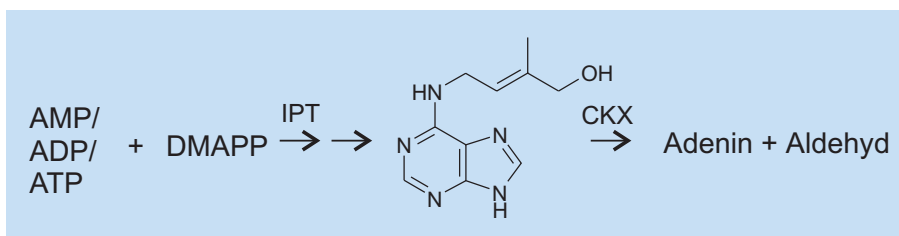


# Metabolismus und Signalübertragung der Cytokinine

Thomas Schmülling,

Institut für Biologie, Angewandte Genetik, Freie Universität Berlin

**Cytokinine sind eine Klasse pflanzlicher Hormone, die eine Vielzahl von Prozessen der pflanzlichen Entwicklung und des pflanzlichen Metabolismus regulieren. Sie spielen eine wesentliche Rolle bei der Zellteilung, der Reifung der Chloroplasten, der Aktivität von Meristemen, der Interaktion mit Pathogenen, sowie der Regulation des Primärmetabolismus. Entdeckt wurden die Cytokinine Mitte der Fünfziger Jahre des vorigen Jahrhunderts. Chemisch sind sie N<sup>6</sup>-substituierte Adeninderivate (Abb. 1). Cytokinine kommen als freie Basen, Riboside und Ribotide vor. Ihre biologische Wirkung entfalten sie wahrscheinlich als freie Base<sup>[1]</sup>.**



**Abb. 1: Biosynthese und Abbau der Cytokinine. Die Struktur zeigt trans-Zeatin, die Leitstruktur der Cytokinine. Abkürzungen: IPT, Isopentenyltransferase; CKX, Cytokininoxidase; DMAPP, Dimethylallyldiphosphat.**

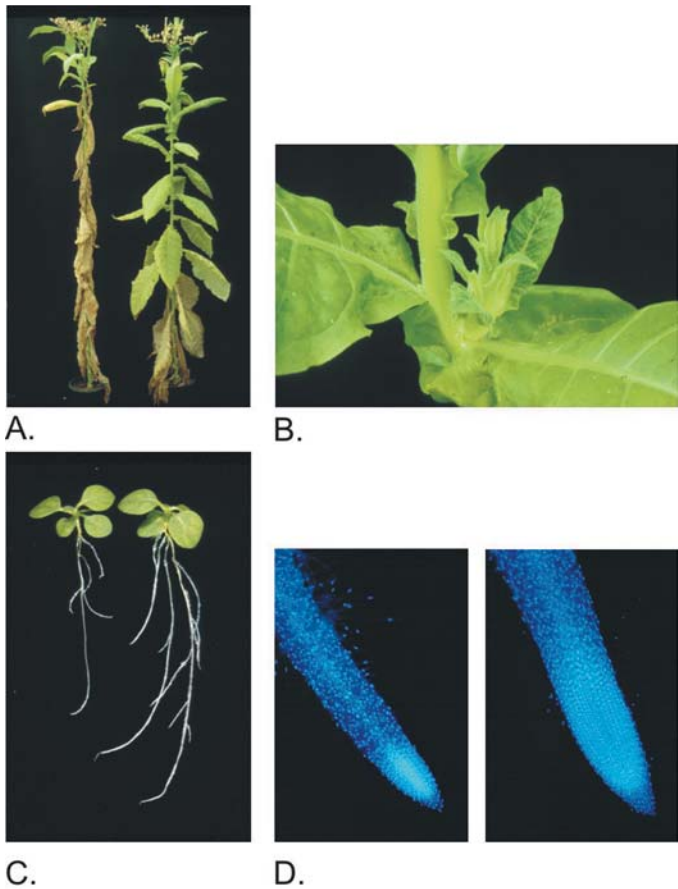
► Die Untersuchung des Metabolismus der Cytokinine und ihrer Funktionsweise war lange Zeit äußerst schwierig, da keine geeigneten Methoden zum Nachweis von nanomolaren Konzentrationen zur Verfügung standen und wichtige biochemische Hilfsmittel wie Hemmstoffe der Biosynthese oder Antagonisten ebenfalls fehlten. Viele genetische Ansätze scheiterten aufgrund der pleiotropen Wirkung des Hormons. An der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* durchgeführte molekulargenetische Untersuchungen führten schließlich in jüngster Zeit zum Durchbruch, wobei die Verfügbarkeit der Genomsequenz von *Arabidopsis* ein Schlüssel zum schnellen Erkenntnisfortschritt war. In den beiden folgenden Abschnitten werden die neuesten Erkenntnisse zum Metabolismus und zur Signalübertragung der Cytokinine zusammengefasst.

## Synthese und Abbau der Cytokinine

Isopentenyltransferasen (IPT) katalysieren den ersten und limitierenden Schritt der Synthese, die Übertragung der Isopentenylgruppe von Dimethylallyldiphosphat (DMAPP) auf ATP, ADP oder AMP<sup>[2, 3]</sup>. Dies führt zur Bildung von Isopentenyl-ATP, -ADP bzw. -AMP, den Vorstufen der biologisch aktiven Cytokinine (Abb. 1). In *Arabidopsis* gibt es sieben *AtIPT*-Gene. Für die Cytokininbiologie konzeptionell wichtig ist, dass diese Gene sowohl in der Wurzel als auch im Spross exprimiert werden. Dies bedeutet, dass die klassische Ansicht, dass Cytokinine nur in der Wurzel synthetisiert werden und im Spross erst nach einem langen Transportweg ihre Wirkung entfalten, modifiziert werden muss. Zumindest für ei-

ne Reihe der Aktivitäten des Hormons ist die bereits früher postulierte parakrine Funktion, d.h. eine lokal begrenzte Bildung und Wirkung, wahrscheinlicher<sup>[4]</sup>. *IPT*-Genexpression führt unter der Kontrolle spezifischer Promotoren aufgrund eines lokal erhöhten Cytokiningehalts in transgenen Pflanzen zu einer verzögerten Blattseneszenz oder einem veränderten Verzweigungsmuster des Sprosses<sup>[4-6; siehe Abb. 2]</sup>.

Cytokininoxidasen bzw. -dehydrogenasen (CKX) werden in *Arabidopsis* ebenfalls von sieben Genen kodiert. Sie überführen in einem einzigen katalytischen Schritt biologisch aktive Cytokinine in unwirksames Adenin und ein Aldehyd<sup>[7, 8; siehe Abb. 1]</sup>. Durch die transgene konstitutive Expression von *CKX*-Genen war es erstmals möglich, Pflanzen mit einem verringerten Gehalt des Hormons herzustellen<sup>[9]</sup>. Von der phänotypischen Analyse dieser Pflanzen wurden eindeutige Aussagen über die Prozesse erhalten, für die Cytokinine limitierend sind. Pflanzen mit einem verringerten Cytokiningehalt sind zwergwüchsig, sie bilden nur ca. 5% der Sprosszellen von Wildtyppflanzen. Das Wurzelsystem ist hingegen stark vergrößert, was ursächlich u.a. auf ein vergrößertes Wurzelmeristem zurückzuführen ist (Abb. 2). Die vergrößerte meristematische Zellpopulation führt zu mehr Wachstum. Cytokinine regulieren offensichtlich die Anzahl der Teilungen, die Zellen vor dem Verlassen des Wurzelmeristems durchlaufen. Im Sprossmeristem und bei der Bildung der Blattzellen finden bei Cytokininmangel hingegen weniger Zellteilungen statt, das Hormon ist hier ein wichtiger fördernder Faktor. Wahrscheinlich werden die unterschiedlichen Wirkungen in Wurzel- und Sprossme-



**Abb. 2: Phänotyp von transgenen Pflanzen, die einen erhöhten oder verringerten Cytokiningehalt aufweisen. A. Die Expression des IPT Gens verzögert die Blattseneszenz. Links Kontrollpflanze, rechts eine transgene Pflanze<sup>[4]</sup>. B. Die Seitensprosse von Pflanzen, die ein IPT-Gen unter der Kontrolle eines Tetrazyklin(Tc)-induzierbaren Promoters enthalten, wachsen nach lokaler Applikation von Tc. C. Pflanzen, die eine Cytokininoxidasegen exprimieren, entwickeln ein schneller wachsendes und stärker verzweigtes Wurzelsystem. Links Kontrollkeimling, rechts der transgene Keimling. D. Das Wurzelmeristem von Pflanzen mit einem verringerten Cytokiningehalt ist im Vergleich zu Kontrollpflanzen (links) vergrößert. Die Wurzelspitzen wurden mit DAPI gefärbt, um Zellkerne sichtbar zu machen<sup>[9]</sup>.**

ristem durch eine spezifische Modulation von Komponenten des Zellzyklus vermittelt.

Zweifelsohne hat die Möglichkeit, Pflanzenwachstum durch die gezielte Veränderung des endogenen Cytokiningehalts zu steuern, auch ein erhebliches biotechnologisches Potential. Zum Beispiel bedeutet ein verbessertes Wurzelsystem einen besseren Zugang zu Mineralien und Wasser – den Faktoren, die häufig Wachstum und Ertrag limitieren. Wie solche Pflanzen ohne nachteilige Auswirkungen auf den Spross durch eine gewebespezifische Veränderung der Hormonkonzentration hergestellt werden können, wird zurzeit in der Angewandten Genetik des Instituts für Biologie der FU Berlin untersucht.

**Signalübertragung der Cytokinine**

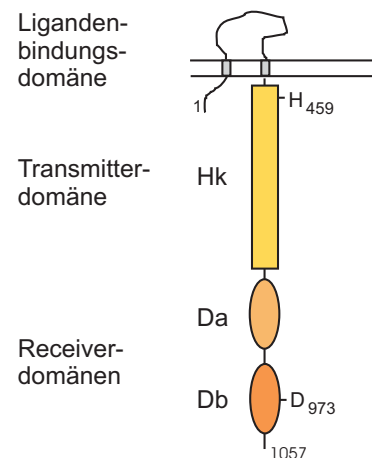
Zeitlich parallel zur Aufklärung von wesentlichen Teilen des Cytokininmetabolismus wurden in den letzten beiden Jahren auch entscheidende Schritte zum Verständnis der Cytokinin-signalübertragung gemacht. Die Identifizierung des ersten Cytokininrezeptors, CRE1/WOL/AHK4, gelang

unabhängig zwei japanischen Arbeitsgruppen<sup>[10,11]</sup>. CRE1 ist eine Rezeptorhistidinkinase mit zwei N-terminalen Transmembran-domänen, die die wahrscheinlich extrazelluläre Rezeptordomäne umschließen. Auf diese folgen auf der vorhergesagten cytoplasmatischen Seite eine Histidinkinase- und zwei sogenannte Receiverdomänen (Abb. 3). Rezeptorhistidinkinasen sind typische Bestandteile von Zweikomponentensignalsystemen. Diese sind bei Bakterien und niederen Eukaryoten sehr verbreitet, unter den höheren Eukaryoten kommen sie nur bei Pflanzen vor. Eine Mutation im CRE1 Gen verursacht eine gestörte Entwicklung des Leitgewebes in der Embryonalentwicklung<sup>[12]</sup>. Dies belegt erstmalig eine Funktion der Cytokinine während der Embryogenese<sup>[13]</sup>.

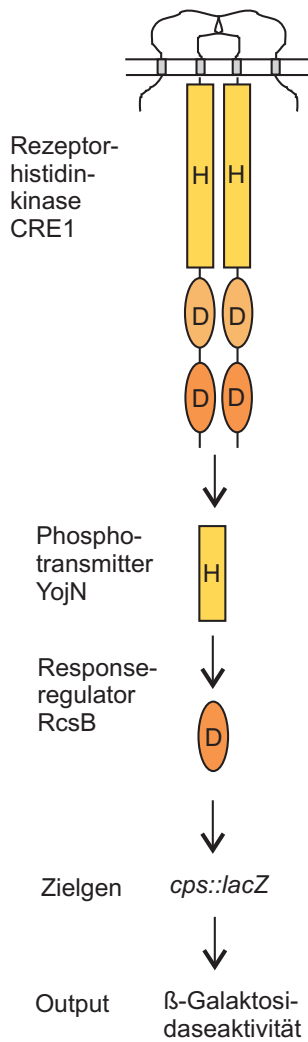
Durch elegante heterologe Komplementationsexperimente wurde nachgewiesen, dass CRE1 und zwei strukturell verwandte Histidinkinasen (AHK2, AHK3) tatsächlich funktionelle Cytokininrezeptoren sind<sup>[10,11,14]</sup>. Der prinzipielle Aufbau von einem der Komplementationsexperimente ist in Abbildung 4 dargestellt. Grundlage ist

eine Ausfallmutation in einem Rezeptorgen (RcsC) der etwa 40 Zweikomponenten-Signalwege in *E. coli*. ResC aktiviert über das Phosphotransmitterprotein YojN und das Responseregulatorprotein RcsB das Caspase(*cps*)-Operon. Expression von CRE1 in *rscC*-Mutantenzellen führt zum Anschalten des Reportergens *cps::lacZ*, allerdings nur in Abhängigkeit von Cytokinen (Abb. 4). Offensichtlich ist der Pflanzenrezeptor in der Lage, mit den bakteriellen Signalübertragungskomponenten zu interagieren. Die Reaktion ist quantitativ messbar oder durch eine Farbreaktion der Bakterienkolonien auf Indikatormedien leicht sichtbar zu machen. Damit wurden Bakterien, die das Pflanzenhormon normalerweise nicht erkennen können, in die Lage versetzt, dieses bereits in niedrigen Konzentrationen ( $10^{-8}$  M) wahrzunehmen<sup>[14]</sup>.

Das derzeit am besten belegte Modell für die Cytokinin-signalübertragung in Pflanzen ist in Abbildung 5 dargestellt. Demzufolge sind daran die typischen Komponenten von komplexen Zweikomponentensystemen beteiligt. Der Phosphorylrest wird nach der durch Cytokinine induzierten Autophosphorylierung des Rezeptordimers auf ein Phosphotransmitterprotein übertragen, dass im aktivierten Zustand in den Kern wandert<sup>[15]</sup>. Dort überträgt es den Phosphorylrest auf Responseregulatoren des B-Typs. Diese bestehen aus einer N-terminalen Receiverdomäne und einer C-terminalen transkriptionellen Aktivierungsdomäne<sup>[16]</sup>. Aktivierte B-Typ-Responseregulatoren transkribieren primäre Antwortgene der Cytokinine, die u.a. Responseregulatoren des A-Typs kodieren<sup>[17]</sup>. Diese sind strukturell dem B-Typ ähnlich, allerdings fehlt ihnen die transkriptionelle Aktivierungsdomäne. Sie erfüllen mindestens zwei Funktionen. Sie hemmen zum einen andere Komponenten



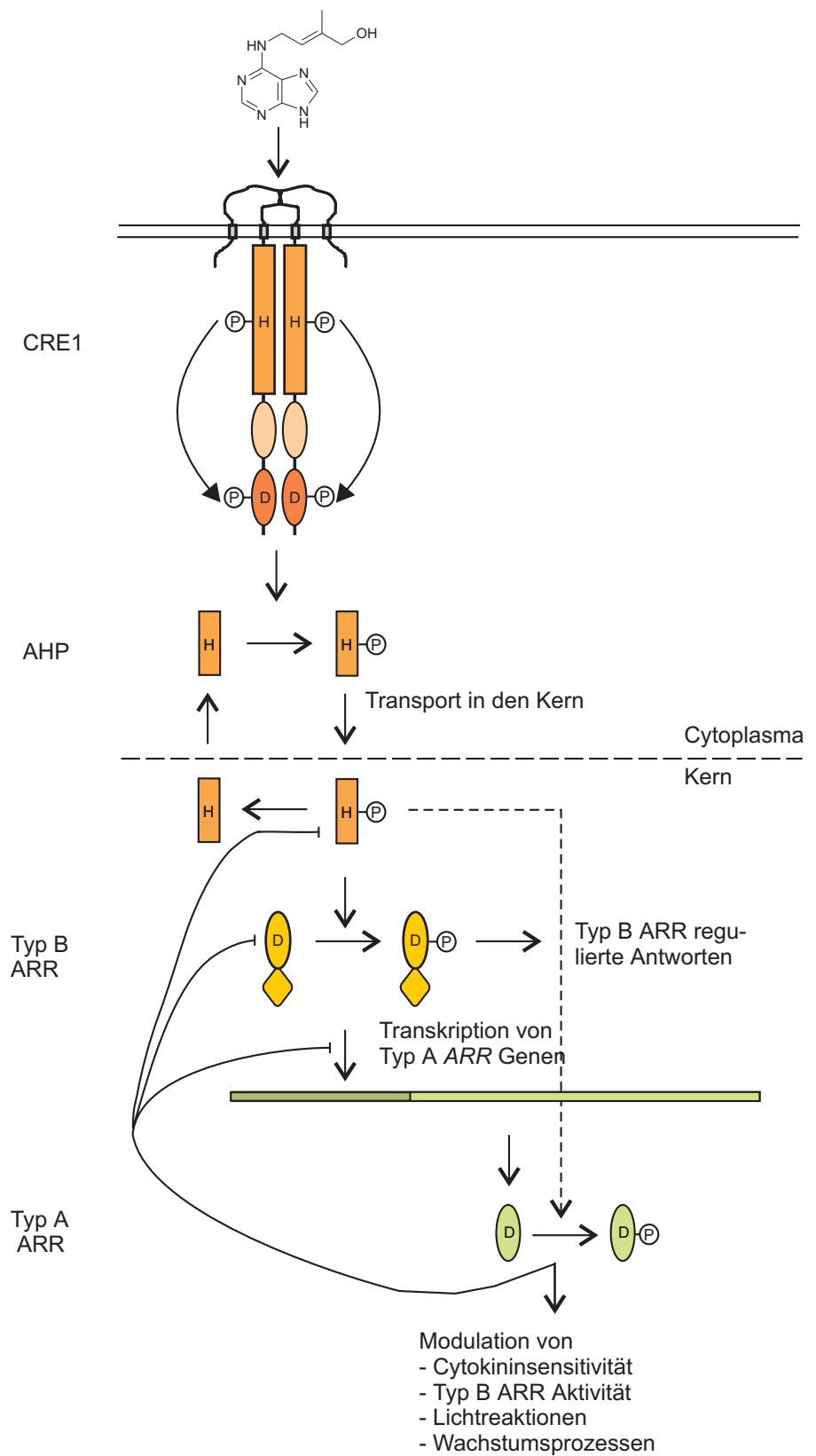
**Abb. 3: Die aus Sequenzdaten abgeleitete Struktur des Cytokininrezeptors CRE1. Hk, Histidinkinase; Da und Db, Receiverdomänen; H, D: essentielle Aminosäuren (Histidin, Aspartat).**



**Abb. 4:** Die heterologe Komplementation einer Rezeptormutante von *E. coli* erbrachte den experimentellen Nachweis, dass CRE1 ein funktioneller Cytokininrezeptor ist. Expression von CRE1 in der *rscC*-Mutante vermittelt cytokininabhängige Expression des Reportergens *cps::lacZ*<sup>[17]</sup>. H, D: Aminosäuren (Histidin, Aspartat), die an der Phosphorylierungskette beteiligt sind.

des Cytokininsignalübertragungswegs durch Protein-Protein-Interaktion, sind also Teil einer negativen Feedback-Regulation<sup>[15]</sup>. Zudem vermitteln sie die cytokininabhängige Regulation weiterer Signalwege. Es wurde gezeigt, dass ein Responseregulator des A-Typs (ARR4) den aktivierten Zustand von Phytochrom B stabilisiert<sup>[18]</sup>. Dies ist der erste Hinweis auf einen molekularen Mechanismus, der Cytokinin- und Lichtwirkung verknüpft.

In den nächsten Schritten wird es darum gehen, die regulatorischen Netzwerke der Cytokininsignalübertragungswegs zur Steuerung von Entwicklung und Metabolismus aufzuklären. Die Methoden der Genom- und Proteomanalyse bieten in *Arabidopsis* den experimentellen Zugang und wer-



**Abb. 5:** Modell der Signalübertragung der Cytokinine. Cytokininbindung induziert Autophosphorylierung der Histidylreste im Rezeptordimer. Der Phosphorylrest wird durch Phosphotransmitterproteine (AHPs) in den Zellkern übertragen, wo Typ B- Responseregulatoren aktiviert werden und in der Folge primäre Antwortgene der Cytokinine transkribieren. U.a. werden Gene für Typ A-Response-regulatoren aktiviert, deren Produkte u.a. eine negative Feedback-Kontrolle ausüben. Nicht alle Teile des Modells sind experimentell belegt<sup>[15]</sup>. H, D: Aminosäuren (Histidin, Aspartat), die an der Phosphorylierungskette beteiligt sind.

den zu schnellen Fortschritten entscheidende Beiträge liefern.

### Danksagung

Ich danke allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern für die engagierte Zusammenarbeit und zahlreiche Beiträge. Während meiner Zeit als Hochschulassistent am Lehrstuhl für Allgemeine Genetik an der Universität Tübingen (Leitung Prof. F. Schöffl) konnte ich von Beginn an völlig unabhängig eine eigene Arbeitsgruppe aufbauen. Später zur Förderung von Nachwuchswissenschaftlern am ZMBP in Tübingen verwirklicht, heute Teil des Konzepts „Juniorprofessur“, damals an einer Universität ein außerordentliches Privileg. Dafür Dank an dieser Stelle. Dank auch an die Deutschen Forschungsgemeinschaft und die Volkswagen-Stiftung für die kontinuierliche Unterstützung unserer Arbeiten.

### Literatur

- [1] **Letham, D.S.** (1994) Cytokinins as phytohormones – sites of biosynthesis, translocation and function of translocated cytokinin. In *Mok DWS, Mok MC (eds) Cytokinins. Chemistry, Activity and Function*. CRC Press, Boca-Raton, p. 57–80.
- [2] **Kakimoto, T.** (2001) Identification of plant cytokinin biosynthetic enzymes as dimethylallyl diphosphate:ATP/ADP isopentenyltransferases. *Plant Cell Physiol.* 42: 677–685.
- [3] **Takei, K., Sakakibara, H. und Sugiyama, T.** (2007) Identification of genes encoding adenylate isopentenyltransferase, a cytokinin biosynthesis enzyme, in *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* 276: 26405–26410.
- [4] **Faïss, M., Zalubilova, J., Strnad, M. und Schmölling, T.** (1997) Conditional transgenic expression of the *ipt* gene indicates a function for cytokinins in paracrine signaling in whole tobacco plants. *Plant J.* 12: 401–415.
- [5] **Gan, S. und Amasino, R.M.** (1995) Inhibition of leaf senescence by autoregulated production of cytokinin. *Science* 270: 1986–1988.
- [6] **Rupp, H., Frank, M., Werner, T., Strnad, M. und Schmölling, T.** (1999) Increased steady state mRNA levels of the *STM* and *KNAT1* homeobox genes in cytokinin overproducing *Arabidopsis thaliana* indicate a role for cytokinins in the shoot apical meristem. *Plant J.* 18: 357–363.
- [7] **Houba-Hérin, N., Pethe, C., d'Alayer, J. und Laloue, M.** (1999) Cytokinin oxidase from *Zea mays*: purification, cDNA cloning and expression in moss protoplasts. *Plant J.* 17: 615–626.
- [8] **Morris, R.O., Bilyeu, K.D., Laskey, J.G. und Cheikh, N.N.** (1999) Isolation of a gene encoding a glycosylated cytokinin oxidase from maize. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 255: 328–333.
- [9] **Werner, T., Motyka, V., Strnad, M. und Schmölling, T.** (2007) Regulation of plant growth by cytokinin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 10487–10492.
- [10] **Inoue, T., Higuchi, M., Hashimoto, Y., Seki, M., Kobayashi, M., Kato, T., Tabata, S., Shinozaki, K. und Kakimoto, T.** (2001) Identification of CRE1 as a cytokinin receptor from *Arabidopsis*. *Nature* 409: 1060–1063.
- [11] **Suzuki, T., Miwa, K., Ishikawa, K., Yamada, H., Aiba, H. und Mizuno, T.** (2007) The *Arabidopsis* sensor kinase, AHK4, can respond to cytokinin. *Plant Cell Physiol.* 42: 107–113.
- [12] **Mähönen, A.P., Bonke, M., Kaupinnen, L., Riikonen, M., Benfey, P.N. und Helariutta, Y.** (2000) A novel two-component hybrid molecule regulates vascular morphogenesis of the *Arabidopsis* root. *Genes Dev.* 14: 2938–2943.
- [13] **Schmölling, T.** (2002) New insights into the functions of cytokinins in plant development. *J. Plant Growth Reg.* 21: 40–49.
- [14] **Yamada, H., Suzuki, T., Terada, K., Takei, K., Ishikawa, K., Miwa, K. und Mizuno, T.** (2007) The *Arabidopsis* AHK4 histidine kinase is a cytokinin-binding receptor that transduces cytokinin signals across the membrane. *Plant Cell Physiol.* 42: 1017–1023.
- [15] **Hwang, I. und Sheen, J.** (2007) Two-component circuitry in *Arabidopsis* cytokinin signal transduction. *Nature* 413: 383–389.
- [16] **Lohrmann, J., Buchholz, G., Keitel, C., Sweere, C., Kircher, S., Bäurle, I., Kudla, J. und Harter, K.** (1999) Differentially-expressed and nuclear-localized response regulator-like proteins from *Arabidopsis thaliana* with transcription factor properties. *Plant Biol* 1: 495–506.
- [17] **D'Agostino, I.B., Deruere, J. und Kieber, J.J.** (2000) Characterization of the response of the *Arabidopsis* response regulator gene family to cytokinin. *Plant Physiol.* 124: 1706–1717.
- [18] **Sweere, U., Eichenberg, K., Lohrmann, J., Mira-Rodado, V., Bäurle, I., Kudla, J., Nagy, F., Schäfer, E. und Harter, K.** (2007) Interaction of the response regulator ARR4 with the photoreceptor phytochrome B in modulating red light signalling. *Science* 294: 1108–1111.



**Thomas Schmölling**

Jahrgang 1958, studierte Biologie in Köln, wo er 1989 am Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung in der Abteilung von Jeff Schell promovierte. Er verbrachte

seine Zeit als Postdoc am gleichen Institut und wechselte 1991 an den Lehrstuhl für Allgemeine Genetik der Universität Tübingen. Habilitation 1997, ab 1999 Forschungsgruppenleiter am Zentrum für Molekularbiologie der Pflanzen (ZMBP) in Tübingen. Seit Herbst 2001 Leitung des Lehrstuhls für Molekulare Entwicklungsbiologie der FU Berlin (Institut für Biologie, Angewandte Genetik).

### Korrespondenzadresse:

**Prof. Dr. Thomas Schmölling**  
**Freie Universität Berlin**  
**Institut für Biologie, Angewandte Genetik**  
**Albrecht-Thaer-Weg 6**  
**D-14195 Berlin**  
**Tel.: 030-83855808**  
**Fax: 030-83854545**  
**tschmue@zedat-fu-berlin.de**