder ein Gen der Aminosäure–Synthesewege (LEU2, HIS3) zum Einsatz.

Das Protein, zu dem ein unbekanntes interagierendes Protein gesucht wird, wird mit der DBD– oder AD–Domäne kombiniert, die Insert–DNA einer cDNA–Bibliothek mit der komplementären Domäne. Beide Komponenten werden zusammen mit dem Reportergen in Hefezellen (*Saccharomyces cerevisiae*) transfiziert und anschließend auf die Funktion des Reportergens selektiert.

(*two–component systems*) zu dieser Gruppe der katalytischen Rezeptoren. Sie unterscheiden sich allerdings in Struktur und Funktion grundlegend von der Superfamilie der eukaryotischen Serin/Threonin/Tyrosin Kinasen (ePKs).

ion channel–linked receptors

Die **ion channel–linked receptors** bilden die letzte Gruppe membrangebundener Rezeptoren. Prominente Beispiele sind die verschiedenen Klassen der Calcium–Kanäle, die sowohl am Plasmalemma als auch an intrazellulären Membranen lokalisiert sind und eine wichtige Rolle in zahlreichen Signaltransduktions–Prozessen spielen.

2.2.3 Zweikomponenten–Rezeptoren wurden erst kürzlich in Eukaryoten entdeckt

Das typische Signalsystem der Prokaryoten besteht aus zwei funktionalen Elementen, einem Sender (*transmitter*) und einem Empfänger (*receiver*). Daher kommt auch die Bezeichnung Zwei–Komponenten–Systeme (*two–component systems*) für diese Form der Signaltransduktion.

Die Existenz solcher Systeme in Eukaryoten wurde erstmalig zu Beginn der 90er Jahre des 20. Jahrhunderts beschrieben [20, 137, 119] und kam einer Sensation gleich [96]. Mittlerweile ist eine ganze Reihe von pflanzlichen His–Kinasen beschrieben worden [vgl. 156, 157, 96]. Eine sehr gute Übersicht über die Zwei–Komponenten–Systeme in Pro– und Eukaryoten, ihre Strukturen und Funktionen liefert das Paper von Stock et al. [142].

charakteristische Merkmale

Die Zwei–Komponenten–Systeme zeichnen sich durch drei Merkmale gegenüber allen anderen Signaltransduktions–Systemen aus: das Vorkommen von **Histidin–Kinasen** (im Gegensatz zu Ser/Thr– und Tyr–Kinasen in sonstigen eukaryot. Systemen), **keine Signalverstärkung** innerhalb des Systems (im Gegensatz zu MAPK–Kaskaden) und den **His → Asp Phosphotransfer**.

Der aktive Rezeptor (die His–Kinase) ist ein Homodimer, bei dem jedes Monomer das andere phosphoryliert [17], vgl. Abb. 2.3.

In Prokaryoten sind die einfacheren *singlestep two–component systems* weit verbreitet

- besteht ausschließlich aus zwei Teilen
    1. Histidin–Kinase (*His Kinase*)
    2. *Response Regulator*
- Vorkommen
    - meiste prokaryotische Systeme
- Funktionsweise

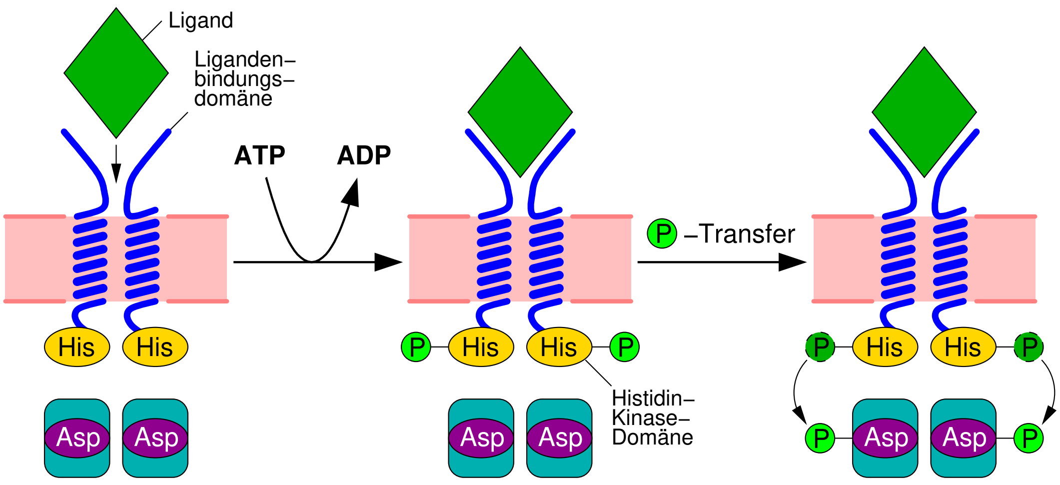

Abb. 2.3: Die Rezeptoren (His–Kinasen) der Zwei–Komponenten–Systeme agieren als Homodimere. Bindet ein Ligand an den Rezeptor, wird dieser aktiviert und die beiden Monomere phosphorylieren einen bestimmten His–Rest am jeweils anderen Monomer. Anschließend wird der Phosphatrest auf einen konservierten Aspartrest eines *response regulator* Proteins übertragen. Dieser *response regulator* trägt häufig eine DNA–bindende Domäne und agiert als Transkriptionsfaktor. Bei den (in eukaryotischen Organismen ausschließlich vorkommenden) Hybrid–Kinasen ist die His–Kinase mit einer *response regulator*–Domäne verschmolzen. Ein weiterer *response regulator* ist typischerweise notwendig, um das Signal weiterzugeben. Nach [17], verändert.

1. die Histidin–Kinase wird durch Umwelt–Stimuli reguliert und autophosphoryliert an einem Histidin–Rest

   → energiereicher Phosphat–Rest

2. energiereicher Phosphat–Rest wird auf Aspartat–Rest im *response regulator* übertragen

3. Konformationsänderung der regulatorischen Domäne

   → Aktivierung der assoziierten Domäne, die die Antwort (*response*) bewirkt

   – mögliche Antworten z. B.: Interaktion mit anderen Proteinen, Bindung an DNA

In Pflanzen existieren ausschließlich die komplizierteren *multistep two–component systems*

- Erweiterung der *one–step, two component signaling systems*
- zusätzliche Elemente:
  - zusätzliche Proteine mit phosphorylierbaren Asp– oder His–Resten
- zweiter Asp–Rest
  - wieder in einem Empfängermodul (*receiver module*) lokalisiert

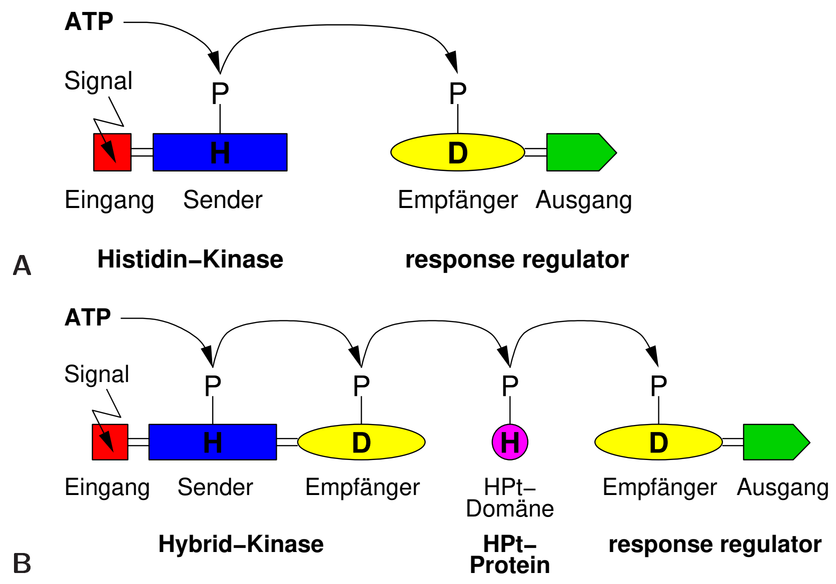

Abb. 2.4: Schematische Darstellung und grundlegende Eigenschaften der *simple* (A) und der *multistep* (B) *two-component signaling systems*. Signalperzeption durch die Eingangsdomäne (*input domain*) der His– oder Hybrid–Kinase induziert Autophosphorylierung des Transmitters an einem konservierten His–Rest (H). Das Phosphat (P) wird an einen konservierten Asp–Rest (D) weitergegeben, der entweder auf dem Empfänger (*receiver*) des verwandten *response regulator* lokalisiert ist (A) oder, im Fall der Hypbrid–Kinasen, auf einer angehängen Empfänger–Domäne (*receiver domain*) (B). Beim *multistep, two-component signaling system* dienen His–tragende Phosphotransfer–Domänen–Proteine (*Hiscontaining phosphotransfer (HPt) domain proteins*) als Phospho–His–Intermediate zwischen den Hybrid–Kinasen und dem *response regulator*. Aus Lohrmann und Harter [96], verändert.

- in Pflanzen ist das zusätzliche Empfängermodul oft carboxyterminal an der His–Kinase gebunden

  → Hybrid–Kinase (*hybrid kinase*)

- zweiter His–Rest
  - in einer HPt–Domäne (*HPt domain*) lokalisiert
  - HPt = Histidine–containing phosphotransfer domain
  - ermöglicht den Transfer eines Phosphat–Restes zwischen zwei Empfängermodulen
  - in Prokaryoten sind viele HPt–Domänen physikalisch an andere Elemente des ST–Weges gebunden
    - ∗ in *Arabidopsis* alle HPt individuelle Proteine

Warum gibt es die *multistep two–component systems*?

- Signalverstärkung kann es nicht sein
  - Das Signal wird innerhalb eines *two–component system* als Phosphat–Rest übertragen

    → strikt Eins–zu–eins übertragen
    → kein Unterschied zwischen *single* und *multistep two–component system*

- Signaltransduktion vom Cytosol zum Zellkern
  - manche *response regulators* haben DNA–Bindestellen
    * fungieren (vermutlich) als Transkriptionsfaktoren
  - Signalperzeption durch die Kinase erfolgt in der Regel am Plasmalemma

  → Signalübertragung von Histidin–Kinase zu RR über HPt
    * Darauf wird später noch ausführlicher (mit Beispiel) eingegangen
- Erhöhte Fähigkeit zum *cross talk*
  - *cross talk*
    * wörtl. "Wortgefecht"
    * netzwerkartige Verknüpfung mehrerer Signaltransduktionswege miteinander
  - bisher nur erste Einblicke in die Netzwerk–Struktur der pflanzlichen Signaltransduktions–Wege
    * aber: *cross talk* zwischen den verschiedenen Signaltransduktionswegen hat mit ziemlicher Sicherheit große funktionale Auswirkungen
  - vielleicht komplexes Signaltransduktions–Netzwerk mit folgenden Fähigkeiten:
    * Wahrnehmung, Verrechnung und Integration eines breiten Bereiches von Signalen

  → Folge der sessilen Lebensweise der Pflanzen
    * Jede Zelle muß eine Vielfalt an Signalen (im weitesten Sinne) überwachen und einbeziehen, um eine fein ausbalancierte Entscheidung zu treffen, wie sie auf zellulärer und organismischer (die ganze Pflanze betreffender) Ebene reagiert.
- Aufbau
  - Rezeptorteil (Ligandenbindung)
  - transmembrane Domäne
  - Response–Regulator (Hybrid–Kinase)
    * phosphoryliert erst sich selbst, dann weitere Moleküle
- Kriterien für die Liganden–Rezeptor–Bindung

  - Ligandenbindung mit hoher Affinität
  - Ligandenbindung reversibel
  - Ligand soll Rezeptor absättigen können
  - Rezeptor sollte selektiv für den spezifischen Liganden sein

2.2.4 Receptor–like Proteinkinasen (RLK) sind verwandt mit tierischen Receptor Tyrosine Kinasen (RTK)

➤ Dimerisierung könnte ein allgemeiner Mechanismus der Aktivierung von Zelloberflächenrezeptoren sein, die nur eine Transmembrandomäne aufweisen. [150]

- strukturelle Charakteristika
  - große außercytoplasmatische Domäne
  - eine membrandurchziehende Domäne
  - C–terminale Domäne mit Proteinkinase–Aktivität
- aktiv als Homodimere
  - Autophosphorylierung oder von "down–stream"Komponenten
- LRR — leucine rich regions
  - Erkennungsdomäne
- drei Gruppen [17]
  1. S receptor kinases (SRK)
  2. leucine–rich repeat kinases (LRR)
  3. EGF–like RLKs

CONCEPT CHECK 2.2

✓

BOX 2.3: *Methoden — Komplementierung in Hefe*

Madigan et al. [97, pp. 318–20]

Abb. 2.5: Strukturen von cAMP und cGMP.

2.3 Zyklische Nukleotide

- cAMP, cGMP
- Strukturbild, Funktionen...

2.3.1 Die Rolle von cAMP in Pflanzen ist immer noch umstritten

- erst kürzlich wurde eine Adenylyl Cyclase (AC) in Pflanzen charakterisiert [110]

2.3.2 Guanylyl Cyclase scheint in Pflanzen eine wichtigere Rolle zu spielen als Adenylyl Cyclase

CONCEPT CHECK 2.3

✓

2.4 Die Rolle des Calciums

- an nahezu allen Signaltransduktions–Ketten beteiligt
- wann Ca^{2+} in Signaltransduktion beteiligt?
  - beobachtbarer Wechsel in einer zellulären Reaktion nach Erhöhung der Ca^{2+}–Konzentration oder Veränderung des Ca^{2+}–Fluxes
  - Wenn die Reaktion mit gebundenem Ca^{2+} nachahmbar ist (nach Dekomplexierung)
- Versuche mit freisetzbaren Molekülen zur Aktivität von Signaltransduktions–Ketten
  - mit IP_3 in Guard– und Schließzellen
  - mit Ca^{2+} (anfänglich an EDTA gebunden)
- Beziehung zwischen intra– und extrazellulärem Calcium für die ST–Wege
  - $[Ca^{2+}]_{\text{innen}} \approx 0.1\ \mu\text{M}$
  - $[Ca^{2+}]_{\text{außen}} \approx 1\ \text{mM}$
  - → Verhältnis von 1:10 000
- Ca^{2+} hat eine geringe Diffusionsrate in der Zelle
  - → bindet offenbar an vielem in der Zelle
  - Voraussetzung für Differenzierung
    - → unterschiedliche zelluläre Reaktionen in Abhängigkeit von der Ca–Konzentration
      - · durch die Zahl offener Ca–Kanäle beeinflußbar
- Klassen von Ca^{2+}–Kanälen [17]
  1. voltage–gated channels
  2. receptor– and second messenger gated channels
  3. "stretch" channels

2.4.1 Calcium ist an vielen Signaltransduktionswegen in der Pflanze beteiligt

➤ Das Verhalten einer Population von Ca–Kanälen als Antwort auf einen Reiz ist nicht gleichförmig. Ein Reiz beeinflußt die Wahrscheinlichkeit, daß ein Kanal geöffnet oder geschlossen wird. [17]

BOX 2.4: ***Methoden — Photoreaktive ("caged") Moleküle***

[97, pp. 318–20]

Abb. 2.6: Strukturen von Calmodulin.

2.4.2 Ein zu hoher Calcium–Gehalt im Cytosol ist toxisch für die Zelle

- Balance des $[Ca^{2+}]_i$ durch Ca^{2+}–ATPasen, die Ca^{2+} aus der Zelle bzw. in Komparimente (ER, Vakuole) pumpen.
- Oszillationen des $[Ca^{2+}]_i$

2.4.3 Die Spezifität des Calciums liegt in seiner räumlichen Verteilung in der Zelle

- [17, pp. 970–1]

➤ Die geringe Diffusionsrate von $[Ca^{2+}]_i$ führt zur definierten räumlichen Verteilung von Ca^{2+} in der Zelle und ist die Grundlage für die Spezifität der Signaltransduktion über Ca^{2+}. Die Ca^{2+}–Rezeptoren sind ihrerseits durch Koppelung an das Cytoskelett definiert räumlich in der Zelle angeordnet. [17]

2.4.4 Calmodulin bindet Calcium und reguliert die Aktivität von Enzymen

CONCEPT CHECK	2.4
✓	

2.5 G–Proteine und Phospholipide

2.5.1 G–Proteine

- Bindung und Hydrolyse von GTP
- fungieren als **molekulare Schalter** *molekulare Schalter*
- konservierte Struktur

  → wird als eine Ursprungsform angesehen

- Funktion

Abb. 2.7: Schema eines heterotrimeren G–Proteins.

Abb. 2.8: Der Zyklus der heterotrimeren G–Proteine.

  - genauere Erkennung des Signals durch Rezeptoren, bei Sekrektion oder Proteinbiosynthese (Interaktion Codon–Anticodon)

- heterotrimere oder monomere G–Proteine
  - Heterotrimere
    * α, β, γ–Untereinheit
    * α–Untereinheit mit hydrolytischer Funktion

Abb.

- G–Protein–Zyklus
  - Komplexierung mit β, γ im "inactive state"
  - in Pflanzen noch nicht beschrieben!
  - Bild "1 Enzym — 1 Reaktion" wahrscheinlich falsch
    → Enzymkomplexe und —Systeme
    * Stoffwechselwege durch (räumlich angeordnete) Enzymkomplexe katalysiert, nur so verstehbar

- Aktivitätszyklus eines heterotrimeren G–Proteins
  - Vorkommen
    * Blaulicht/Rotlicht, Auxin, Gibberellin, Stomaöffnung
    * nicht bei jeder Reaktion mit einem dieser Faktoren
    * aber: G–Proteine bei manchen solcher ST–Wege nachgewiesen

2.5.2 Phospholipasen

- mögliche Interaktion von Phospholipase C und D in der pflanzlichen Signaltransduktion
- beteiligt an wichtigen zellulären Prozessen
  - Bsp.: IP_3
    * *Inositoltriphosphat*
    * *second messenger*
    * Botenstoff, wirkt auf Ca–Kanäle
- Phospholipasen, die durch G–Proteine aktiviert werden

Abb. 2.9: Struktur von Inositol–3,4,5–triphosphat (IP_3).

Abb. 2.10: Spezifische Schnittstellen der verschiedenen Gruppen von Phospholipasen.

– Abbau durch IP_3 und Regenerierung des Phosphatidyl–inositols durch Phosphatasen

→ kontrollieren Aktivität und Lebensdauer von IP_3

CONCEPT CHECK **2.5**

✓

2.6 Proteinkinasen (MAPK)

➤ Ein einziges Proteinkinase–Molekül kann viele hundert Enzyme phosphorylieren. Dadurch wird ein anfänglich schwaches Signal hochgradig verstärkt. [17]

▲ **Protooncogen** normales Gen, das bösartige Tumoren verursachen kann, wenn es mutiert ist. [150]

- Proteinkinasen
  - 3–4% des pflanzlichen Genoms codieren Proteinkinasen

    → große Bedeutung in der intrazellulären Signalgebung
  - Funktion der PK... ?...?

Evolutionstheoretische Interpretation — *Konservierte Strukturen/Sequenzen*

- ähnlich den Homologiekriterien der vergleichenden Anatomie
- Bei sehr vielen verschiedenen Organismen auftretende molekularbiologische Strukturen (z.B. Sequenz, aber auch Tertiär–/Quartärstruktur von Proteinen) werden als "konserviert" bezeichnet und als Indiz für die gemeinsame Abstammung gewertet bzw. in diesem Rahmen interpretiert.

BOX 2.5: *Methoden — Molecular mapping & Chromosome walking*

Molecular mapping

Buchanan et al. [17, pp. 329–30]

Chromosome walking

bla

Abb. 2.11: Die MAPK–Kaskade.

- ca. 300 AS lange, konservierte, katalytische Region
- MAPK
  - *mitogen activated protein kinase*
  - bei Genaktivierung beteiligt
  - auch viele andere Funktionen
    - Bsp.: Chlorophyll–Biosynthese
- MAPK–Kaskade
  - G–Protein → Ras → MAPKKK → MAPKK → MAPK → TF (Transkriptionsfaktor)

CONCEPT CHECK 2.6

✓

2.7 Beispiele der Signalkette: Auxine, Phytochrom, Ethylen

2.7.1 Ethylen–Signalkette

- Identifizierung von Rezeptoren durch Mutantenanalyse
  - Konzentration der Rezeptoren in der Zelle viel zu gering für direkte (biochemische) Analyse
- unterschiedliche Rezeptoren
  - ERS — Ethylen responsive sensors
  - ETR — Ethylenreceptor
- Zusammenfassung
  - lange Kaskade vom 1. Rezeptor bis zur Genexpression
  - nicht linear, auch verzweigt

- große Komplexe aus mehreren Faktoren zur Auslösung eines Signals notwendig

CONCEPT CHECK 2.7

✓

Zusammenfassung und Wiederholung

URL Aktuelle Informationen und Links zu diesem Kapitel im Internet unter http://www.till-biskup.de/botanik/band2/kapitel2.html

Fragen

Phytochrome and Light Control of Plant Development

1. What is the fundamental difference between light absorption in photomorphogenesis versus photosynthesis?

2. What early observations about lettuce seed germination led to the classical model of phytochrome action?

3. Is the photoconversion of phytochrome from one form to another ever 100

4. Evaluate the following statement: "Both Pr and Pfr are physiologically active: they just have opposite effects."

5. Describe the structure of phytochrome. What aspects of phytochrome function can be inferred from its structure?

6. Phytochrome is encoded by a multigene family. Which phytochrome(s) would be expected to predominate in light- grown *Arabidopsis* seedlings, and why?

7. Characterize the VLFR, LFR, and HIR phytochrome responses with respect to photoreversibility, reciprocity, and time-dependence.

8. Support or refute the following statement: "Despite the lack of photoreversibility, both VLFR and HIR responses are nevertheless mediated by phytochrome.

9. What would be the likely effect of a null mutation in the PHYA gene on the HIR responses of light-grown vs. dark- grown *Arabidopsis* seedlings? How would this situation contrast with a mutation in the PHYB gene?

10. How do "sun plants" differ from "shade plants"?

11. What is the role of phytochrome in circadian rhythms? What is the current model for the interaction between phytochrome and a circadian oscillator?

12. During de-etiolation, phyB takes over the response from phyA. How does this affect the response to red and far-red light?

13. Exposure of Samanea leaves to red light followed by darkness initiates reactions in the pulvini of the leaflets. What changes occur, and how do they affect leaflet movement? What happens if red light is followed by far- red?

14. Discuss the evolution of the phytochrome signaling system. How does plant phytochrome differ from bacterial phytochrome?

15. Phytochrome is thought to interact with several regulatory proteins and signal transcution pathways in the cell. Discuss three of these interactions and note where in the cell these interactions are thought to take place.

16. How does phytochrome regulate the activity of COP1, and what affect does this have on photomorphogenesis?

Quelle: Taiz und Zeiger [150]

Blue-Light Responses: Stomatal Movements and Morphogenesis

1. Name and briefly describe three important blue light responses in plants. Include in your description the characteristics of the action spectra of the responses
2. What is phototropin? Describe the properties and postulated role of phototropin in blue light-stimulated phototropism.
3. What is cryptochrome? Describe the properties and postulated role of cryptochrome in blue light-dependent inhibition of stem elongation.
4. Provide three lines of experimental evidence supporting a role of zeaxanthin in blue light-stimulated stomatal opening.
5. Describe in detail the sensory transducing cascade linking blue light photoreception in guard cells with blue light-stimulated stomatal opening.

Quelle: Taiz und Zeiger [150]

weiterführende Literatur

Rezeptoren allgemein

Becraft PW (2001) Plant steroids recognized at the cell surface. Trends in Genetics **17**(2):60–62

Giraudat J (1995) Abscisic acid signaling. Current Opinion in Cell Biology **7**:232–238

Plant RLKs

Morris ER, Walker JC (2003) Receptor-like protein kinases: the keys to response. Current Opinion in Plant Biology **6**(4):339–342

Shiu SH, Bleecker AB (2001) Receptor–like kinases from Arabidopsis form a monophyletic gene family related to animal receptor kinases. PNAS **98**(19):10763–10768

Walker JC (1994) Structure and function of the receptor–like protein kinases of higher plants. Plant Mol Biol **26**:1599–1609

Zwei–Komponenten–Systeme

Chang C, Kwok S, Bleecker A, Meyerowitz E (1993) Arabidopsis ethylene response gene ETR1: similarity of product to two–component regulators. Science **262**:539–544

Lohrmann J, Harter K (2002) Plant Two–Component Signaling Systems and the Role of Response Regulators. Plant Physiol **128**:363–369

Ota I, Varshavsky A (1993) A yeast protein similar to bacterial two–component regulators. Science **262**:566–569

Schneider-Poetsch H (1992) Signal transduction by phytochrome: Phytochromes have a module related to the transmitter modules of bacterial sensor proteins. Photochem Photobiol **56**:839–846

Stock AM, Robinson VL, Goudreau PN (2000) Two–Component Signal Transduction. Annu Rev Biochem

69:183–215

Urao T, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (2000) Two-component systems in plant signal transduction. Trends in Plant Science **5**(2):67–74

Urao T, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (2001) Plant Histidine Kinases: An Emerging Picture of Two-Component Signal Transduction in Hormone and Environmental Responses. Sciences stke S. 1–4

heterotrimere G–Proteine

Assmann SM (2002) Heterotrimeric and Unconventional GTP Binding Proteins in Plant Cell Signaling. Plant Cell **14**(90001):S355–373

Fujisawa Y, Kato H, Iwasaki Y (2001) Structure and Function of Heterotrimeric G Proteins in Plants. Plant Cell Physiol **42**(8):789–794

Mason MG, Botella JR (2000) Completing the heterotrimer: Isolation and characterization of an Arabidopsis thaliana G protein gamma -subunit cDNA. PNAS **97**(26):14784–14788

Mason MG, Botella JR (2001) Isolation of a novel G-protein gamma-subunit from Arabidopsis thaliana and its interaction with Gbeta. Biochim Biophys Acta **1520**(2):147–53

Calcium/Calmodulin

Roberts D, Harmon A (1992) Calcium-modulated proteins: targets of intracellular calcium signals in higer plants. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol **43**:375–414

Roberts D (1993) Protein kinases with calmodulin-like domains: novel targets of calcium signals in plants. Curr Opin Cell Biol **5**:242–246

Zielinski RE (1998) Calmodulin and Calmodulin-Binding Proteins in Plants. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology **49**:697

Zyklische Nukleotide

Moutinho A, Hussey PJ, Trewavas AJ, Malho R (2001) cAMP acts as a second messenger in pollen tube growth and reorientation. PNAS **98**(18):10481–10486

Protein–Kinasen

Shiu SH, Bleecker AB (2001) Receptor–like kinases from Arabidopsis form a monophyletic gene family related to animal receptor kinases. PNAS **98**(19):10763–10768