

Zur Funktion der Auxinrezeptoren TIR1 und ABP1 in
Arabidopsis thaliana (L.) HEYNH. und *Zea mays* L.

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
(Dr. rer. nat.)

Dem Department Biologie
der Universität Hamburg
vorgelegt von

Daniel Schenck
aus Hamburg

Hamburg, 2009

Genehmigt vom Department Biologie
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
an der Universität Hamburg
auf Antrag von Priv.-Doz. Dr. H. LÜTHEN
Weiterer Gutachter der Dissertation:
Herr Professor Dr. R. HERTEL
Tag der Disputation: 09. Januar 2009

Hamburg, den 18. Dezember 2008



J. Ganzhorn

Professor Dr. Jörg Ganzhorn
Leiter des Departments Biologie

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	5
Abbildungsverzeichnis	7
Zusammenfassung	8
1. Einleitung	10
1.1 Anfänge der Auxinforschung in der Pflanzenphysiologie	10
1.2 Die Primärantwort auf Auxine: schnelles Streckungswachstum	10
1.3 Auxinrezeptoren und die schnelle Wachstumsantwort	11
1.4 Signalwege im Zellkern: Genexpression	12
1.4.1 Auxinregulierte Gene	12
1.4.2 Regulation der auxininduzierten Genexpression	13
1.4.3 TIR1 – ein Auxinrezeptor zur Steuerung der auxininduzierten Genexpression	17
1.4.4 Physiologie von TIR1 in <i>Arabidopsis thaliana</i>	19
1.4.5 Weitere Auxinrezeptoren im Kern: die AFBs	20
1.4.6 Physiologische Auswirkungen von Einfach- und Mehrfachknockouts der Kernrezeptoren	20
1.4.7 F-Box-Auxinrezeptoren und Streckungswachstum	21
1.5 Das Auxin-Bindeprotein 1	22
1.5.1 Identifikation als Auxinrezeptor	22
1.5.2 Experimente zur Klärung der Lokalisation von ABP1	22
1.5.3 Struktur und Auxinbindemechanismus	23
1.5.4 Physiologie von ABP1 in Protoplasten	25
1.5.5 Die mögliche Signaltransduktion von ABP1	28
1.6 Was ist der Auxinrezeptor für das schnelle auxininduzierte Wachstum?	28
1.6.1 Vermitteln TIR1/AFB das schnelle Streckungswachstum?	28
1.6.2 Vermittelt ABP1 das schnelle Streckungswachstum?	29
1.7 Zielsetzung	30
2. Material und Methoden	32
2.1 Wachstumsversuche	32
2.2 Fluoreszenzmessung von intakten <i>DR5rev::GFP-Col</i> Keimlingen und geschnittenen Hypokotylen	35
2.3 Fluoreszenz- und Schwellmessungen von <i>DR5rev::GFP-Col-0</i> - Protoplasten	36
2.4 Affinitätschromatographie	40
3. Ergebnisse	50
3.1 Messung des schnellen Streckungswachstums von Hypokotylsegmenten	50
3.2 Streckungswachstum der F-Box-Einzelmutanten	51
3.3 Streckungswachstum der F-Box-Mehrfachmutanten	53

3.4 Untersuchungen zum Auxintransport der Mehrfachmutanten	59
3.5 Detektion der auxininduzierten Genexpression mit Hilfe der <i>DR5rev::GFP</i> - Reporter gentechnik	60
3.6 Untersuchungen zur Klärung der verlängerten lag-Phase der Quadrupelmutante	63
3.7 Untersuchungen zur Rezeptorrolle von ABP1	65
3.8 Messungen zur ABP1-induzierten Genexpression auxininduzierter Gene	69
3.9 Aufreinigung eines ABP1-bindenden Proteins mittels Affinitätschromatographie	71
4. Diskussion.....	75
4.1 Untersuchungen zum schnellen auxininduzierten Streckungswachstum.....	75
4.1.1 Vermitteln TIR1/AFB direkt das schnelle auxininduzierte Streckungswachstum?..	75
4.1.2 ABP1-Überexprimierer sind auxinhypersensitiv	82
4.2 ABP1 induziert keine auxininduzierte Genexpression.....	83
4.3 Ein ABP1-bindendes Plasmamembranprotein gemäß der Dockingprotein-Hypothese konnte nicht gefunden werden.....	84
4.4 Ein möglicher Signalweg von ABP1	84
4.5 Fazit.....	87
5. Literatur	88
Anhang A: Ubiquitinierung am durch den SCF ^{TIR1} -Komplex.....	98
Anhang B: Herstellung der ABP1-Überexprimierer	99
Lebenslauf	100
Publikationsliste	101
Danksagung.....	102

Abkürzungsverzeichnis

2,4-D	2,4-Dichlorphenoxyessigsäure
2,4-DM	2,4-Dichlorphenoxyessigsäure Methylester
ABP1	Auxin-Bindeprotein 1 (Auxinrezeptor)
AD	Activation Domain
ADU	Analog Digital Units
AFB	Auxin F-Box (Auxinrezeptor)
ARF	Auxin Response Factor (Transkriptionsfaktor)
ASK1	Arabidopsis S-Phase Kinase related Protein (Teil des SCF-Komplexes)
AUX1	Auxin1 (Auxin-Influxcarrier)
AUX/IAA-Gene	Auxin/Indole-3-Acetic-Acid-Gene
AuxRE	Auxin Response Element
AXR1	Auxin Resistant 1 (Teil des SCF-Komplexes)
CAND1	Cullin Associated and Neddylation Dissociated (Teil des SCF-Komplexes)
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonat
Col-0	Columbia-0 (Ökotyp)
COP9	Constitutive Photomorphogenesis 9 (Teil des SCF-Komplexes)
CCD	Charged Coupled Device
CNBr	Cyanogen Bromide
CTD	Carboxyterminale Dimerisierungsdomäne
CUL1	Cullin 1 (Teil des SCF-Komplexes)
DDM	Dodecylmaltosid
DR5	Synthetischer auxinresponsiver Promotor
DTT	Dithiothreitol
E2	Enzyme 2 (Teil des SCF-Komplexes)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFP	Enhanced Green Fluorescent Protein
ER	Endoplasmatisches Reticulum
ESI-MS-MS	Elektrosprayionisations-Tandemmassenspektrometrie
ERD2	ER-Retention-Defective 2 (ER-Retentionsprotein)
FC	Fusicoccin
FPLC	Fast Performance Liquid Chromatography
GFP	Grün Fluoreszierendes Protein
GH3-Gene	Gretchen-Hagen-3-Gene
GUS	Glucuronidase
H ⁺ -ATPase	Protonenpumpe
IAA	Indole-3-acetic acid = Indol-3-Essigsäure

JIP-23	Jasmonic Acid Induced Protein (23 kDa)
KDEL	ER-Retentionssignal
LAX3	Like Auxin 1 (Auxininfluxcarrier)
MDH	Malatdehydrogenase
NAA	Naphtylessigsäure
NASC	Nottingham Arabidopsis Stock Centre
NPA	1-N-Naphthylphtalaminsäure
PCR	Polymerase Chain Reaction
PEG	Polyethylenglycol
PM	Plasmamembran
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
PVP	Polyvinylpyrrolidon
RBX1	Ring Box 1 (Teil des SCF-Komplexes)
RD	Repression Domain
RUB	Related to Ubiquitin (Teil des SCF-Komplexes)
RAV-B3	Related to ABI3/VP1 – Basic 3 (DNA-Bindedomäne)
SAUR-Gene	Small Auxin Upregulated genes
SCF-Komplex	Skp Cullin F-Box – Proteinkomplex
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SKP1	S-Phase Kinase associated Protein 1 (Teil des SCF-Komplexes)
SKU5	abgeleitet von Skewing = Schrägstellung (mögliches ABP1-Bindeprotein)
T-DNA	Transfer-DNA
TIR1	Transport Inhibitor Resistant 1 (Auxinrezeptor)
Ub	Ubiquitin
Ws	Wassilewskija (Ökotyp)

Abbildungsverzeichnis

1.1	3D-Struktur von RAV1-B3.....	13
1.2	Interaktionen zwischen ARFs und AUX/IAAs.....	15
1.3	3D-Struktur von TIR1.....	17
1.4	Der SCF ^{TIR1} -Komplex.....	19
1.5	3D-Struktur des ABP1-Dimers.....	24
1.6	Schematische Darstellung der Bindung verschiedener Effektoren an ABP1.....	27
2.1	NaCl-Gradient zur Elution der Affinitätssäule.....	45
3.1	Zugabe verschiedener IAA-Konzentrationen zu Col-0-Hypokotylsegmenten.....	50
3.2	IAA-induziertes Streckungswachstum von F-Box-Einzelmutanten.....	51
3.3	2,4-D-induziertes Streckungswachstum von F-Box-Einzelmutanten.....	52
3.4	Habitus von Wildtyp, Tripelmutante und Quadrupelmutante.....	54
3.5	IAA-induziertes Streckungswachstum von F-Box-Mehrfachmutanten.....	56
3.6	2,4-D-induziertes Streckungswachstum von F-Box-Mehrfachmutanten.....	57
3.7	Dosis-Wirkungskurven der F-Box-Mehrfachmutanten und von Col-0.....	58
3.8	2,4-DM-induziertes Streckungswachstum der F-Box-Mehrfachmutanten.....	60
3.9	Zeitlicher Verlauf der GFP-Expression in Wurzeln.....	61
3.10	IAA-induziertes Streckungswachstum der DR5rev::GFP-Tripelmutante und Zeitlicher Verlauf der GFP-Expression in Hypokotylen.....	62
3.11	FC-induziertes Streckungswachstum der Quadrupelmutante.....	64
3.12	Die Dauer der lag-Phase bei der Quadrupelmutante.....	64
3.13	IAA-induziertes Streckungswachstum von ABP1-Überexprimierern.....	66
3.14	Dosis-Wirkungskurven der ABP1-Überexprimierer und Col-0.....	67
3.15	IAA-induziertes Streckungswachstum vom EGFP-ABP1-Überexprimierer.....	68
3.16	Schwellreaktion von DR5rev::GFP-Col-0-Protoplasten nach Applizierung von IAA.....	69
3.17	Photometrische Messung der GFP-Fluoreszenz in DR5rev::GFP-Col-0-Protoplasten.....	70
3.18	Affinitätschromatographie Plasmamembranfraktion von Maiskoleoptilen.....	71
3.19	SDS-PAGE der Plasmamembran- und mikrosomalen Fraktion von Maiskoleoptilen.....	72
4.1	Modell des ABP1-Signalweges.....	86
Anhang A	Modell der TIR1-vermittelten Ubiquitinierung am SCFTIR1-Komplex.....	98

Zusammenfassung

Auxine besitzen eine vielfältige Wirkung auf den pflanzlichen Organismus. Die Induktion der Blütenreife, Fruchtentwicklung und Apikaldominanz und Streckungswachstum sind wichtige Funktionen dieser Hormone, die die Entwicklung einer Pflanze maßgeblich steuern. Die beiden Auxinrezeptorsysteme TIR1/AFB und ABP1 regulieren dabei über zum Teil unbekannte Signalwege die Reaktion der pflanzlichen Zelle. Insbesondere die Signalwege, die das schnelle auxininduzierte Streckungswachstum vermitteln, sind bis heute nicht geklärt.

Die Auxinrezeptorrolle von TIR1 wurde 2005 durch zwei Arbeitsgruppen unabhängig voneinander aufgeklärt (Dharmasiri *et al.* 2005a, Kepinsky und Leyser 2005). TIR1, ein Teil des SCF^{TIR1}-Ubiquitinligasekomplexes, induziert nach Auxinbindung direkt die Expression auxinspezifischer Gene und nimmt damit einen entscheidenden Einfluss auf die Entwicklung der Pflanze. Es wurden sehr bald 5 weitere Homologe von TIR1 (AFB1, AFB2...AFB5) entdeckt, die mit TIR1 zusammen ein System redundanter Rezeptoren bilden. Dass die durch TIR1/AFB ausgelöste Expression auxininduzierter Gene direkt für die Auslösung des Streckungswachstums verantwortlich ist, ist zwar oft behauptet, aber bisher nie gezeigt worden.

Auch ABP1 hat eine entscheidende Funktion für die Entwicklung der Pflanze: der Knockout von ABP1 ist embryolethal (Chen 2001). Seit seiner Aufreinigung im Jahre 1985 (Löbner und Klämbt) wurde die Funktion dieses Proteins aber nicht aufgeklärt. Es gab seit der Entdeckung von ABP1 Hinweise, dass dieses Protein nach Auxinbindung wachstumsrelevante Prozesse an der Plasmamembran wie Hyperpolarisierung (Barbier-Brygoo *et al.* 1989) und Protonenefflux (Rück *et al.* 1993) vermittelt, Beweise für die direkte Vermittlung des Streckungswachstums gibt es hier wie im Falle von TIR1 bis heute nicht. Ebenfalls unbekannt ist, ob ABP1 einen Signalweg zur Expression von Genen vermittelt oder ob ein Crosstalk mit TIR1 stattfindet.

Ziele

Das Ziel dieser Arbeit war es, durch hochauflösende Messung des Streckungswachstums von Signaltransduktionsmutanten sowie Quantifizierung der auxininduzierten Genexpression mit Hilfe der *DR5rev::GFP*-Reporter gentechnik die Funktion von TIR1 und ABP1 aufzuklären.

Ergebnisse zu TIR/AFB

Einzelmutanten der Rezeptoren hatten keinen starken Einfluss auf die Zeitverläufe des auxininduzierten Wachstums. Auch Dreifachknockouts (*tir1-1 afb2-3 afb3-4*) und selbst ein Vierfachknockout (*tir1-1 afb1-3 afb2-3 afb3-4*) reagierten noch mit einer vollen

Wachstumsantwort auf das natürliche Auxin IAA. Demgegenüber war bereits in der Dreifachmutante die über *DR5rev::GFP* gemessene auxininduzierte Genexpression kaum noch nachweisbar.

Die in der Literatur (Dharmasiri *et al.* 2005b) gezeigte Resistenz dieser Mehrfachmutanten gegen das synthetische Pflanzenhormon 2,4-D wurde in der vorliegenden Arbeit ebenfalls beobachtet, hier konnte aber durch Verwendung des carrierunabhängigen 2,4-D Methylesters gezeigt werden, dass diese Resistenz lediglich auf einem gestörten Auxintransport und nicht auf einer gestörten Auxinperzeption beruht.

Es wurde weiterhin eine starke Verzögerung des Streckungswachstums bei den Drei- und Vierfachknockouts beobachtet. Durch Verwendung des von der Genexpression unabhängigen Effektors Fusicoccin konnte gezeigt werden, dass diese Verzögerung nicht direkt auf der auxininduzierten Genexpression, sondern durch geringere Level vorhandener wachstumsrelevanter Proteine bedingt ist.

Ergebnisse zu ABP1

Da Knockouts von ABP1 embryolethal sind, wurde in dieser Arbeit die Wachstumsreaktion von ABP1-Überexprimierern gemessen. Hierbei zeigte sich eine Hypersensitivität der transgenen Pflanzen im Wachstumstest, was für die direkte Vermittlung der Wachstumsreaktion durch ABP1 spricht.

An Protoplasten konnte ferner gezeigt wird, dass Oligopeptide mit der C-terminalen Sequenz von ABP1, die den ABP1-Signalweg aktivieren, den auxinresponsiven *DR5*-Promotor nicht aktivieren konnten, und somit ABP1 vermutlich keinen direkten Einfluss auf die Expression auxininduzierter Gene hat.

Fazit

Insgesamt deuten die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit darauf hin, dass die von TIR1/AFB regulierte Genexpression wichtige Bausteine der Wachstumsmaschinerie bereitstellt, aber intrazelluläres ABP1 der für die direkte Auslösung des auxininduzierten Wachstums verantwortliche Rezeptor ist. Im Falle von ABP1 konnten auch Hinweise auf den putativen Auxinbindeort von ABP1, den *cis*-Golgi, und die wahrscheinliche Sekretion von ABP1 in den Apoplasten gefunden werden.

1. Einleitung

1.1 Anfänge der Auxinforschung in der Pflanzenphysiologie

Als die Struktur des Pflanzenhormons Indol-3-Essigsäure (IAA) aufgeklärt wurde, untersuchte man die Signaltransduktion noch nicht auf der biochemischen Ebene. Vielmehr wurden mit physiologischen Versuchen die Grundlagen der Hormonwirkung auf die Entwicklung der Pflanze analysiert. Von der Apikaldominanz über die Steuerung der Seitenwurzelbildung, Blütenbildung, Fruchtreife, Wundheilung und Blattabscission bestimmt IAA die Architektur des pflanzlichen Bauplans und ist ein bestimmender Zeitgeber für die Differenzierung aller höheren Pflanzen. Insbesondere reguliert das Auxin einen zentralen Prozess der pflanzlichen Entwicklung, das Streckungswachstum. Die Relevanz des Streckungswachstums ist sehr typisch für höhere Landpflanzen. Während Tiere prinzipiell durch Mobilität ihre Umwelt erschließen, müssen Landpflanzen dies durch Streckungswachstum erreichen, indem sie ihre Umwelt „erwachsen“. Algen können sich darauf verlassen, dass Nährstoffe über die Meeresströmungen herbeigeschafft werden. Die Wurzel einer Landpflanze muss durch ständiges Wachstum Nährstoffe und Wasser im Boden finden, und oberirdisch durch Höhenwachstum und Blattwachstum die Versorgung mit einem ausreichenden Lichtstrom für die Photosynthese sicherstellen. Dieses gerichtete Wachstum wird durch den gerichteten Auxintransport garantiert. Gerichtet kann dieser Transport nur deswegen funktionieren, weil das Pflanzenhormon über in der Plasmamembran sitzende Influx- und Effluxcarrier transportiert wird, die durch ihre Lokalisation in der Membran die Richtung des Auxintransportes bestimmen (Tanaka *et al.* 2006).

Beim auxininduzierten Streckungswachstum fällt auf, dass eine Pflanze in sehr kurzer Zeit auf exogen appliziertes Auxin reagieren kann. Bereits 10 Minuten nach einer Zugabe von Auxin beginnt ein Hypokotylsegment sich zu strecken, man nennt diesen Effekt die Primärantwort auf Auxin. Die Pflanze reagiert also sehr schnell auf sich ändernde Hormonkonzentrationen, und dieser schnelle Effekt ist die klassische Auxinantwort.

1.2 Die Primärantwort auf Auxine: schnelles Streckungswachstum

Das schnelle Streckungswachstum findet hauptsächlich in der Streckungszone von Koleptilen, Hypokotylen oder Wurzeln statt. Sie basiert auf der Streckung von Zellen, die in dieser Zone liegen, einige Millimeter unterhalb der Spitze des Organs. Die Zellen von Hypokotylen oder Coleoptilen beantworten das Auxinsignal mit einer Erhöhung der Zellwanddehnbarkeit (Cosgrove 1999). Die pflanzliche Zelle kann dann mit Hilfe des Turgordrucks an Volumen gewinnen, die Volumenzunahme wiederum beruht auf der

osmotischen Wasseraufnahme der Zelle, die während des Streckungsprozesses aufrechterhalten wird. Eine pflanzliche Zelle vergrößert ihr Volumen bei der Zellstreckung um ein Vielfaches. Das für die Wasseraufnahme nötige osmotische Potential wird hauptsächlich durch die zusätzliche Aufnahme von Kaliumionen stabilisiert. Die durch die Ausschleusung von Protonen bedingte Membranpotentialerhöhung führt zur Öffnung von Kaliumkanälen, die durch Kaliuminflux einen Ladungsausgleich bewirken (Claussen *et al.* 1997, Fuchs *et al.* 2006).

Man kann daher an mehreren Indikatoren Auxineffekte messen:

1. Volumenveränderung der Zellen/Gewebe
2. pH-Absenkung außerhalb der Zellen/Gewebe
3. Membranhyperpolarisierung
4. Erhöhung der Zellwanddehnbarkeit
5. Stromfluss an Kaliumkanälen

Veränderungen der hier genannten Größen sind unmittelbare Zeichen für stattfindendes oder unmittelbar bevorstehendes Streckungswachstum der Pflanze. Da der Auxineffekt innerhalb weniger Minuten einsetzt, ist es für den Auxinforscher nötig, über Methoden zur zeitlich hochauflösenden Erfassung dieser Größen zu verfügen.

1.3 Auxinrezeptoren und die schnelle Wachstumsantwort

Die Frage nach den Proteinen, die Auxine binden und das Signal dieser einfach strukturierten Phytohormone für die vielfältigen physiologischen Prozesse transduzieren, war seit der biochemischen Charakterisierung in den dreißiger Jahren eine wichtige Frage der Pflanzenphysiologie und ist es bis heute geblieben.

Zurzeit werden zwei Proteine diskutiert, die das Auxinsignal perzipieren und die Primärantwort, das schnelle Streckungswachstum, auslösen. Diese beiden Auxinrezeptoren zeichnen sich durch ihre Verschiedenheit aus. ABP1 (Auxin-Bindeprotein 1) ist ein lösliches, im ER und auf der Außenseite der Plasmamembran lokalisiertes Dimer, dessen Signaltransduktionsweg seit der Entdeckung (Hertel *et al.* 1972, Dohrmann *et al.* 1978, Löbler und Klämbt 1985) nicht aufgeklärt werden konnte. TIR1 (Transport Inhibitor Response 1, Rügger *et al.* 1997) hingegen ist ein nukleäres Protein und Bestandteil eines Proteinkomplexes, dessen Funktion – die schnelle Regulation der Expression auxininduzierter Gene – heute gut untersucht ist. Die Tatsache, dass es sich bei TIR1 um einen Auxinrezeptor

handelt, wurde erst 2005 durch zwei Forschergruppen unabhängig voneinander aufgeklärt (Dharmasiri *et al.*, Kepinski und Leyser).

1.4 Signalwege im Zellkern: Genexpression

1.4.1 Auxinregulierte Gene

Eine große Anzahl von Genen wird durch Auxin reguliert. Dazu gehören die *GH3*-Gene (Hagen *et al.* 1984), die *SAUR*-Gene (Small Auxin Up Regulated, McClure und Guilfoyle 1987), die Gruppe der *AUX/IAA*-Gene (Auxin/Indole-3-acetic acid, Walker und Key 1982) und noch weitere Gene (Overvoorde *et al.* 2005).

Die genaue Funktion der Genprodukte dieser Gruppen von Genen ist nicht immer bekannt (Überblick in Hagen und Guilfoyle 2002). Die Aktivität der auxininduzierten Gene wird durch Auxinpromotoren reguliert, welche sogenannte AuxREs (Auxin Response Elements) besitzen. AuxREs bestehen aus einer charakteristischen Basenfolge, welche sich mehrfach wiederholen oder durch bestimmte Basen ergänzt sein kann. Ein zentraler Teil der AuxREs ist die Basenfolge TGTCTC. Die AuxREs sind die Ansatzpunkte für die durch Auxin aktivierte Transkriptionsmaschinerie (Ulmasov *et al.* 1995)

1.4.1.1 Die SAUR-Gene

Etwa 2-5 Minuten nach der Inkubation von Sojabohnen-Hypokotylsegmenten mit dem synthetischen Auxin 2,4-D werden mRNAs dieser Gene transkribiert (McClure und Guilfoyle 1987, Gee *et al.* 1991). Sie kodieren Proteine mit 9-10 kDa Molekulargewicht. Sie werden im gesamten Hypokotyl gebildet, jedoch besonders stark in der Epidermis und kortikalen Zellen. Die Funktion ist größtenteils unbekannt. Yang und Poovaiah zeigten 2000, dass einige SAUR-Proteine Calmodulin binden, ein Calcium-bindendes regulatorisches Protein. Es gibt über 70 *SAUR*-Gene in *A. thaliana*.

1.4.1.2 Die GH3-Gene

Auch diese Gruppe von Genen wird wenige Minuten nach Auxinzugabe transkribiert (Gee *et al.* 1991). Die Genprodukte sind Proteine von 65-70 kDa Molekulargewicht, insgesamt sind 19 *GH3*-Gene bekannt. Bei vielen *GH3*-Genen ist die Funktion unklar. Sie zeichnen sich nicht durch charakteristische Domänen oder Motive aus. Bei einigen *GH3*-Genen konnte die Funktion gezeigt werden. Sieben zur *GH3*-Familie gehörende Proteine stellten sich als IAA-Aminosäuresynthasen aus, d.h. sie spielen eine Rolle im IAA-Konjugatmetabolismus der Pflanze (Staswick *et al.* 2005).

1.4.1.3 Die AUX/IAA-Gene

Die AUX/IAA-Gene (Abel *et al.* 1995) spielen eine besondere Rolle, da ihre Genprodukte Repressoren der auxininduzierten Genexpression sind (Guilfoyle *et al.* 1998). Somit begrenzen sie über eine negative Rückkopplung die durch Auxine induzierte Genexpression (Liscum und Reed 2002). Sie interagieren mit Transkriptionsfaktoren, die die Expression auxininduzierter Gene regulieren. Über einen komplexen Degradationsprozess, in den TIR1 involviert ist, werden sie in Abhängigkeit von der Auxinkonzentration in der pflanzlichen Zelle abgebaut. Sie unterliegen auch ohne anwesendes Auxin einem sehr schnellen Turnover mit einer Halbwertszeit von etwa 7 Minuten (Abel und Theologis 1994).

1.4.1.4 Weitere auxininduzierte Gene

Ein für das Streckungswachstum wahrscheinlich sehr wichtiges auxininduziertes Protein ist die plasmamembranständige Protonenpumpe (Hager *et al.* 1990). In *A. thaliana* wird sie durch eine Genfamilie mit 12 Genen kodiert (Arango *et al.* 2003). Ebenfalls durch Auxin werden die Gene einwärtsgerichteter Kaliumkanäle (Phillipar *et al.* 2004) und Auxin-Influxcarrier induziert. Der Influxcarrier LAX3 ist hochspezifisch für IAA und 2,4-D und verfügt über mehrere AuxREs (Swarup *et al.* 2008).

1.4.2 Regulation der auxininduzierten Genexpression

1.4.2.1 Auxin Response Factors (ARFs)

Die Expression auxininduzierter Gene wird über Transkriptionsfaktoren, die sogenannten ARFs (Auxin Response Factors, Ulmasov *et al.* 1997b) kontrolliert. Bis heute sind 22 verschiedene ARFs in *A. thaliana* bekannt, die alle als Dimer oder Monomer an AuxREs binden können.

In Abb. 1.1 ist ein 3D-Strukturmodell von RAV1-B3, der DNA-Bindedomäne eines pflanzlichen durch Kältestress regulierten Transkriptionsfaktors, dargestellt (Yamasaki *et al.* 2004). Die B3-Domäne ist ein Teil der ARFs, sowie auch der in der Molekularbiologie häufig eingesetzten Restriktionsendonuklease EcoRII. Sie ist hochkonserviert in allen Organismen.

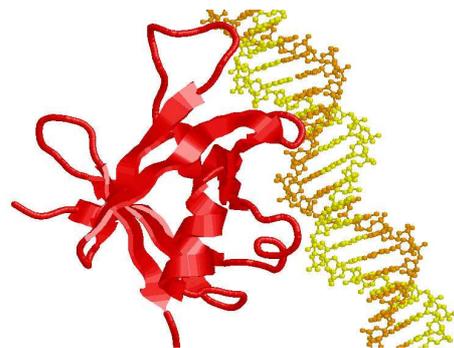


Abb. 1.1: 3D-Struktur von RAV1-B3 bei der Bindung an die DNA. Das Modell wurde mit Chime, einer Software zur grafischen Darstellung von 3D-Strukturen, erstellt.

Die ARFs binden sehr spezifisch an eine im Auxinpromotor enthaltene DNA-Sequenz mit der Basenfolge TGTCTC und erleichtern in bestimmten Fällen die Bindung der RNA-Polymerase an die DNA. Die meisten ARFs können dimerisieren: sie besitzen neben der DNA-Bindedomäne fast alle auch eine carboxyterminale Dimerisierungsdomäne (CTD). Durch die Dimerisierung wird der Effekt eines ARFs wahrscheinlich verstärkt (Tiwari *et al.* 2003). Niedrig auflösende Northern Blots zeigen, dass die ARFs 1-10 in jedem Organ der Pflanze exprimiert werden (Ulmasov *et al.* 1999a). Über die Steuerung der Expression der ARFs ist wenig bekannt.

1.4.2.2 Aktivator-ARFs und Repressor-ARFs

Eine weitere sehr wichtige Domäne eines ARF-Proteins ist ein als Activation Domain (AD) oder Repression Domain (RD) bezeichneter Bereich, carboxyterminal der DNA-Bindedomäne liegend. Während RDs über viele Serin-, Prolin-, Leucin- und Glycinreste verfügen, sind ADs angereichert mit Glutaminresten. Es ist davon auszugehen, dass die Prolinreste der RDs durch ihre besonders starken Einflüsse auf die Proteinfaltung die Interaktion mit der Transkriptionsmaschinerie verhindern. Die ARFs 1-4, 9-18 sowie 20-22 verfügen über eine Repressordomäne. Lediglich fünf ARFs (5-8 sowie 19) verfügen über eine glutaminreiche Aktivator-domäne (Guilfoyle und Hagen 2007).

1.4.2.3 AUX/IAA-Proteine und Aktivator-ARFs

Für die fünf ARFs, die mit glutaminreichen Aktivator-domänen ausgestattet sind, spielen die oben erwähnten AUX/IAA-Repressorproteine eine wichtige Rolle. AUX/IAA-Proteine verfügen auch über eine carboxyterminale Dimerisierungsdomäne, die mit den CTDs von Aktivator-ARFs interagieren kann. In diesem Fall kommt es zur Heterodimerisierung von ARF und AUX/IAA-Protein und damit zur Repression der durch Aktivator-ARFs normalerweise induzierten Transkription. Somit können aktivierende ARFs als Monomer oder Dimer nur in Abwesenheit von AUX/IAAs aktivierend wirken (Tiwari *et al.* 2003).

Inwiefern bestimmte AUX/IAAs an bestimmte mit Aktivator-domänen ausgestattete ARFs binden, ist nicht immer bekannt (Hagen und Guilfoyle 2002), es gibt jedoch Hinweise darauf, dass sich aus der Kombination der 5 glutaminreichen ARFs und 29 AUX/IAAs komplexe Genexpressionsmechanismen in den verschiedenen Geweben der Pflanze ergeben (Nagpal *et al.* 2005, Weijers *et al.* 2005, Wilmoth *et al.* 2005, Uehara *et al.* 2008) (Abb. 1.2).

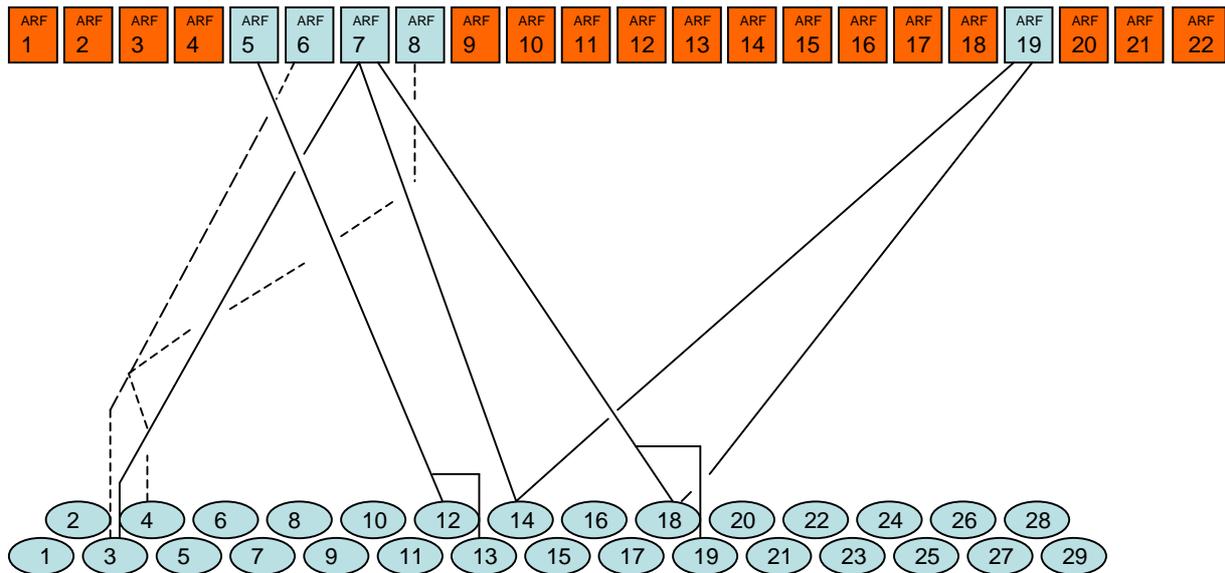


Abb. 1.2: Bis heute bekannte Interaktionen zwischen ARFs und AUX/IAAs. Die als Ellipsen dargestellten AUX/IAAs können nur mit den blau gekennzeichneten Aktivator-ARFs interagieren. Die gestrichelten Linien zeigen eine vermutliche Interaktion auf. Der Kenntnisstand von heute ist unvollständig. Es kann davon ausgegangen werden, dass alle AUX/IAAs zur Interaktion mit Aktivator-ARFs fähig sind.

Overvoorde *et al.* haben 2005 in *A. thaliana* Insertionsmutanten in 12 der 29 *AUX/IAA*-Gene hergestellt. Meist handelte es sich um Einzelmutanten, in einigen Fällen wurden auch Doppel- und Dreifachmutanten von evolutionär besonders stark verwandten *AUX/IAA*-Genen erzeugt. In keinem der Fälle zeigten sich im Phänotyp der untersuchten Mutanten Unterschiede zum Wildtyp. In physiologischen Versuchen zur Auxinantwort der Wurzeln ließen sich auch keine Unterschiede zum Wildtypintergrund erkennen. Mit Hilfe eines Affymetrix Genchips wurde von Overvoorde *et al.* die Expression von 22.810 Genen untersucht. Es stellte sich dabei heraus, dass die Deletion eines einzelnen *AUX/IAA*-Gens (17) oder eine dreifache Deletion (*iaa5 iaa6 iaa19*) keinen oder kaum einen Einfluss auf die Expression auxininduzierter Gene hat. Diese Ergebnisse sprechen für ein redundantes *AUX/IAA*-System, in dem nicht bestimmte *AUX/IAAs* bestimmte ARFs blockieren.

1.4.2.4 *AUX/IAA*-Proteine und Repressor-ARFs

Es ist unwahrscheinlich, dass die ARFs mit Repressordomäne direkt oder indirekt mit der Auxinsignaltransduktion zu tun haben. ARF3, 13 und 17 besitzen keine C-terminale Dimerisierungsdomäne, sie können auf keinen Fall mit *AUX/IAA*-Repressoren interagieren. Tiwari *et al.* (2003) zeigten in teilweise unveröffentlichten Versuchen, dass die ARF-

Repressoren 1 und 2 keine oder kaum eine Interaktion mit AUX/IAA17 sowie weiteren AUX/IAAs haben.

In Abbildung 1.2 wird der Stand der Kenntnisse über die Interaktion von ARFs und AUX/IAA-Proteinen zusammengefasst. In Tabelle 1.1 wird die Funktion der ARFs aufgelistet. Trotz der Unvollständigkeit von Abbildung 1.2 und Tabelle 1.1 ist auch hier zu erkennen, dass auxingesteuerte Prozesse wie Blütenbildung, Seitenwurzelbildung und Tropismen offensichtlich durch die mit Aktivator-domänen ausgestatteten ARFs genreguliert werden, wohingegen die RD-ARFs nicht durch Auxin induzierte Gene regulieren.

	Repressor/Aktivator-domäne	Regulierte Prozesse	Interaktion mit AUX/IAA
ARF1	RD	Seneszenz	-
ARF2	RD	Seneszenz	-
ARF3	RD (ohne CTD)	Juvenile to adult transition	-
ARF4	RD	Juvenile to adult transition	-
ARF5	AD	Wurzelbildung im Embryo	AUX/IAA12 und 13
ARF6	AD	Blütenentwicklung	AUX/IAA3 und 4
ARF7/NPH4	AD	Tropismen	AUX/IAA3, 14 (SHY2), AUX/IAA18 und 19
ARF8	AD	Blütenentwicklung	AUX/IAA3 und 4
ARF9	RD		-
ARF10	RD	Keimung	-
ARF11	RD		-
ARF12	RD		-
ARF13	RD (ohne CTD)		-
ARF14	RD		-
ARF15	RD		-
ARF16	RD	Wie ARF10?	-
ARF17	RD (ohne CTD)	Wie ARF10?	-
ARF18	RD		-
ARF19	AD	Seitenwurzelbildung	AUX/IAA 14 und 18
ARF20	RD		-
ARF21	RD		-
ARF22	RD		-

Tab. 1.2: Liste der ARF – AUX/IAA – Paare.

1.4.3 TIR1 – ein Auxinrezeptor zur Steuerung der auxininduzierten Genexpression

Die AUX/IAA-Proteine können Aktivator-ARFs blockieren. Der entscheidende Schritt, an dem das Phytohormon Auxin nun ins Spiel kommt, wird durch den Auxinrezeptor TIR1 geregelt. Seine Rezeptorrolle wurde erst 2005 durch zwei Arbeitsgruppen unabhängig voneinander aufgeklärt (Dharmasiri *et al.* 2005a, Kepinsky und Leyser 2005). Es stellt die zentrale Schaltstelle dar, die die Expression aller auxininduzierten Gene lenkt. Seine Funktion erfüllt TIR1, indem es in Abhängigkeit von der Auxinkonzentration den **Abbau** der AUX/IAA-Repressoren initiiert und damit die Genexpression auxininduzierter Gene startet.

TIR1 ist ein lösliches 17kDa-Protein, das Teil des sog. SCF^{TIR1}-Proteinkomplexes ist. Der Name dieses Komplexes beruht auf den Abkürzungen von SKP1, Cullin und F-Box, den drei Hauptbestandteilen dieses Komplexes.

TIR1 ist eines von über 700 allein im Pflanzenreich existierenden F-Box-Proteinen. Dabei ist die

namensgebende F-Box ein Motiv, mit dem TIR1 an Skp1, d.h. an den SCF-Komplex binden kann. Der übrige Teil von TIR1 dient zur Bindung seiner Liganden: eines Auxinmoleküls und eines AUX/IAA-Repressors. Dabei fungiert das Auxinmolekül als molekularer Kleber, um die Bindung des Repressors an TIR1 zu stabilisieren (Tan *et al.* 2007).

In Abbildung 1.3 ist TIR1 und seine Verknüpfung über das F-Box-Motiv mit SKP1 sowie die Bindung eines AUX/IAA-Peptids dargestellt.

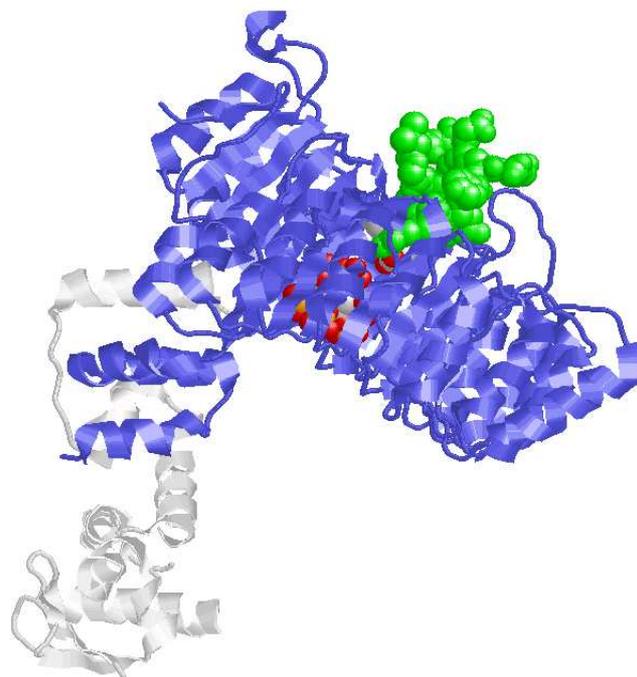


Abb. 1.3: 3D-Struktur von TIR1 (blau), gebunden an ASK1 (grau). In grün als Kugelmodell ist das an TIR1 gebundene AUX/IAA-Peptid dargestellt. Die Abbildung wurde mit Chime erstellt.

1.4.3.1 Der SCF^{TIR1}-Komplex: weitere beteiligte Proteine

Der SCF^{TIR1}-Komplex ist Teil eines Systems zur Steuerung der auxininduzierten Genexpression. Als Teil einer Degradationsmaschinerie vermittelt hierbei der Auxinrezeptor TIR1 die Ubiquitinierung und damit den Abbau der AUX/IAA-Proteine. Durch multiple Ubiquitinierung über den SCF^{TIR1}-Komplex werden die AUX/IAA- Repressoren für den Abbau durch das 26S-Proteasom markiert.

ASK1 (oder SKP1) ist ein Adapterprotein zwischen TIR1 und CUL1. CUL1 ist das Trägerprotein, an das die den SCF-Komplex bildenden Proteine andocken. Das Molekül kann N-terminal ASK1 binden, und C-terminal RBX. Diese beiden Bindungsstellen ermöglichen die Zusammenführung des zu ubiquitinierenden AUX/IAA-Repressors und des „Ubiquitinlieferanten“ E2. RBX dient hierbei der Rekrutierung von E2-Ub (Ub, Ubiquitin). Es stabilisiert die Bindung von E2 am SCF^{TIR1}-Komplex.

Ein weiteres Protein, RUB, bindet ebenfalls an den SCF^{TIR1}-Komplex und reguliert die Aktivität desselben. In Tabelle 1.2 sind alle am SCF^{TIR1}-Komplex beteiligten Proteine aufgelistet.

Name (Abkürzung)	Herkunft des Namens	Funktion
TIR1	Transport Inhibitor Response	Auxinrezeptor, Repressorbindung, Bindung an SKP1
SKP1 / ASK1	S -Phase K inase associated P rotein / Arabidopsis S -Phase K inase related Protein	Adapterprotein TIR1-CUL1
CUL1	Cullin	Gerüstprotein
RBX1	Ring Box	Rekrutierung von E2
E2	Enzyme 2	Ubiquitintransportprotein
RUB / Nedd8	Related to Ubiquitin	Aktivitätsmodulation
COP9	Constitutive Photomorphogenesis 9	Abspaltung RUB von CUL1
AXR1	Auxin Resistant 1	Bindung von RUB an CUL1
AUX/IAA	Auxin/indole-3-acetic-acid	Zu ubiquitinierendes Repressorprotein
CAND1	Cullin Associated and Neddylation Dissociated	Nötig für die Dissoziation des Komplexes

Tab. 1.2: Am SCF^{TIR1}-Komplex beteiligte Proteine und ihre Funktion.

Abbildung 1.4 zeigt ein Modell des vollständigen SCF^{TIR1}-Komplexes, dessen dreidimensionale Struktur 2007 aufgeklärt wurde (Tan *et al.* 2007).

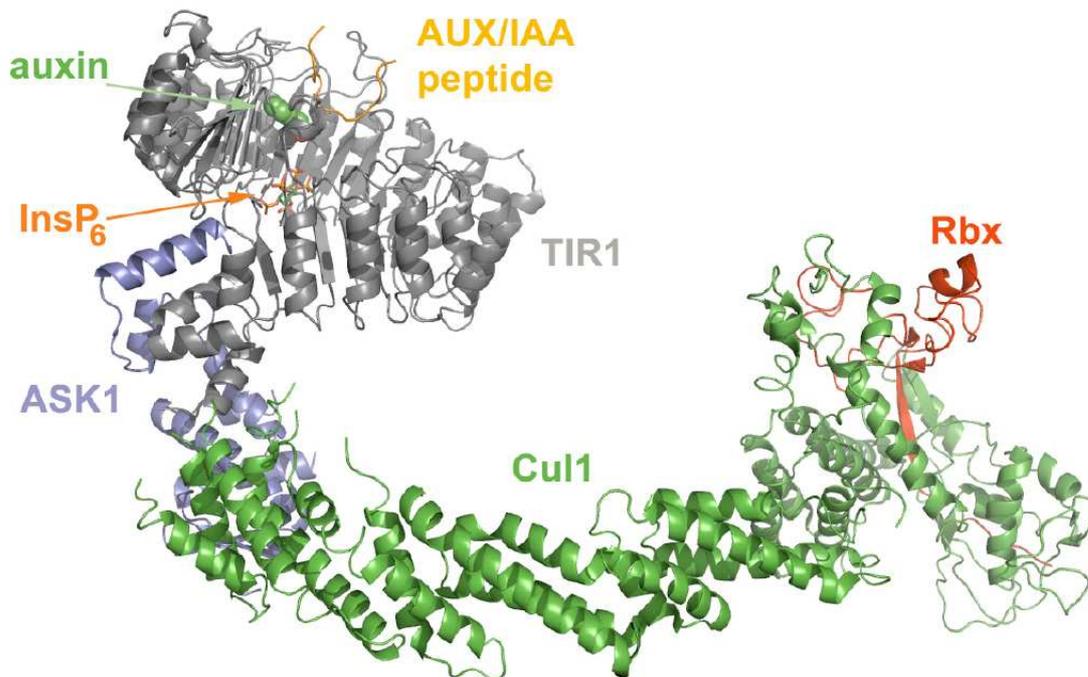


Abb. 1.4: Der SCF^{TIR1}-Komplex. Aus Tan *et al.* 2007.

1.4.3.2 Enzymatische Vorgänge im SCF^{TIR1}-Komplex

Der Abbau von AUX/IAA-Repressoren wird über die Aktivierung von Ubiquitinmolekülen durch das Enzym E1 und den Transport dieser Ubiquitine mittels Enzym E2 zum SCF^{TIR1}-Komplex, der auch als „Enzym E3“ bezeichnet wird, eingeleitet. Die Bindung von E2-Ubiquitin an die SCF^{TIR1}-Ligase wird durch zusätzliche Enzyme reguliert.

Die Polyubiquitinierung der AUX/IAA-Proteine markiert diese für den Abbau durch das 26S-Proteasom. Die ebenfalls hochkomplexe Degradationsmaschinerie liegt im Zellkern wie auch im Cytosol vor, was einen Transport von markierten Repressoren erspart. Dadurch ist die Zelle in der Lage, sehr schnell seine Genexpression bei sich ändernden Auxinkonzentrationen anzupassen. Im Anhang ist die Ubiquitinierung durch den SCF^{TIR1}-Komplex grafisch dargestellt (Anhang A)

1.4.4 Physiologie von TIR1 in *Arabidopsis thaliana*

Wird TIR1 ausgeschaltet, kommt es in der Pflanze teilweise zu Störungen im pflanzlichen Wachstum. Rügger *et al.* zeigten 1997, dass in *A. thaliana* das Wurzelwachstum durch die

natürliche *tir1*-Mutante gestört ist. Während Wildtyppflanzen auf Zugabe eines Auxintransportinhibitors (NPA) und dem damit verbundenen Anstieg der Hormonkonzentration in der Wurzel mit einer Inhibition des Streckungswachstums reagieren, wächst die *tir1*-Wurzel fast mit normaler Rate weiter.

Auch die Anzahl der Seitenwurzeln ist in der *tir1*-Mutante verändert. IAA oder ein Auxintransportinhibitor führt in der Wurzel des Wildtyps zu erhöhten Auxinleveln und damit zu verstärkter Seitenwurzelbildung. Die *tir1*-Mutante kann nicht die Menge an Seitenwurzeln bilden (etwa nur ein Sechstel des Wildtyps), da offensichtlich die Auxinsignaltransduktion über TIR1 unterbrochen ist.

1.4.5 Weitere Auxinrezeptoren im Kern: die AFBs

Es wurde eine Reihe von TIR1- Homologen identifiziert. Es sind dies AFB1, AFB2, AFB3, AFB4 und AFB5 (Dharmasiri *et al.* 2005b). Die Abkürzung AFB steht für Auxin F-Box. Es handelt sich also um weitere F-Box-Proteine.

Nachweislich bilden AFB1 und 3 zusammen mit ASK1 und CUL1 einen SCF-Komplex. Bei AFB2 kann man nur davon ausgehen, da sich dieses Protein bisher nicht als Epitop-markierte Version exprimieren ließ, so dass keine Interaktion mit ASK1 gezeigt werden konnte. AFB1, 2 und 3 interagieren allesamt mit AUX/IAA Repressoren. Die Sequenzanalyse ergab, dass TIR1 mit AFB1 eine 70%ige und mit AFB 2 und 3 eine 60%ige Aminosäureübereinstimmung aufweist.

Zwischen den Proteinen konnten Unterschiede in der Stärke ihrer Expressionsmuster festgestellt werden. Während TIR1 und AFB1 nicht so stark exprimiert werden, kommt es im Falle von AFB2 und AFB3 zu viel höheren Proteinleveln. Dies wurde mit GUS-Färbungen wie auch mit Reverse-Transkription-PCR gezeigt (Dharmasiri *et al.* 2005b).

1.4.6 Physiologische Auswirkungen von Einfach- und Mehrfachknockouts der Kernrezeptoren

Nach Dharmasiri *et al.* handelt es sich bei den AFBs auch um Auxinrezeptoren. Von ihnen erzeugte Mutanten in *A. thaliana*, in denen Transkripte der mRNA dieser Proteine nicht mehr nachweisbar waren, zeigten teilweise eine Resistenz gegen Auxin, und zwar gegen 2,4-D, ein synthetisches Pflanzenhormon. Es zeigte sich, dass der Knockout der einzelnen AFBs verschieden starke Effekte auf die für Auxine typische Inhibition von Wurzelwachstum hat. Während das Wurzelwachstum der Mutante *afb1* sich wie das des Wildtyps Col 0 durch 2,4-D fast vollständig inhibieren ließ, erreichten die Wurzeln der Mutanten *afb2*, *afb3* und *tir1* noch

etwa die Hälfte der Länge der unbehandelten Kontrollwurzeln. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, das, zumindest AFB1 eine andere Funktion als die anderen Auxinrezeptoren erfüllt.

Es wurden auch Mehrfachmutanten der auxinbindenden F-Box-Proteine erzeugt. Dazu gehören Doppel-, Dreifach- und Vierfachmutanten. Es handelt sich hier wie bei den Einzelmutanten um T-DNA-Insertionsmutanten. Diese Mutanten sind besonders interessant für die Auxinforschung, weil durch sie eine mögliche Redundanz des F-Box-Rezeptorsystems gezeigt bzw. widerlegt werden kann. In der „Tripelmutante“ wurden die Gene *TIR1*, *AFB2* und *AFB3* ausgeschaltet, während in der „Quadrupelmutante“ die Gene *TIR1*, *AFB1*, *AFB2* und *AFB3* ausgeschaltet wurden. Dharmasiri *et al.* (2005) zeigten, dass mit dem Grad der Mutation auch der Grad der Resistenz gegen 2,4-D im Wurzelwachstumstest zunimmt. Während bei einigen Einzelmutanten 0,085 μM 2,4-D zur vollständigen oder teilweisen Inhibition des Wurzelwachstums ausreichen, sind für eine 50%ige Reduktion des Wurzelwachstums in der Tripelmutante etwa 2 μM 2,4-D nötig, bei der Quadrupelmutante sogar 5 μM 2,4-D, also eine etwa 100fach höhere Dosis als für den Wildtyp. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass die homologen F-Box-Proteine als redundantes System agieren, und dass sich die Effekte der Knockouts der einzelnen Gene bei der Auxinsensitivität im Wurzelwachstum aufaddieren.

Insgesamt muss man aus den Ergebnissen von Dharmasiri *et al.* schließen, dass die vier bis jetzt untersuchten nukleären Auxinrezeptoren ein redundantes System darstellen.

1.4.7 F-Box-Auxinrezeptoren und Streckungswachstum

TIR1 und die AFBs sind Auxinrezeptoren. Sie könnten das schnelle Streckungswachstum über die von ihnen gesteuerte Genexpression direkt auslösen. Dies ist allerdings nicht sicher, da möglicherweise nur die Rahmenbedingungen, nicht aber das Auslösen des schnellen Streckungswachstums über TIR1 vermittelt wird. Die Verifizierung oder Falsifizierung dieser These ist ein Teil dieser Arbeit. In Abschnitt 1.6 wird auf diesen Zusammenhang genauer eingegangen.

Es gibt noch einen weiteren Auxinrezeptor, der ebenfalls für die Vermittlung der Primärantwort verantwortlich sein könnte: ABP1.

1.5 Das Auxin-Bindeprotein 1

ABP1 ist ein unverzichtbares Protein für die Entwicklung höherer Pflanzen. Der Knockout dieses Proteins in *A. thaliana* erwies sich als embryolethal (Chen 2001). Es handelt sich wie bei TIR1 um einen Auxinrezeptor. Seine völlig andere Lokalisation, Struktur und Funktion wird im Folgenden näher erläutert.

1.5.1 Identifikation als Auxinrezeptor

Relativ lange vor der Entdeckung von TIR als nukleärer Auxinrezeptor wurde ABP1 entdeckt. Zunächst wurde in fraktionierten Homogenaten von Maiskoleptilen die spezifische Bindung von IAA und 1-NAA an Membranfraktionen nachgewiesen (Hertel *et al.* 1972). Die Auxinbindung wurde vornehmlich in ER-Membranen lokalisiert. Später konnte die Lokalisierung der Auxinbindung verbessert werden. Dohrmann *et al.* zeigten 1978, dass im ER und an der Plasmamembran 1-NAA spezifisch gebunden wird, wohingegen in der Tonoplastenmembran eine unspezifische Auxinbindung erfolgt.

1985 wurde ABP1 zum ersten Mal als auxinbindendes Protein aufgereinigt (Löbler und Klämbt 1985a). Löbler und Klämbt stellten weiterhin fest, dass ABP1 IAA, 1-NAA und 2,4-D mit ähnlichen K_D -Werten wie die bereits von anderen Gruppen untersuchten ER-Membranen banden (Batt *et al.* 1976, Ray *et al.* 1977, Cross und Briggs 1978, Murphy 1980). ABP1 wurde also zuerst aus ER-Membranen aufgereinigt.

Noch waren aber viele Fragen zur Lokalisation von ABP1 offen. Ob es nur im ER oder auch an der Plasmamembran lokalisiert ist, und in welchem Kompartiment es seine Funktion erfüllt, war nicht klar.

1.5.2 Experimente zur Klärung der Lokalisation von ABP1

1.5.2.1 ABP1 verfügt über ein ER-Retentionssignal

ABP1 verfügt C-terminal über die vier Aminosäuren Lysin (K), Asparaginsäure (D), Glutaminsäure (E) und Leucin (L), die das KDEL-Motiv darstellen. Hierbei handelt es sich um ein ER-Retentionssignal (Munro und Pelham 1987). Es sorgt dafür, dass dieses Protein im ER gehalten wird und nicht sekretiert wird. Verantwortlich hierfür ist ein KDEL-bindendes integrales Membranprotein im *cis*-Golgi, ERD2 (Lewis *et al.* 1990). Prinzipiell werden mit dem KDEL-Motiv versehene Proteine nach Erreichen des *cis*-Golgi wieder zurück ins ER transportiert. Tatsächlich sind etwa 98% aller ABP1-Kopien im ER lokalisiert. Die übrigen 2 Prozent könnten nach Henderson *et al.* (1997) an der Außenseite der Plasmamembran gebunden sein, da nach Hendersons Analyse der Glykanstruktur von ABP1 1,3 % der ABP1-

Moleküle eine komplexe Glykosylierung im Golgi erfahren haben, die für eine Sekretion dieser Proteine spricht. Die Glykosylierung der im ER befindlichen ABP1-Moleküle setzt sich aus 2 N-Acetylglucosaminresten und vier Mannoseresten zusammen.

1.5.2.2 ABP1 bindet markierte Antikörper an der Plasmamembran

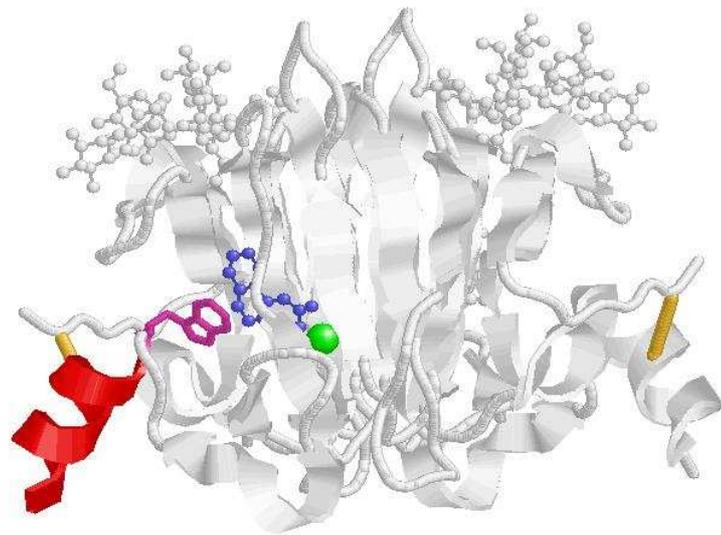
Diekmann *et al.* konnten 1994 mit Antikörpern gegen ABP1 das Protein sichtbar machen. Mit Hilfe der SEIG-EPOM-Methode (Silver enhanced immunogold as viewed by epipolarization microscopy) wurden ABP1-Moleküle auf der Oberfläche der Plasmamembran von aus Maiskoleoptilen gewonnenen Protoplasten visualisiert. Hierfür wurden die primären Antikörper nach Bindung an ABP1 von goldkonjugierten sekundären Antikörpern gebunden und die Goldpartikel wiederum durch die Verwendung eines silberlactathaltigen Entwicklers mit einer Schicht metallischen Silbers umgeben. Bei Verwendung von polarisiertem Licht konnten so einzelne ABP1-Kopien auf der Oberfläche der Protoplasten als leuchtend weiße Punkte sichtbar gemacht werden.

Anhand dieser Daten ging man davon aus, dass ABP1 zwar größtenteils im ER vorlag, aber möglicherweise seine Funktion an der Plasmamembran erfüllt. Strukturanalysen sollten nun Hinweise zur Funktion von ABP1 liefern.

1.5.3 Struktur und Auxinbindemechanismus

Wie TIR1 wurde ABP1 röntgenkristallographisch untersucht, seine Struktur wurde mit einer Auflösung von 1,9 Angström aufgeklärt (Woo *et al.* 2002). ABP1 ist ein lösliches 22kD-Protein, welches nativ als 44kD-Dimer vorliegt. Es handelt sich um ein fast ausschließlich aus β -Faltblättern bestehendes Protein, wobei die Anordnung dieser Strukturen dem β -Jellyroll-Barrel-Motiv entspricht. Im Zentrum eines Monomers sitzt ein Zinkatom, 5fach koordiniert durch die drei Histidine 57, 59 und 106, den Glutamatrest 63 und ein Wassermolekül. Dieses Wassermolekül wird im Falle der Auxinbindung durch ein Auxinmolekül ersetzt. In der Nähe des Zinkatoms sitzt ein Loop, der in die einzige Alpha-Helix des Monomers übergeht. Sie bildet den C-Terminus des Proteins, und ist über eine Disulfidbrücke mit dem N-Terminus, ebenfalls ein Loop, verbunden (Abb. 1.5).

Abb. 1.5: 3D-Struktur des ABP1-Dimers. Im linken Monomer wurde die C-terminale Alpha-Helix rot, der Tryptophan151-Rest violett, ein Auxinmolekül blau, das Zinkatom grün und die Disulfidbrücken gelb eingefärbt. Die Abbildung wurde mit Chime erstellt.



1.5.3.1 Die Auxinbindung

Löbler und Klämbt (1985), Shimomura *et al.* (1986) sowie Tian *et al.* (1995) zeigten die Bindung von 1-NAA an ABP1 in Abhängigkeit vom pH-Wert auf. Das Optimum für die Bindung liegt bei pH 5 (Shimomura *et al.* sowie Tian *et al.*) bzw. 5,5 (Löbler und Klämbt). Alle Forschergruppen zeigten, dass ABP1 andererseits bei pH 7 kein Auxin mehr bindet. Außerhalb der Zelle liegt der pH-Wert im Optimum für eine Auxinbindung durch ABP1. Der pH-Wert im ER ist nur schwer und indirekt zu bestimmen. In tierischen Zellen konnte er mit pH-sensitiven Fluoreszenzfarbstoffen auf 7,2 bestimmt werden, im Golgi liegt er bei 6,5 (Kim *et al.* 1998). Zumindest im ER bindet ABP1 wohl kein Auxin. Im Golgi könnte es aber tatsächlich zur Auxinbindung kommen, denn hier liegt die K_D immer noch bei 25-30% des Optimums (Löbler und Klämbt 1985, Shimomura *et al.* 1986).

1.5.3.2 Die Bedeutung der C-terminalen Helix von ABP1 bei der Auxinbindung

Die C-terminale Helix könnte neben der Retention im ER auch eine weitere Funktion haben, nämlich die Weitergabe des Auxinsignals.

Da die Helix sehr beweglich an zwei Loops gebunden ist, könnte sie eine Bewegung hin- oder vom Zinkatom weg erfahren, während der aus β -Faltblättern bestehende übrige Teil aufgrund seiner Rigidität wohl unbeweglich bleibt. Eine wichtige Rolle für die Bewegung der Helix spielt der Tryptophanrest 151 (Trp 151), der sich in direkter Nachbarschaft zum Zinkatom und dem hieran gebundenen Auxinmolekül befindet. Es ist davon auszugehen, dass dieser Rest mit einem von ABP gebundenen Auxinmolekül interagiert und sich damit die Position der Helix verändert.

Leider konnte in den röntgenkristallographischen Untersuchungen von Woo *et al.* (2001) diese Konformationsänderung nicht gezeigt werden.

Mittlerweile sind bioinformatische Simulationen mit den röntgenkristallographischen Daten durchgeführt worden (Bertosa *et al.* 2008). Hierbei konnte die mögliche Konformationsänderung von ABP1 gezeigt werden. Tatsächlich erfährt die C-terminale α -Helix von ABP1 in der Simulation die auch schon von Woo *et al.* vermutete Bewegung: nach Bindung eines Auxinmoleküls wird der C-Terminus an das Auxinmolekül herangezogen und durch eine Edge-to-face-Interaktion des Trp151 mit dem Auxinmolekül stabilisiert. Die C-terminale Helix wird nach der Bindung eines Auxinmoleküls von einer exponierten Lage in eine dicht an das Protein herangezogene Lage verschoben. Diese Verlagerung könnte eine entscheidende Bedeutung für die Retention von ABP1 im ER haben, die dann möglicherweise durch Auxinbindung gestört wird.

1.5.4 Physiologie von ABP1 in Protoplasten

Die Experimente zur Lokalisation, Struktur und zum Auxinbindemechanismus haben viele Hinweise zur Funktion von ABP1 geliefert. Zur weiteren Aufklärung wurden viele Experimente mit Protoplasten durchgeführt. Protoplasten zeichnen sich durch eine gut zugängliche Plasmamembran aus, so dass dort lokalisiertes ABP1 durch verschiedene Effektoren gut erreichbar ist.

1.5.4.1 ABP1 reguliert einen Protonenfluss an der Plasmamembran

Von Rück *et al.* wurde 1993 in Patch-Clamp-Experimenten mit Maisprotoplasten gezeigt, dass sofort nach der Zugabe von 0,1 μM IAA oder 1-NAA ein Fluss von positiven Ladungen aus der Zelle heraus stattfindet. Diese Reaktion findet nur bei Anwesenheit von Magnesiumionen und ATP statt, was auf die Aktivität der plasmamembranständigen H^+ -ATPase zurückzuführen ist. Der gleiche Effekt trat bei Behandlung mit bestimmten ABP1-Antikörpern auf, die ja nur außerhalb der Zelle ABP1 binden können. Diese fördernden Antikörper (D16-Antikörper) wurden gegen eine als Box A bezeichnete Sequenz des Proteins hergestellt und führen möglicherweise zu der gleichen Konformationsänderung von ABP1, die bei Bindung von Auxin eintritt (Venis *et al.* 1992). Polyklonale Anti-ABP1-Antikörper, die gegen das gesamte Protein gerichtet sind, führten hingegen zum Block des Proteins, so dass auch Auxin keinen Protonenfluss mehr auslösen konnte (Abb. 1.6)

1.5.4.2 Protoplasten schwellen nach Behandlung mit ABP1-Antikörpern genauso wie nach Behandlung mit Auxinen an

Appliziert man IAA auf Mais-, Tomaten-, oder *A.-thaliana*-Protoplasten, reagieren diese mit einer Volumenvergrößerung (Steffens *et al.* 2001, Christian *et al.* 2003). Der gleiche Effekt lässt sich mit Antikörpern auslösen: in weiteren Experimenten mit gegen ABP1 gerichteten fördernden D16-Antikörpern konnte ich bei Tomatenprotoplasten eine Nettovolumenvergrößerung auslösen (Christian *et al.* 2003). Diese Protoplastenschwellung ist ebenfalls auf eine Signaltransduktion zurückzuführen, die an der Außenseite der Plasmamembran ausgelöst wird. Hierbei ist davon auszugehen, dass die Protoplasten durch Kaliumaufnahme ihre Konzentration von osmotisch aktiven Teilchen erhöhen, was eine osmotisch bedingte Wasseraufnahme und damit eine Volumenvergrößerung mit sich bringt (Abb. 1.6).

1.5.4.3 Das Membranpotential von Protoplasten hyperpolarisiert nach Auxinzugabe oder Zugabe fördernder Antikörper

Barbier-Brygoo *et al.* konnten 1989 in elektrophysiologischen Versuchen mit Maisprotoplasten eine Veränderung des Membranpotentials messen. Hierzu muss allerdings gesagt werden, dass die absolut gemessenen Werte des Membranpotentials im Widerspruch zum normalen Membranpotential einer Zelle stehen: Das Ruhemembranpotential der untersuchten Tabakprotoplasten lag nach Barbier-Brygoo *et al.* nicht bei den zu erwartenden -100mV, sondern bei etwa -5 mV. Diese viel weniger negativen Werte sind auf das verwendete Pflanzenmaterial zurückzuführen: durch den Verdau der Zellwand verändern sich offensichtlich die elektrischen Eigenschaften der Plasmamembran, so dass bei Verwendung der Mikroelektrode das wahre Membranpotential verfälscht wird (van Duijn und Heimovaara-Dijkstra 1993).

Nichtsdestotrotz konnten die auxininduzierten Änderungen des Membranpotentials mit dieser Methode reproduzierbar dokumentiert werden. Die Zugabe von 2 μ M 1-NAA zu den untersuchten Tabakprotoplasten führte zu einer Hyperpolarisierung des Membranpotentials von -8,5 auf -12,5 mV. Bei Behandlung der Zellen mit D16-Antikörpern stellte sich ebenfalls eine Hyperpolarisierung um 4 mV ein. Genauso wie bei Rück *et al.* konnte die Vorinkubation der Protoplasten mit polyklonalen Anti-ABP1-Antikörpern die durch IAA induzierte Reaktion der Protoplasten inhibieren (hier eine Hyperpolarisation), da auch hier von einem Block von ABP1 auszugehen ist (Abb. 1.6)

1.5.4.4 Die Funktion der C-terminalen Helix in der Signaltransduktion

Eine Reihe von Experimenten wurden mit synthetischen Peptiden, die der Sequenz der C-terminalen Helix von ABP1 entsprechen, durchgeführt.

Blatt und Thiel zeigten 1994, dass Peptide mit der Aminosäuresequenz des C-terminalen Peptids von ABP1 aus Mais eine kurzfristige Alkalisierung des Cytosols von *Vicia-faba*-Schließzellen um 0,4 pH-Einheiten auslösen kann, wo Peptide mit anderen Aminosäurezusammensetzungen keinerlei Effekt zeigten.

Auch die mit D16-Antikörpern gezeigte Schwellreaktion von Maisprotoplasten konnte mit dem C-terminalen Peptid von ABP1 aus Mais ausgelöst werden (Steffens *et al.* 2001). In meiner Diplomarbeit konnte ich den gleichen Effekt mit dem C-terminalen Peptid von ABP1 aus Tomate bei Tomatenprotoplasten auslösen. (Abb. 1.6)

Diese Ergebnisse sprechen alle für eine direkte Involvierung der C-terminalen Helix von ABP1 in seine Signaltransduktion. Sie ist daher Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

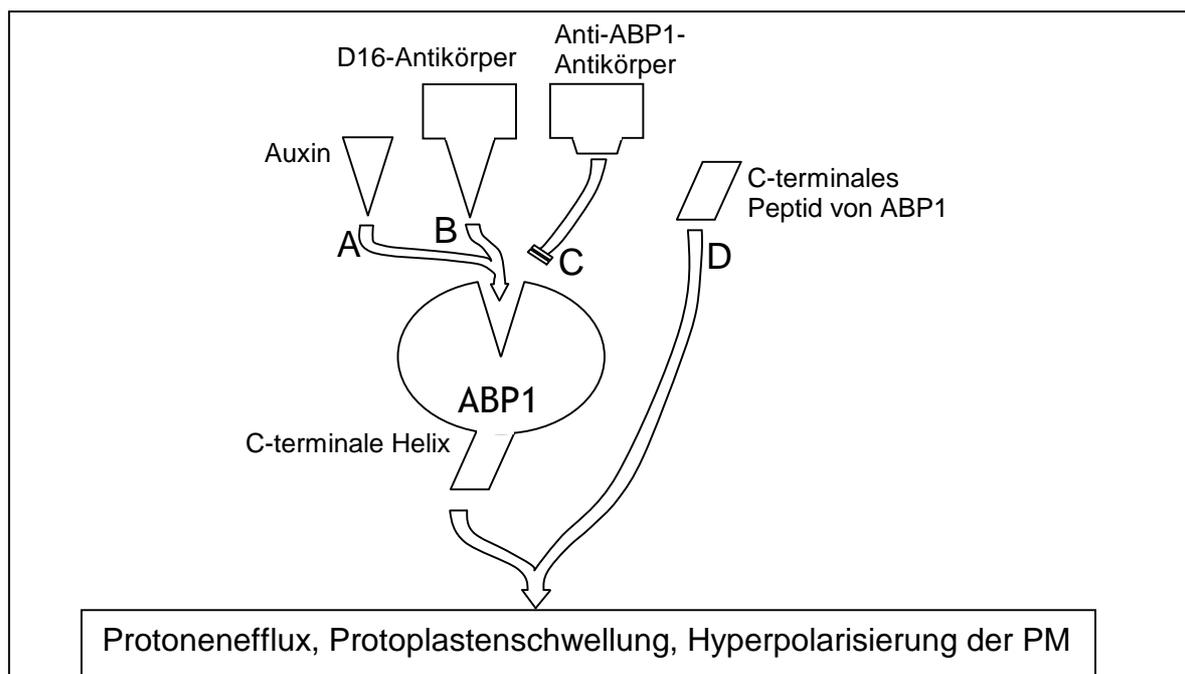


Abb. 1.6: Schematische Darstellung der Bindung verschiedener Effektoren an ABP1. Auxine führen nach Applizierung auf Protoplasten zur Aktivierung von ABP1 und seiner Signalübertragungsdomäne (C-terminale Helix). Es kommt zu Protonenfluss, Protoplastenschwellung sowie zur Membranhyperpolarisierung (A). Der gleiche Effekt wird bei Applizierung des D16-Antikörpers induziert, weil dieser vermutlich die gleiche Konformationsänderung wie IAA bei ABP1 auslöst (B). Der polyklonale Anti-ABP1-Antikörper führt nicht zur Konformationsänderung von ABP1, sondern blockiert ABP1. Hier kann dann IAA auch nicht mehr einen fördernden Effekt auslösen (C). Das C-terminale Peptid bindet nicht an ABP1, sondern induziert direkt die gleichen Reaktionen wie durch IAA oder D16-Antikörper aktiviertes ABP1.

1.5.5 Die mögliche Signaltransduktion von ABP1

Aus den Experimenten zur Lokalisation und zur Physiologie von ABP1 wurde erstmals 1990 von Klämbt die Dockingproteinhypothese vorgeschlagen. Aufgrund der Tatsache, dass ABP1 auch an der Außenseite der Plasmamembran lokalisiert ist und nur extrazellulär wirkende ABP1-spezifische Effektoren auxinartige Effekte in Protoplasten hervorriefen, geht die Dockingproteinhypothese von einem Membranprotein aus, das ABP1 bindet und ein Signal in die Zelle überträgt. Da ABP1 keine membrandurchspannenden Domänen aufweist, könnte die C-terminale Helix von ABP1 für das Andocken an ein integrales Membranprotein (Dockingprotein) wichtig sein. Die Experimente mit Peptiden der C-terminalen Sequenz, welche auxinartige Effekte in Protoplasten induzieren konnten, unterstützen diese These. Da das Signalling von ABP1 ist nach wie vor nicht geklärt ist und bleibt daher weiter Gegenstand der Experimente.

1.6 Was ist der Auxinrezeptor für das schnelle auxininduzierte Wachstum?

Die beiden hier vorgestellten Auxinrezeptoren TIR1 und ABP1 könnten beide die klassische Primärantwort auf Auxin vermitteln.

1.6.1 Vermitteln TIR1/AFB das schnelle Streckungswachstum?

Alle hier untersuchten F-Box-Proteine sind Auxinrezeptoren und agieren gemeinsam als redundantes System zur Steuerung der auxininduzierten Genexpression.

Die von Dharmasiri *et al.* durchgeführten Experimente zur Inhibition des Wurzelwachstums erfassen aber leider keine schnellen Reaktionen, da die Änderungen der Wurzellänge erst nach 5 Tagen Versuchsdauer ausgemessen wurden. Sie zeigen, dass das Fehlen der F-Box-Proteine sich negativ auf die Fähigkeit der Pflanze, auf exogen appliziertes Auxin zu reagieren, auswirkt. Allerdings ist hierbei unklar, auf welche Ebene diese beschränkenden Einflüsse der fehlenden nukleären Auxinrezeptoren sich auswirken. Ob die eingeschränkte auxininduzierte Genexpression direkt verantwortlich für das Streckungswachstum bzw. die Reduktion des Wurzelwachstums der Pflanze ist, ist nicht klar. Möglicherweise stellen die AFBs und TIR1 lediglich die Proteinmaschinerie, die prinzipiell für die Streckung einer Zelle vonnöten ist, zur Verfügung, aktivieren diese aber nicht direkt. In diesem Fall würde ein anderer Auxinrezeptor Auxin binden und durch eine Signalkaskade die durch TIR1 und seine Homologe bereitgestellten Proteine aktivieren und damit die Primärantwort auslösen. Andererseits könnte schon die Aktivierung der Genexpression über die im Kern lokalisierten Auxinrezeptoren auch gleich eine Streckung der Zelle initiieren.

Es gibt bis heute keine Untersuchungen zur **schnellen** Wachstumsantwort von *Arabidopsis*-Hypokotylen oder *Arabidopsis*-Wurzeln. Alle das Längenwachstum betreffenden Experimente wurden in Versuchen durchgeführt, in denen die Inkubation der Pflanze mit einem Auxin und seine Vermessung mehrere Tage auseinander lagen. Es bleibt somit schwierig, die Längenänderungen auf eine bestimmte Signalkaskade zurückzuführen, denn eine Auxinbehandlung aktiviert sehr viele Gene und führt zu einer schwer überschaubaren Kette von Signalkaskaden, die möglicherweise verschiedene Einflüsse auf das längerfristige Streckungswachstum haben. Da die Primärantwort aber bereits nach wenigen Minuten eintritt, können langfristige Messungen die Bewertung von TIR1/AFB und ihre Bedeutung für die Primärantwort verzerren. Sicher ist nur, dass das Ausschalten der Kernrezeptoren die Pflanze in ihrer Entwicklung stark einschränkt.

Interessanterweise liegen bis heute nur Ergebnisse der Auswirkungen von Knockouts nukleärer Auxinrezeptoren mit dem synthetischen Hormon 2,4-D, nicht aber IAA vor. Es wurde zwar auch die *tir1*-Mutante auf ihre Reaktion zu IAA untersucht (Rügger *et al.* 1997, erste Veröffentlichung über TIR1), aber die verschiedenen AFB-Einzel- und Mehrfachmutanten wurden nur auf ihre Sensitivität auf 2,4-D getestet. Dabei fällt nach Rügger *et al.* auf, dass die Resistenz gegen 2,4-D bei *tir1* viel stärker als die Resistenz gegen IAA ausgeprägt ist, was das Wurzelwachstum über 5 Tage betrifft. Bei IAA-Behandlung zeigt *tir1* hier nur eine leicht abgeschwächte Antwort gegenüber dem Wildtyp. *Tir1* ist also primär resistent gegen 2,4-D.

1.6.2 ABP1 und das schnelle Streckungswachstum?

Aus den Versuchen zur Lokalisation und des Wirkortes von ABP1 lässt sich schlussfolgern, dass ABP1 vermutlich durch eine sehr schnelle Signaltransduktion, die sofort nach Effektorapplikation (Auxin, Anti-ABP1-Antikörper, C-terminales Peptid) einsetzt, eine Reaktion der Zelle an der Plasmamembran auslöst. Da ABP1 keine Transmembrandomänen besitzt, muss es entweder direkt Membranproteine aktivieren, zum Beispiel die plasmamembranständige H⁺-ATPase, oder an Membranproteine binden, die ihrerseits ein Signal schnell weiterleiten.

Die Schwellreaktion von Protoplasten deutet hierbei darauf hin, dass möglicherweise das schnelle auxininduzierte Streckungswachstum durch ABP1 vermittelt wird. Die Schwellreaktion ist zwar nicht mit Wachstum gleichzusetzen, weil der Wachstumsprozess mit einer Lockerung der Zellwand verbunden ist und Protoplasten auch keinen hohen Turgordruck aufbauen können, aber die physiologischen Effekte wie

Membranhyperpolarisation, Aktivität der Protonenpumpe, Kaliuminflux und Volumenvergrößerung sind in beiden Systemen vorhanden. An der Tomatenmutante *diageotropica* (*dgt*) ließ sich erkennen, dass der hier vorliegende Defekt in der ABP1-vermittelten Protoplastenschwellung auch Auswirkungen auf das auxininduzierte schnelle Streckungswachstum hat. Hier war ein erster Hinweis auf die Bedeutung von ABP1 für das Längenwachstum von Pflanzen gefunden (Christian *et al.* 2003). Eine direkte Verbindung zwischen ABP1 und dem schnellen Streckungswachstum muss aber noch bewiesen werden.

1.7 Zielsetzung

In dieser Dissertation soll die Auxinsignaltransduktion, die das schnelle Streckungswachstum höherer Pflanzen vermittelt, untersucht werden und die Funktion der beiden Auxinrezeptoren TIR1/AFB sowie ABP1 charakterisiert werden.

Teil 1: TIR1

Im Falle von TIR1 ist die Signaltransduktion des Proteins bekannt, aber nicht geklärt, ob die durch TIR1 gesteuerte Genexpression auch das schnelle Streckungswachstum direkt aktiviert. Die grundlegende Frage, ob dieses Wachstum auf Genexpression oder der Aktivierung schon vorhandener Proteine beruht, soll hier beantwortet werden.

1. In zeitlich hochauflösenden Messungen soll das schnelle auxininduzierte Streckungswachstum von *A.-thaliana*-Hypokotylen dokumentiert werden. Dazu werden die F-Box-Einzelmutanten *tir1*, *afb1*, *afb2* und *afb3* sowie die Mehrfachmutanten *tir1 afb2 afb3* und *tir1 afb1 afb2 afb3* verwendet. Durch die Verwendung verschiedener Auxine sowie des Pilzgiftes Fusicoccin sollen Rückschlüsse auf die Auxinsignaltransduktion sowie den Auxintransport gezogen werden.
2. Mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie soll die auxininduzierte Genexpression visualisiert und direkt mit dem Streckungswachstum verglichen werden. Hierfür werden *A.-thaliana*-Keimlinge, die das auxingesteuerten Reporter gen *DR5rev::GFP* (Ulmasov *et al.* 1997a, Benková *et al.* 2003) enthalten, verwendet (*DR5rev::GFP* Col-0 sowie *DR5rev::GFP tir1 afb2 afb3*).

Teil 2: ABP1

Auch für ABP1 soll die Relevanz für das schnelle auxininduzierte Wachstum untersucht werden. Zumindest ein Teil der Signaltransduktionskette sowie die Bedeutung für die Genexpression soll ebenfalls aufgeklärt werden.

1. Für die Klärung der Frage, ob ABP1 das schnelle Streckungswachstum von Pflanzen nun steuert, müssen auch Experimente durchgeführt werden, die diesen Prozess in Abhängigkeit von ABP1 direkt zeigen. Die Verwendung von Knockout-Pflanzen wie im Falle von TIR1/AFB ist aufgrund der Embryoletalität des ABP1-Knockouts nicht möglich. Daher werden hier ABP1-überexprimierende *A.-thaliana*-Keimlinge verwendet, die möglicherweise eine veränderte Auxinsensitivität im Vergleich zum Wildtyp aufweisen und damit eine direkte Verbindung zwischen ABP1 und dem schnellen Streckungswachstum aufzeigen könnten.
2. Es ist gut bekannt, dass die Expression auxininduzierter Gene durch TIR1/AFB ausgelöst wird. Es soll überprüft werden, ob auch die durch ABP1 ausgelöste Signalkaskade in der Lage ist, die Expression dieser Gene zu beeinflussen. Dies soll mit Hilfe von Protoplasten, die aus *DR5rev::GFP-Col-0* Pflanzen gewonnen wurden, untersucht werden.
3. Da im Fall von ABP1 eine Signaltransduktionskette bis heute nicht gesichert nachgewiesen werden konnte, soll hier auf proteinbiochemischer Ebene (Affinitätschromatographie) versucht werden, ein ABP1-bindendes Protein zu identifizieren und damit die Funktion von ABP1 aufzuklären. Die Affinitätschromatographie soll mit Hilfe eines synthetischen Peptids mit der Sequenz der C-terminalen Helix von ABP1 durchgeführt werden, da diese das Signal von ABP1 überträgt.

2. Material und Methoden

2.1 Wachstumsversuche

2.1.1 Pflanzenmaterial

Sofern Pflanzen zwecks Samenvermehrung nachgezogen werden mussten, wurden bis zu 10 Pflanzen in einer Klimakammer bei Langtagbedingungen (12 h Licht), 25° C und 60% rel. Luftfeuchte bis zur Samenreife gehalten. Für die Anzucht der Pflanzen für Versuche siehe 2.1.3.

***Arabidopsis thaliana* Ökotyp Columbia-0**

Samen dieser Pflanzen wurden vom Nottingham Arabidopsis Stock Centre (NASC, www.arabidopsis.info, Pflanzencode: N1092) bezogen und daraus Samenmaterial nachgezogen.

***Arabidopsis thaliana tir1-1*-Mutante Ökotyp Columbia-0**

Samen dieser Pflanzen wurden vom Nottingham Arabidopsis Stock Centre (NASC, www.arabidopsis.info, Pflanzencode: N3798) bezogen und daraus Samenmaterial nachgezogen.

***Arabidopsis thaliana* Einzelmutanten *afb1-3*, *afb2-3*, *afb3-4* Ökotyp Columbia-0, Tripelmutante *tir1-1 afb2-3 afb3-4* Ökotyp Columbia-0, Quadrupelmutante *tir1-1 afb1-3 afb2-3 afb3-4* Ökotyp Columbia-0 sowie Tripelmutante *DR5rev::GFP tir1-1 afb2-1 afb3-1* Ökotyp Wassilewskija x Col-0**

Samen dieser Pflanzen wurden von der Arbeitsgruppe um Mark Estelle (University of California, San Diego, USA) bezogen und daraus Samenmaterial nachgezogen (Ausnahme: *DR5rev::GFP tir1-1 afb2-1 afb3-1*; hier stand genügend Samenmaterial zur Verfügung). Abweichend von allen anderen Pflanzen wurde die Quadrupelmutante bei Dauerlicht nachgezogen. Details zur Erzeugung der Mutanten finden sich im **Anhang B**, Material und Methoden.

***Arabidopsis thaliana DR5rev::GFP* Ökotyp Columbia-0**

Erzeugt wurde diese Mutante von Jiri Friml (Universität Gent, Belgien). Samen dieser Pflanzen wurden vom Nottingham Arabidopsis Stock Centre (NASC, www.arabidopsis.info Pflanzencode: N9361) bezogen und daraus Samenmaterial nachgezogen.

***Arabidopsis thaliana* C-cmyc-ABPI-ox 1-3, I-cmyc-ABPI-ox 3-7 sowie C-cmyc-EGFP-ox 1-14 Ökotyp Columbia-0**

Erzeugt wurden diese Mutanten von Mathias Klode (Universität Kiel). Samen dieser Pflanzen wurden von der Arbeitsgruppe um Margret Sauter und Bianka Steffens (Universität Kiel) bezogen. Details zur Herstellung der Mutanten finden sich im **Anhang C**.

2.1.2 Verwendete Lösungen und Chemikalien**KCl-CaCl₂-Lösung:**

10 mM KCl (Roth, Karlsruhe)

1 mM CaCl₂ (Merck, Darmstadt)

lösen in Aqua dest.

IAA-Lösung

Das Kaliumsalz der Indol-3-Essigsäure (Merck, Darmstadt) wurde in Aqua dest. gelöst.

2,4-D und 2,4-D Methylester

2,4-D (Riedel de Haen, Hannover) und 2,4-D Methylester (Sigma, Deisenhofen) wurden in wenig Isopropanol gelöst. Die Konzentration der Stammlösung wurde mit Aqua dest eingestellt. Auf einen maximalen Isopropanol-Anteil von 50% in der Stammlösung war zu achten, dadurch wurde in der Versuchslösung die Konzentration von 0,5% niemals überschritten.

Fusicoccin

Das Toxin des Pilzes *Phomopsis amygdali* (früher *Fusicoccum amygdali*) wurde von der Firma Sigma (Deisenhofen) bezogen und in Isopropanol gelöst.

2.1.3 Anzucht von *A. thaliana*-Keimlingen

Für die Wachstumsversuche mit Hypokotylen von *A. thaliana* wurde ein 4 cm² großes mit H₂O durchtränktes Stück Keimpapier in eine Petrischale gelegt, darauf etwa 20 Samen verteilt, und die Petrischale danach mit Parafilm versiegelt. Sie wurde danach noch mit Alufolie umwickelt und dann bei +4° C für 4 Tage stratifiziert. Anschließend wurde die Alufolie entfernt, und die verschlossene Petrischale für 12 Stunden bei 24° C belichtet, denn *A. thaliana* ist ein Lichtkeimer. Um etioliert ausgewachsene Keimlinge zu erhalten,

wurden die Pflanzen nach der Belichtung wieder in die Alufolie eingewickelt und 2 Tage im Dunkeln bei 24°C gelagert. Nun konnten die Keimlinge für das Wachstumsexperiment verwendet werden.

2.1.4 Messung des Streckungswachstums mit 2 Tage alten *A.-thaliana*-Keimlingen

Ein Blockschälchen wurde mit 3,0 ml einer kaliumhaltigen wässrigen Lösung (10mM KCl, 1 mM CaCl₂) befüllt. Um die Segmente im Gesichtsfeld des Mikroskops zu halten, wurden sie in einen selbst angefertigten kleinen Käfig aus Kunststoff (Durchmesser 5mm) platziert. Fotografiert wurde mit einer Canon 350D-DSLR (Canon, Tokio, Japan) durch ein Binokular. (MBS-10, Lomo, St. Petersburg, Russland) Auf dem Chip der Kamera ergab sich ein Abbildungsmaßstab von 2,12:1.

Die für das Experiment verwendeten Keimlinge wurden vorsichtig vom Keimpapier abgenommen. Unter einem Binokular wurde knapp unterhalb des Apikalhakens mit einer Rasierklinge der Keimling durchtrennt und ein zweiter Schnitt 3 mm weiter unten angesetzt. Das entstandene Hypokotylsegment wurde mit einer Nadel vorsichtig auf die Oberfläche der wässrigen Lösung innerhalb des Käfigs platziert, so dass es wie ein Schiff auf der Lösung schwamm und im Gesichtsfeld der Kamera blieb.

Bis zu 12 solcher Hypokotylsegmente ließen sich vernünftig (ohne sich zu überlagern) im Gesichtsfeld der Kamera unterbringen.

Nun wurde exakt fokussiert und mit der Remote Control Software (Canon) über einen an die Kamera angeschlossenen Computer in Fünf-Minuten-Intervallen Fotos von den Pflanzensegmenten gemacht und im JPG-Format (3 x 8 bit) abgespeichert. 70 Minuten nach dem ersten Foto wurde der Effektor in das Blockschälchen gegeben, auf eine gute Durchmischung war zu achten. Nach der Zugabe wurde für weitere 180 Minuten im 5-Minuten-Takt fotografiert.

2.1.5 Auswertung der Fotos am PC

Die acht Megapixel der Canon EOS 350D erlaubten eine ausreichend hohe Auflösung der abgebildeten Hypokotylsegmente, um Längenänderungen von 0,5% exakt festzustellen. Eine Länge von 5mm wird im Foto mit 1630 Pixeln dargestellt. Mit Hilfe des Programms „Image J“ (V 1.37, National Institutes of Health, USA), wurde die Länge der einzelnen Segmente in jedem Foto genau bestimmt. Mit Hilfe der Software „Origin 5.0 Professional“ wurden die Ergebnisse der Längenmessungen relativiert und auf den Zugabezeitpunkt normiert und grafisch dargestellt.

2.2 Fluoreszenzmessung von intakten *DR5rev::GFP-Col* Keimlingen und geschnittenen Hypokotylen

2.2.1 Anzucht von *A.-thaliana*-Keimlingen

Siehe 2.1.3

2.2.2 Verwendete Lösungen und Chemikalien

KCl-CaCl₂-Lösung und IAA-Lösung

Siehe 2.1.2

2,4-D

2,4-D (Riedel de Haen, Hannover) wurde in wenig Isopropanol gelöst. Die Konzentration der Stammlösung wurde mit Aqua dest eingestellt. Auf einen maximalen Isopropanol-Anteil von 50% in der Stammlösung war zu achten.

2.2.3 Fluoreszenzmikroskopie zur Messung der auxininduzierten Genexpression in Wurzeln und Hypokotylen

Intakte Keimlinge oder Hypokotylsegmente wurden in Petrischalen, in denen sich eine definierte, gerade den Boden der Petrischalen komplett bedeckende 10mM KCl 1 mM CaCl₂-Lösung befand, mit Hilfe des Invers-Fluoreszenzmikroskops (IM35, Zeiss, Oberkochen) untersucht und bei Anregung mit 450-490 nm die emittierte Fluoreszenz der Pflanzen mit Hilfe einer digitalen Spiegelreflexkamera (Canon EOS 350D) bei 515-565 nm detektiert. Die Bilder wurden mit einer Belichtungszeit von 30 s bei ISO1600 als RAW-Datei (3 x 12 bit) gespeichert. Die Kamera führte einen automatischen Dunkelbildabzug durch. Nach der ersten Belichtungsserie wurde der Effektor (IAA oder 2,4-D) zugegeben und in 4- und 24-h-Abständen eine weitere Belichtungsserie der Objekte durchgeführt.

Mit dem Programm „Fitswork“ (Jens Dierks, <http://freenet-homepage.de/JDierks/softw.htm>) wurden die Pixelwerte des Grünkanals der RAW-Bilder quantitativ in ausgewählten Messfeldern der Streckungszonen intakter Wurzeln oder Streckungszonen der Hypokotylsegmente bestimmt. Die Hintergrundfluoreszenz wurde ebenfalls bestimmt und von der Fluoreszenz im Messfeld der Pflanzen abgezogen. Die Pixelwerte wurden mit Hilfe des Programms Origin 5.0 relativiert und auf den Zeitpunkt 0 h normiert.

2.3 Fluoreszenz- und Schwellmessungen von *DR5rev::GFP-Col-0*-Protoplasten

2.3.1 Anzucht von *A.-thaliana*-Keimlingen

Siehe 2.1.3

2.3.2 Verwendete Lösungen

Enzymlösung zur Isolierung von Protoplasten

Um die Enzymlösung für die Isolierung der Protoplasten herzustellen, werden folgende Mikro- („L-Mikro“) und Makronährsalzmedien („L-Makro“) vorbereitet. Originalrezept nach Krautwig (1993), verändert nach Steffens *et al.* (2000).

Mikronährsalze

1500 mg	MnSO ₄ • H ₂ O (Mangan(II)-sulfat-1-hydrat)
500 mg	H ₃ BO ₃ (Borsäure)
750 mg	ZnSO ₄ • 7 H ₂ O (Zinksulfat-Heptahydrat)
75 mg	KI (Kaliumjodid)
25 mg	Na ₂ MoO ₄ • 2 H ₂ O (Natriummolybdat-Dihydrat)
2,5 mg	CuSO ₄ • 5 H ₂ O (Kupfersulfat-Pentahydrat)
2,5 mg	CoCl ₂ • 6 H ₂ O (Kobalt(II)-chlorid-Hexahydrat)

Die aufgeführten Salze wurden ad 100 ml Reinstwasser aufgefüllt, als „L-Mikro“ bezeichnet und bei 4°C aufbewahrt.

Makronährsalze

200 mg	NH ₄ NO ₃ (Ammoniumnitrat)
1750 mg	KNO ₃ (Kaliumnitrat)
450 mg	CaCl ₂ • 2 H ₂ O (Calciumchlorid-Dihydrat)
350 mg	MgSO ₄ • 7 H ₂ O (Magnesiumsulfat-Heptahydrat)
200 mg	KH ₂ PO ₄ (Kaliumdihydrogenphosphat)

Die hier aufgeführten Salze wurden ad 1 l Reinstwasser aufgefüllt. Das fertige Medium wird als „L-Makro“ bezeichnet und bei 4°C aufbewahrt.

Enzyme für den Zellwandverdau

Für 1 l "Ausgangslösung" werden 10 ml „L-Mikro“ und 100 ml „L-Makro“ zusammengegeben und mit Reinstwasser ad 1000 ml aufgefüllt. Von dieser „Ausgangslösung“ werden 90 ml mit 10 ml Reinstwasser versetzt und die folgenden Enzymkonzentrationen zugegeben: 1 g der Cellulase „Onozuka“ RS (Yakult Honsha Co., Tokio, Japan) entspricht einer 1 %igen Cellulase-Lösung und 0,075 g der Pectolyase Y-23 (Kikkoman Corporation, Tokio, Japan) entspricht einer 0,075 %igen Pectolyase-Lösung. In dieser Enzymlösung wird ein pH-Wert von 5,6 und durch die Zugabe von 290 mM Mannitol eine Osmolarität von 330 mosmol eingestellt.

Von dieser Enzymlösung werden 1 ml-Aliquots abgefüllt und bei -20 °C gelagert.

Waschlösung für Protoplasten

1 mM	CaCl ₂ • 2 H ₂ O
10 mM	MES (2-[N-Morpholino]ethansulfonsäure)
10 mM	KCl
400 mM	Mannitol

Der pH-Wert wird mit KOH auf 6,5 eingestellt und die Lösung bei 4 °C gelagert.

IAA-Lösung

Das Kaliumsalz der Indol-3-Essigsäure (Merck, Darmstadt) wurde vor Versuchsbeginn in Waschlösung gelöst.

Stammlösung des C-terminalen Peptids von ABP1 aus *A. thaliana*

Das Peptid wurde von der Firma Eurogentec sa, Herstal, Belgien synthetisiert. Es besitzt die folgenden Eigenschaften:

Sequenz	NH ₂ - Y W D E Q C I Q E S Q K - COOH
Molekulargewicht	1556,66 g/mol
Reinheitsgrad	> 95 %

Von dem Oligopeptid wurde eine 10⁻³ molare wässrige Stammlösung hergestellt.

2.3.2 Protoplastenherstellung

Für die Isolierung wurden etwa 50 werden etwa 50 Keimlinge dekapitiert und ca. fünfzig etwa 3 mm lange Segmente bei RT in 1 ml Enzymlösung gegeben. Nach 4 Stunden waren genügend Protoplasten für mikroskopische Untersuchungen von ihrer Zellwand befreit.

Nach dem Verdau der Zellwände wurde die Suspension mit ca. 3 ml Waschpuffer gespült und dabei durch Wilson-Siebe mit 100 und 20 µm Maschenweite gegeben. Zellen, die im 20-µm-Sieb zurückgehalten wurden, wurden in ca. 0,5 ml Waschlösung aufgenommen und für die Beobachtung unter dem Mikroskop verwendet.

2.3.3 Beobachtung der Protoplasten zur Messung der Schwellreaktion

0,5 ml Zellsuspension wurden mit 3 µl Neutralrot versetzt, wodurch sich lebende Zellen rot färbten. 18 µl-Aliquots dieser gefärbten Zellsuspension wurden in alle Wells einer Mikrotiterplatte gegeben und diese danach sofort mit einem Deckel und Parafilm verschlossen. Der Verschluss sollte die Verdunstung möglichst gering halten, um Osmolaritätsänderungen der Zellsuspension soweit wie möglich zu verhindern. Da später aber noch Effektorzugaben erfolgen mussten, wurden Deckel mit 5 ca. 1 mm großen Löcher verwendet, die Zugaben mittels einer Hamilton-Spritze ermöglichten.

Zur Beobachtung der Protoplasten wurde ein Inversmikroskop „IM 35“ der Firma Zeiss, Oberkochen, verwendet.

Am Kameraanschluss wurde eine Überwachungskamera der Firma „Conrad Electronic“ angeschlossen. Diese Kamera verfügt über einen CCD-Chip mit einer Auflösung von 768 x 576 Bildpunkten. Über ein Steuergerät wurde die Kamera mit dem mit einer Framegrabber-Videokarte ausgestatteten PC verbunden. Mit der Aufnahmesoftware „Giotto“ (Georg Dittie, Bonn, siehe www.videoastronomy.org) konnten per Tastendruck Aufnahmen gespeichert werden.

Pro Versuch wurden etwa 15 vitale, d.h. gefärbte, genähert kreisrunde Protoplasten ausgewählt und in 10-minütigen Abständen 40 Minuten lang fotografiert. Nach dieser Zeit wurden 2 µl der Effektoren (IAA-Lösung oder Peptidlösung) zugegeben. Nach der Zugabe wurden die Protoplasten weitere 60 Minuten in 10minütigen Abständen fotografiert.

2.3.4 Auswertung der Aufnahmen

Die Nettovolumenänderung der Protoplasten im Laufe des Versuchs wurde in zwei Schritten berechnet:

1. Bildvermessung

Die digitalen Fotos der Protoplasten wurden mit dem Programm „Protoblubb for Windows“, einer eigens für diesen Zweck programmierten Bildvermessungssoftware (Hartwig Lüthen, Universität Hamburg), ausgewertet. Dazu wurde zunächst die erste Aufnahme eines Protoplasten manuell vermessen, indem der Umriss der Zelle mit einem Vieleck (ca. 50 Eckpunkte) genähert bestimmt wurde. Das Programm konnte dann die Fläche dieses Vielecks berechnen. Änderungen des Protoplastenumrisses in folgenden Bildern wurden automatisch erkannt und das Vieleck dementsprechend angepasst.

Hierbei musste nur etwa jeder 20ste Punkt des Vielecks manuell nachkorrigiert werden. Auf diese Art ließ sich die Fläche eines Protoplasten im zeitlichen Verlauf des Experiments schnell vermessen. Das Programm speicherte die berechneten Flächen automatisch in ein Textfile ab.

2. Berechnung der Nettovolumenänderung aus Flächenangaben:

Die Flächenangaben wurden mit dem Programm „Origin 5.0“ (Microcal Software Inc., Northhampton, USA) weiter verarbeitet. Das mit Protoblubb erstellte Textfile konnte hier importiert und in eine Wertetabelle eingefügt werden. Die Flächen wurden in Kugelvolumina und dann in prozentuale Werte bezogen auf das Volumen bei $t = 0$ umgerechnet. Man erhielt auf diese Weise das relative Volumen des untersuchten Protoplasten abhängig von der Zeit.

Die Protoplasten zeigten ohne Effektorzugabe eine langsame lineare Abnahme des Volumens mit der Zeit, die durch eine lineare Regression quantifiziert wurde. Die sich aus der Geradengleichung ergebenden Werte konnten von den gefundenen Volumenwerten abgezogen werden, um das endogene stetige Schrumpfen der Protoplasten herauszurechnen. Die prozentuale Änderung dieses Nettovolumens wurde als relative Nettovolumenänderung bezeichnet und als Funktion der Zeit dargestellt. Die Kurvenverläufe der einzelnen Protoplasten wurden danach mit Origin gemittelt und grafisch dargestellt.

2.3.5 Fluoreszenzmikroskopie zur Messung der auxininduzierten Genexpression von Protoplasten

Isolierte *DR5rev::GFP-Col-0*-Protoplasten wurden in 96-Well Mikrotiterplatten am Inversmikroskop (IM35, Zeiss, Oberkochen) untersucht und bei Anregung mit 450-490 nm die emittierte Fluoreszenz mit Hilfe einer digitalen Spiegelreflexkamera (Canon EOS 350D) bei 515-565 nm detektiert. Die Bilder wurden mit einer Belichtungszeit von 30 s bei ISO1600 als RAW-Datei gespeichert.

Nach der ersten Belichtungsserie wurde der Effektor (IAA oder das C-terminale Peptid) zugegeben und in 12- und 24-Abständen eine weitere Belichtung der gleichen Protoplasten durchgeführt.

Mit dem Programm „Fitswork“ wurden die Pixelwerte des Grünkanals der RAW-Bilder quantitativ in den Zellen bestimmt. Der die Hintergrundfluoreszenz wurde ebenfalls bestimmt und von der Fluoreszenz abgezogen. Die Pixelwerte wurden mit Hilfe des Programms Origin 5.0 relativiert, auf den Zeitpunkt 0 h normiert und grafisch dargestellt.

2.4 Affinitätschromatographie

2.4.1 Pflanzenanzucht

Die für die Isolierung des Dockingproteins nötigen Maispflanzen wurden wie folgt gewonnen: Ca. 300 ml Maiskaryopsen wurden 24h in Wasser vorgequollen. In 10 Fotoschalen (35 x 40 cm) wurden je 2 Bogen feuchtes Keimpapier (Sartorius, 145g/m², 300 x 400 mm) gelegt. Auf das Keimpapier wurden ca. 35 vorgequollene Maiskaryopsen der Sorte *Zea mays* L. cv. „Gelber badischer Landmais“ (Saaten Union, Hannover) gestreut, die Fotoschalen mit Alufolie abgedeckt und die Schalen 5 Tage bei 26°C im Dunklen gelagert.

Nach der Keimung wurden die Koleoptilen aller Keimlinge mit den darinsteckenden Primärblättern abgeschnitten und für Isolation der Mikrosomen weiterverwendet.

2.4.2 Gewinnung von Mikrosomen aus Maiskoleoptilen

Verwendete Chemikalien und Medien

Name		Einwaage	Lösen in H ₂ O:
Homogenisierungsmedium	0,3 M Sucrose (Roth, Karlsruhe) 50 mM Hepes (Applichem, Darmstadt) 1 mM Na ₂ -EDTA pH 7,5 (mit KOH) bei 4° C lagern	102,72 g 11,91 g 2 g einer 0,5 M Stammlösung	1 l
Phasenpuffer	0,3 M Sucrose 2 mM KCl 5 mM Phosphatpuffer pH 7,8 bei 4° C lagern	10,27 g 1 g einer 200 mM Stammlösung 2,52 g einer 200 mM Stammlösung	100 ml
Resuspensionsmedium	0,3 M Sucrose 50 mM Hepes pH 7,0 (mit KOH)	102,72 g 11,91 g	1 l
DTT (Dithiothreitol)	Sigma, Deisenhofen	-	
PVP (Polyvinylpyrrolidon)	Applichem, Darmstadt	-	-
PMSF (Phenylmethansulfonylfluorid)	Stammlösung in Isopropanol (Sigma, Deisenhofen)	-	-
Bradford-Proteinbestimmungsreagenz	25 mg Coomassie-Brilliant Blue G (Roth, Karlsruhe) 25 ml Ethanol 50 ml 85% Phosphorsäure (Riede de Haen)		500 ml, danach filtrieren
Zwei-Phasen-System für ein Zentrifugenröhrchen	0,3 M Sucrose 5 mM Phosphatpuffer pH 7,8 2 mM KCl Aqua dest. Alle Substanzen lösen, dann 6,25 % Dextran T500 (GE Healthcare, Freiburg) 6,25 % PEG 3350 (Sigma, Deisenhofen) Das Röhrchen wird mit Parafilm verschlossen und über Nacht bei 4 °C gelagert.	2,77 g 0,675 g 0,270 g 6,67 g 11,25 g 5,37 g	-

40 g auf Eis zwischengelagerte Koleoptilen wurden mit 200ml Homogenisierungsmedium, 4 g PVP und 0,031g DTT 3*10 s im Waring Blender homogenisiert. Das Homogenat wurde durch ein Gaze-Netz (125 µM Maschenweite) filtriert (gut

ausgequetscht), mit 1 mM PMSF versetzt und 10 Minuten bei 10.000 g und 4°C zentrifugiert (Kontron Centrikon H-401, Rotor: A6.14). Der Überstand wurde danach 30 Minuten bei 50.000 g und 4°C zentrifugiert (gleiche Zentrifuge, Rotor A8.24). Das hierbei entstandene Membranpellet wurde in 4 ml Resuspensionsmedium resuspendiert, einer Proteinbestimmung nach Bradford unterzogen und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C eingefroren.

2.4.3 Gewinnung von Plasmamembranvesikeln aus Mikrosomen

Hierfür wurde ein wässriges 2-Phasen-System in 50-ml-Zentrifugenröhrchen vorbereitet. Dieses System erlaubt die Abtrennung von Plasmamembranen von den übrigen Membranen der Zelle (Larsson 1985). Ein wässriges Gemisch von 6% Dextran und 6% Polyethylenglycol trennt in einer PEG-reiche Oberphase und eine Dextranreiche Unterphase, wobei Right-Side-Out-Vesikel sich eher in der Oberphase anreichern, die übrigen Membranvesikel aber in der Inter- oder Unterphase. Hierbei muss sehr genau gearbeitet werden, denn eine Abweichung von den 6% führt entweder zu Plasmamembranverlusten oder Verunreinigungen der Plasmamembranen mit anderen Membranen.

Es wurden sechs Zentrifugenröhrchen gemäß Tab. XX mit dem wässrigen Zwei-Phasensystem befüllt, gut durchmischt und zur ersten Phasentrennung über Nacht bei 4°C stehen gelassen. Am Tag der Abtrennung wurden von den Zentrifugenröhrchen 2-6 die über Nacht entstandenen Oberphasen so weit wie möglich abgenommen und vereint. Auf Zentrifugenröhrchen Nummer 1 wurden nun genau 9 g Resuspensionsmedium mit darin enthaltenen Mikrosomen (siehe 1.2) gegeben, mit Parafilm verschlossen, 30 s kräftig ausgeschüttelt, und bei 1.000 g und 4°C für zehn Minuten zentrifugiert (Kontron Centrikon H-401, Rotor: AS4.13). Praktischerweise führt man 2 parallele Aufreinigungen gleichzeitig durch, damit jeweils 2 Zentrifugenröhrchen den Rotor ausbalancieren. Nach diesem Zentrifugationsschritt wurde die entstandene plasmamembranreiche Oberphase so weit wie möglich in Röhrchen Nummer 2 überführt. In Röhrchen Nummer 1 wurde nun Oberphase gegeben, bis es genauso viel wie Röhrchen Nummer 2 wog. Beide Röhrchen wurden kräftig ausgeschüttelt und 5 min bei erneut 1.000 g im Swing-out-Rotor bei 4°C zentrifugiert. Nach der Phasentrennung wurde die Oberphase von Röhrchen 2 in Röhrchen 3 gegeben und die Oberphase von Röhrchen 1 in Röhrchen 2 gegeben. Es wurde mit frischer Oberphase genau tariert. Nach Ausschütteln wurde erneut zentrifugiert. Diese Schritte wurden wiederholt, bis die die Membranen durch alle Röhrchen „gewandert“ sind

und alle Röhrchen mit der zur Erhöhung der Ausbeute hinzugegebenen Oberphasen gewaschen wurden. Die am Ende erhaltenen plasmamembranreichen Oberphasen wurden mit 200 ml Resuspensionsmedium verdünnt und in der Ultrazentrifuge (Beckmann L-60 Ultrazentrifuge; 45 min, 105.000 g, 4  C) pelletiert.

Die weiß gefärbten Plasmamembranpellets wurden in 1 ml Resuspensionsmedium resuspendiert und bei -80 C gelagert.

Verwendete wässrige Lösungen:

1. Aufbewahrung der Säule

ad 100ml, pH 7

0,1 M BisTris => 2,09 g (Roth, Karlsruhe)

1 M NaCl => 5,84 g (Roth, Karlsruhe)

0,02 % NaN₃ => 0,02 g

2. Solubilisierungspuffer

ad 10 ml, pH 5,8

0,1 M MES => 0,213 g (Sigma, Seelze)

1 mM EDTA => 20 l einer 0,5 M Na-EDTA-Stammlösung (Applichem, Darmstadt)

1,5 M ACA => 1,97 g (Sigma, Seelze)

3. Probenpuffer

ad 100 ml, pH 5,8

0,1 M MES => 2,13 g

1 mM EDTA => 0,2 ml einer 0,5 M Na-EDTA-Stammlösung

0,015 % DDM => 15 Öl einer 10% Stammlösung

4. Elutionspuffer

ad 100 ml, pH 5,8

0,1 M MES => 2,13 g

1 M NaCl => 5,88 g

1 mM EDTA=> 0,2 ml einer 0,5 M Na-EDTA-Stammlösung

0,015 % DDM => 15 Öl einer 10% Stammlösung

2.4.4. FPLC-Aufreinigung möglicher Interaktionspartner von ABP1

Für die Aufreinigung möglicher Interaktionspartner des ABP1 wurde eine FPLC-Anlage (ÄKTA FPLC, GE Healthcare, München) genutzt. Alle in dieser Anlage verwendeten Lösungen wurden mit pyrogenfreiem Wasser angesetzt. Sie wurden darüber hinaus mit OE 66 Membranfiltern (Schleicher & Schuell, Dassel) entgast.

Eine Affinitätssäule (Tricorn 5/50, Amersham Biosciences, Buckinghamshire, Großbritannien) wurde in die FPLC eingebaut. Die Säule hat ein Volumen von 1ml. Beim Säulenmaterial handelt es sich um CNBr-aktivierte Sepharose 4B (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, Großbritannien).

An die Säule wurden Peptidmoleküle mit der Sequenz der C-terminalen Helix von ABP1 aus *Zea mays* L. gekoppelt (Eurogentec, Köln; Reinheit: >85%; Sequenz: H₂N – L H F P F V W D E D C F E A A – COOH)

2.4.5 Kopplung des Peptids an die Sepharose

Es wurden zunächst 0,3 g CNBr-aktivierte Sepharose in 500 ml eiskalter Salzsäure (pH 2,2) gewaschen.

4 mg Peptid wurden in 5ml Kopplungspuffer (500 mM NaCl und 100 mM NaHCO₃, pH 8,5) aufgenommen. Hier hinein wurde die gewaschene Sepharose gegeben. Die Kopplung des Peptids an das Säulenmaterial erfolgte bei RT über 3 Stunden. Danach wurde der Kopplungspuffer entfernt und nicht besetzte Bindungsstellen des Säulenmaterials mit 500 mM Tris-Puffer (pH 8,5) geblockt.

Im Photometer wurde der Erfolg der Kopplung überprüft. Dazu wurde die Extinktion des Peptids im Puffer vor der Kopplung bei 280 nm (E=1,04) und nach der Kopplung (E=0,01) gemessen. Es wurden hiernach 99% aller Peptidmoleküle an die Sepharose gekoppelt.

Das präparierte Säulenmaterial wurde in eine TricornTM 5/50 Säule (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, Großbritannien) gefüllt und in einem azidhaltigen Puffer gelagert.

2.4.6 Durchführung der FPLC-Läufe

Es wurden Affinitätschromatographien mit mikrosomalen Fraktionen sowie Plasmamembranfraktionen durchgeführt.

Solubilisierung

Die Proben wurden immer auf Eis gelagert.

10 mg Membranproteine (bei FPLC7: Mikrosomen, Bei FPLC9 Plasmamembranen)

wurden in 1,15ml Solubilisierungspuffer aufgenommen, gut resuspendiert und mit 200 μ l 10% Dodecylmaltosid (DDM) versetzt. Es stellte sich eine DDM-Konzentration von 1,5% (30 mM) ein. Dieser Wert liegt etwa 60fach über der kritischen Micellarkonzentration des Dodecylmaltosids. Es wurde eine Stunde bei 4°C solubilisiert, die Probe anschließend mit Probenpuffer auf 10 ml aufgefüllt und nicht solubilisierte Bestandteile in der Ultrazentrifuge bei 100.000 g abzentrifugiert. 1ml des Überstandes wurde sofort bei -70°C eingefroren, die restlichen 9ml wurden in den Superloop der FPLC injiziert.

Affinitätschromatographie

Die Säule wurde vor dem Auftragen des Solubilisats mit 10 Säulenvolumen Probenpuffer gewaschen (flow: 0,2ml/min). Dann wurde das Solubilisat mit 0,1 ml/min aufgetragen, anschließend die Säule wieder mit 10 Säulenvolumen Probenpuffer bei 0,2ml/min gewaschen.

Die Elution erfolgte mit einem NaCl-Gradienten gemäß Abbildung 2.1. Die Flussgeschwindigkeit wurde auf 0,2ml/min eingestellt. Es wurden 1 ml-Fractionen des Eluats gesammelt und bei -70°C gelagert. .

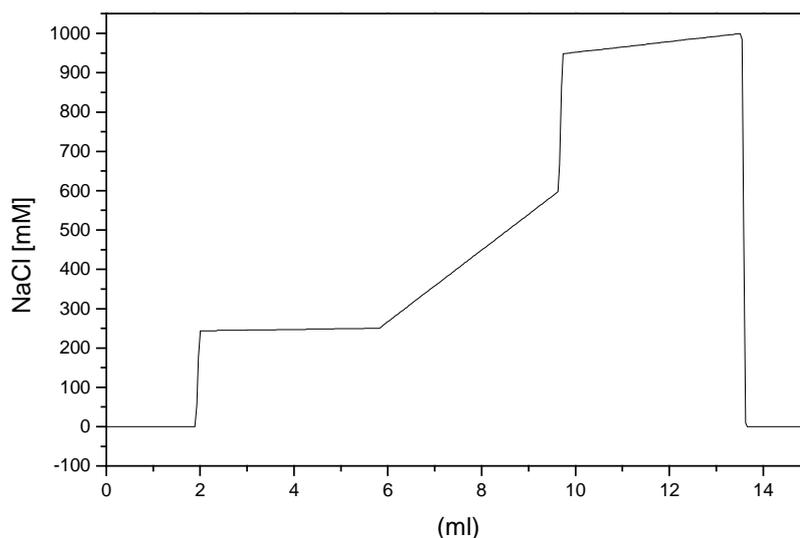


Abb. 2.1: NaCl-Gradient zur Elution der Affinitätssäule.

Die gesammelten Fraktionen wurden gesammelt, in Cryoröhrchen gefüllt und bei -80°C eingefroren.

Die ÄKTA-FPLC erlaubt eine Abschätzung der eluierten Proteinmenge, da sie die UV-Absorption bei 280 nm messen kann. Die Fraktionen, in erhöhte UV-Absorption gemessen wurde, wurden für die SDS-PAGE weiter verarbeitet. Auch der Durchfluss, d.h. die Proteine, die nicht an die Säule gebunden hatten wurden gesammelt und ebenfalls für die SDS-PAGE weiter verwendet.

2.4.7 SDS-PAGE

Verwendete Lösungen:

10% (w/v) CHAPS-Stammlösung (Merck, Darmstadt)

24% Trichloressigsäure-Stammlösung (Fluka, Seelze)

Loading Buffer 5x (Laemmli Sample buffer [125 mM TRIS, pH 6,8 – HCl, 4 % (w/v) SDS, 0,002 % Bromphenolblau, 20 % (w/v) Glycerol, 50 mM Dithiothreitol]; Bio-Rad, München)

Präzipitierung: Die Aus der FPLC gewonnenen Fraktionen wurden einer Fällung mit Trichloressigsäure unterzogen.

400 μl Probe wurden mit 44 μl 10% CHAPS-Lösung versetzt, 5min auf Eis gelagert und dann mit 146 μM Trichloressigsäure (24%) versetzt. Nach Vortexen wurde die Probe 30min zur Fällung auf Eis inkubiert. Danach wurden die ausgefallenen Proteine bei 4°C und 16.000 g in der Mikrozentrifuge sedimentiert, der Überstand abpipettiert, und das Pellet mit 1 ml H_2O gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation (16.000g, 4°C) wurde das Wasser abpipettiert, das Pellet in 20 μl Loading-Buffer resuspendiert und in der SDS-PAGE eingesetzt.

Durchführung der SDS-PAGE:

Gelgießstand und Elektrophoresekammer:

Mini-Protean II Electrophoresis Cell (Bio-rad, München)

Sammelgel:

Für ein 4%iges Gel:

0,33 ml 30 % Acrylamid/ 0,8 % Methylenbisacrylamid (Roth, Karlsruhe)

0,63 ml 0,5 M Tris / 0,4 % SDS, pH 6,8 (Roth, Karlsruhe / Merck, Darmstadt)

1,54 ml H₂O

zum Auslösen der Polymerisation:

10 µl 10 % Ammoniumpersulfat (Serva, Heidelberg)

2 µl TEMED (Serva, Heidelberg)

Trenngel :

Für zwei 11%ige Gele:

1,84 ml 30 % Acrylamid/ 0,8 % Bisacrylamid

1,25 ml 1,5 M Tris / 0,4% SDS, pH 8,8

1,92 ml H₂O

zum Auslösen der Polymerisation:

25 µl 10 % Ammoniumpersulfat

2,5 µl TEMED

Sammelgel und Trenngel wurden in Falcontubes angesetzt und 15 Minuten im Ultraschallbad entgast. Direkt vor dem Gießen des Minigels wurde in die Trenngellösung 25µl 10% Ammoniumpersulfat sowie 2,5 µl TEMED gegeben, umgeschwenkt und ein Trenngel für 7x8x0,1cm Mini-Gele mit Hilfe einer Pasteurpipette gegossen, und zwar so, dass die Proteine eine Strecke von genau 1cm im Sammelgel zurücklegen müssen, bevor sie ins Trenngel eindringen. Die Gele wurden nun mit 200 µl Isopropanol überschichtet und 45 min zum Polymerisieren stehen gelassen. Danach wurde das Isopropanol abgegossen, letzte Reste hiervon mit Filterpapier abgesogen. Die Sammelgellösung wurde mit 10 µl 10% Ammoniumpersulfat und 2 µl TEMED versetzt, umgeschwenkt, und mit Hilfe einer Pasteurpipette auf das bereits polymerisierte Trenngel gegeben. Das

Sammelgel wurde mit Parafilm zugedeckt und 45 zum Polymerisieren stehen gelassen. Danach wurde es für die Elektrophorese eingesetzt.

Elektrophorese:

Tankpuffer, 5fach konzentriert:

Ad 1L

0,125 M Tris => 15,0 g Roth, Karlsruhe
0,96 M Glycin => 72,0 g Merck, Darmstadt
0,5 % SDS => 5,0 g Merck, Darmstadt

mit Reinstwasser ad 1000 ml auffüllen

In der Regel wurden zwei Gele gleichzeitig in der Elektrophorese eingesetzt.

Die Gele wurden in den Elektrophoresestand eingesetzt und dieser mit Tankpuffer gefüllt. Zu untersuchende mit Trichloracetat gefällte (Siehe XY) Proben wurden 5 Minuten auf 95°C erhitzt und in die Taschen des Gels pipettiert. Eine Tasche wurde nur mit 20 µl Loading Buffer, eine weitere mit einem Proteinstandard (Broad Range Marker, Biorad, München) befüllt. Die Elektrophorese lief 15 Minuten bei 120 V, danach noch mal 45 min bei 150 V gemäß der Standardmethode nach Laemmli (1970). Nach der Elektrophorese wurden die Gele mit Coomassie gefärbt

Färbelösung

0,25% Coomassie => 5g Coomassie G-250, Roth, Karlsruhe
20% Methanol => 400 ml
7,5% Essigsäure => 150 ml

mit Reinstwasser ad 2000 ml auffüllen

Entfärbelösung

10% Essigsäure => 100 ml
40% Methanol => 400 ml

mit Reinstwasser ad 1000 ml auffüllen

Nach der SDS-PAGE wird das Gel an einer Ecke beschnitten, um die korrekte Orientierung des Gels beim Hantieren mit dem Gel sicherzustellen. Das Gel wird zunächst

für 45min in 50 ml Färbelösung bei leichtem Schütteln inkubiert, anschließend wird der Hintergrund mit 100ml Entfärbelösung entfärbt, die Lösung dabei mehrmals erneuert. Zum Schluss wird die Entfärbelösung durch Reinstwasser ersetzt, das Gel fotografiert und Banden für die Massenspektroskopische Untersuchungen ausgeschnitten. Die Proteinbanden, die eine Anreicherung des entsprechenden Proteins in der Plasmamembran im Vergleich zu den Mikrosomen anzeigen wurden ausgeschnitten und im Eppendorf-Tube bei -20° C gelagert.

2.4.9 Massenspektroskopische Untersuchungen

Ausgeschnittene Banden wurden von unserem Kooperationspartner Dr. Friedrich Buck (Universität Hamburg, Universitätskrankenhaus Eppendorf (UKE), Institut für zelluläre Biochemie und klinische Neurobiologie) massenspektrometrisch untersucht. Bei Verwendung der Elektrospray-Ionisations-Tandem-Massenspektrometrie (ESI-MS-MS) lassen sich durch tryptischen In-Gel Verdau gewonnene Proteinfragmente sequenzieren und aus der Aminosäuresequenz dieser Peptide die dazugehörigen Proteine mit sehr hoher Sicherheit identifizieren.

Bei der SDS-PAGE entstandene Proteinbanden werden ausgeschnitten und zunächst einem tryptischen Verdau unterzogen, wodurch die Proteine auf der Carboxylseite von Arginin- und Lysinresten gespalten werden.

Nun kommt es zum Einsatz der Elektrospray-Ionisation, die eine besonders schonende Methode ist und die Biomoleküle nicht zerstört.

Die freigesetzten Peptide werden durch eine Metallkapillare geleitet, an dessen Ende eine Spannung anliegt. Zusammen mit einer Gegenelektrode bildet sich an dieser Stelle ein elektrisches Feld, welches in der Analysenlösung befindliche Ionen anzieht. Hierbei entsteht ein Aerosol aus winzigen Lösungströpfchen mit darin befindlichen Ionen. Die Lösung verdampft, es kommt zu so genannten Coulomb-Explosionen, die auf der gegenseitigen Abstoßung der Ionen beruhen. Die freigesetzten Ionen werden im elektrischen Feld mehrerer Quadrupole beschleunigt, aufgrund ihres Masse/Ladungs-Verhältnisses getrennt und die Masse im Detektor bestimmt.

Mittels Recherche in Mais- oder Arabidopsisdatenbanken konnte das zu einer Peptidsequenz gehörende Protein gefunden werden.

3. Ergebnisse

3.1 Messung des schnellen Streckungswachstums von Hypokotylsegmenten

Die Primärantwort auf Auxine lässt sich in diesem Versuchsaufbau gut mit zwei Kenngrößen beschreiben, welche als Maß für die Auxinsensitivität dienen:

- I. die Längenänderung der *A.-thaliana*-Hypokotylsegmente 180 Minuten nach der Hormonzugabe (maximale Streckung)
- II. die lag-Phase, also die Zeit bis zum Einsetzen des Wachstums nach der Hormonzugabe.

Um zu klären, ob TIR1 und seine Homologe oder ABP1 das auxininduzierte Streckungswachstum direkt initiieren, sind zeitlich hochauflösende Wachstumsmessungen vonnöten, die diese beiden Kenngrößen genau genug dokumentieren können.

3.1.1 Grundlegendes

Col-0-Segmente zeigten eine maximale Streckung von etwa 6%, die bei einer Auxinkonzentration von 10 μM IAA drei Stunden nach der Hormonzugabe erreicht wurde. Bei niedrigeren IAA-Dosen fiel die maximale Streckung geringer aus. Bei einer IAA-Konzentration von 1 μM lag die maximale Streckung der Hypokotylsegmente bei ca. 4,5 % und bei einer Konzentration von 0,1 μM IAA wurden nur noch 0,5 % Streckung erreicht. Mit abnehmender IAA-Konzentrationen verlängerte sich die lag-Phase von 10 Minuten bei der höchsten hier dargestellten Konzentration über 30 Minuten bei 1 μM IAA zu 80 Minuten bei 0,1 μM IAA. Ein endogenes Wachstum, also ein Wiedereinsetzen des Streckungswachstums einige Stunden nach der Dekapitierung war bei den untersuchten Hypokotylsegmenten nicht detektierbar (Abb. 3.1)

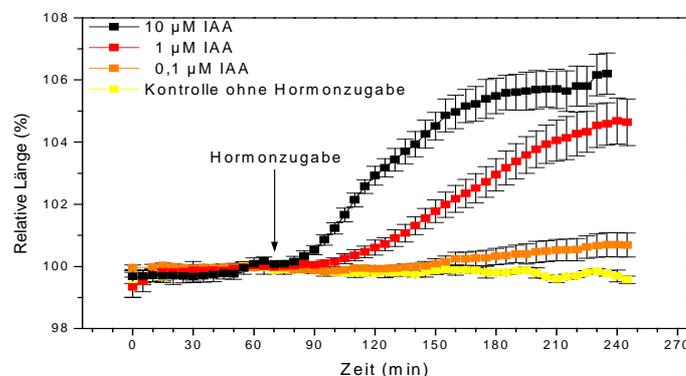


Abb. 3.1: Die Zugabe verschiedener IAA-Konzentrationen zu Col-0 Hypokotylsegmenten äußerte sich durch verschieden starke Längenänderung dieser, die etwa 3 Stunden andauerte. Dargestellt ist jeweils das Mittel aus 16 Experimenten mit seinem Standardfehler.

3.2 Streckungswachstum der F-Box-Einzelmutanten

Die Untersuchung der Einzelmutanten mit IAA und 2,4-D soll Hinweise darauf geben, ob sich das Fehlen eines bestimmten F-Box-Proteins direkt auf die Fähigkeit zum schnellen auxininduzierten Streckungswachstum auswirkt.

3.2.1 IAA-induziertes Streckungswachstum der Einzelmutanten

Die Messung des IAA-induzierten Streckungswachstums der T-DNA-Insertionsmutanten *tir1-1*, *afb1-3*, *afb2-3* sowie *afb3-4* im Vergleich zu ihrem genetischen Hintergrund Col-0 ergab, dass alle Pflanzen zu schnellem Streckungswachstum imstande sind. In allen untersuchten Pflanzen ließ sich bei einer Konzentration von 10 μM IAA eine deutliche Primärantwort feststellen (Abb. 3.2). Die lag-Phasen waren in allen untersuchten Mutanten ähnlich der des Wildtyps; im Falle von *afb1-3*, *afb2-3* und *afb3-4* lediglich um 10-15 Minuten verlängert. Auch die Amplituden der Wachstumskurven verhielten sich bei den Mutanten *tir1-1* sowie *afb1-3* wildtypartig. *Tir1-1* zeigte sogar eine leicht höhere maximale Streckung als Col-0. So zeigten die *tir1-1* Hypokotylsegmente 180 Minuten nach der IAA-Zugabe eine Streckung von fast 7% (Col-0: 6%). Bei den Mutanten *afb2-3* und *afb3-4* waren leichte Verlängerungen der lag-Phasen gegenüber dem Wildtyp festzustellen. Auch die maximale Streckung dieser beiden Mutanten war leicht reduziert: Sie erreichten 180 Stunden nach IAA-Applizierung nur ca. 4% (*afb2-3*) bzw. 5% (*afb3-4*) Längenzunahme.

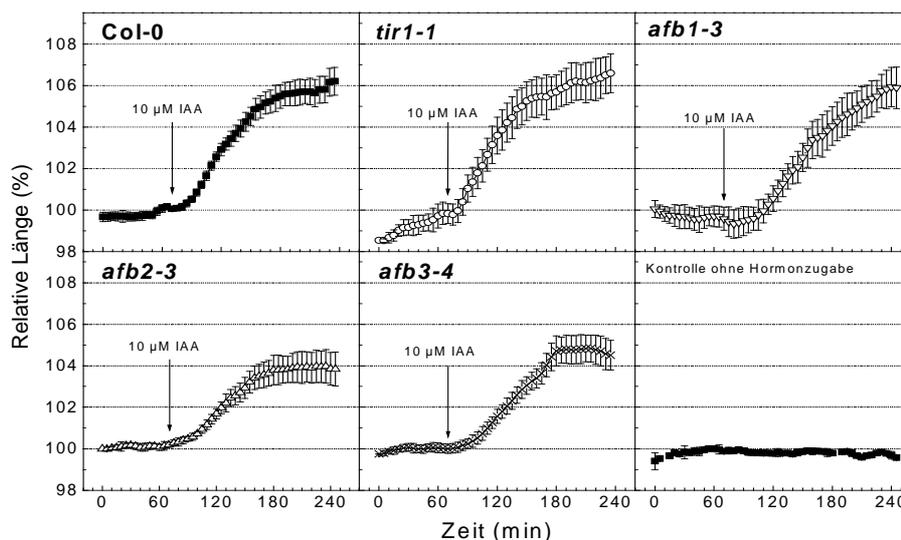


Abb. 3.2: Verlauf des auxininduzierten schnellen Streckungswachstums in Hypokotylsegmenten von *A. thaliana* nach Zugabe von 10 μM IAA. Untersucht wurden der Wildtyp (Col-0) sowie die F-Box-Protein-Einzelmutanten *tir1-1*, *afb1-3*, *afb2-3* sowie *afb3-4*. Die einzelnen Kurven repräsentieren gemittelte Werte aus mindestens 9 Einzelmessungen.

3.2.2 2,4-D-induziertes Streckungswachstum der Einzelmutanten

Das synthetische Auxin 2,4-D in einer physiologischen Konzentration von 10 μM löste im Wildtyp sowie in den Einzelmutanten *tir1-1*, *afb1-3*, *afb2-3* und *afb3-4* sehr ähnliche Zeitverläufe des Streckungswachstums wie gleiche Konzentrationen von IAA. Nach 2,4-D-Zugabe zeigten auch hier alle untersuchten Segmente deutlich erkennbares Streckungswachstum (Abb. 3.3). Die Verzögerung bis zum Einsetzen des Wachstums war bei *tir1-1* wildtypartig, bei *afb1-3* und *afb2-3* leicht erhöht (ca. 20 min) und bei *afb3-4* mit 30 Minuten am längsten. Auch bei der Betrachtung der maximalen Streckung 180 Minuten nach der 2,4-D-Zugabe zeigen sich Parallelen zum Verlauf des Versuchs mit IAA. Genau wie bei der Anwendung von IAA reagierten *tir1-1*-Hypokotylsegmente sogar mit einer größeren Streckung als der Wildtyp nach 180 Minuten. *Afb2-3* und *afb3-4* zeigten auch hier eine kleinere Streckung als der Wildtyp mit maximalen Werten von 4% - 4,5% Längenänderung. Etwas abweichend als bei der IAA-Zugabe verhielten sich die *afb1-3*-Hypokotylsegmente. Bei Applizierung von 2,4-D konnte hier nur eine maximale Streckung um 4% nach Hormonzugabe ermittelt werden, statt 6% bei IAA.

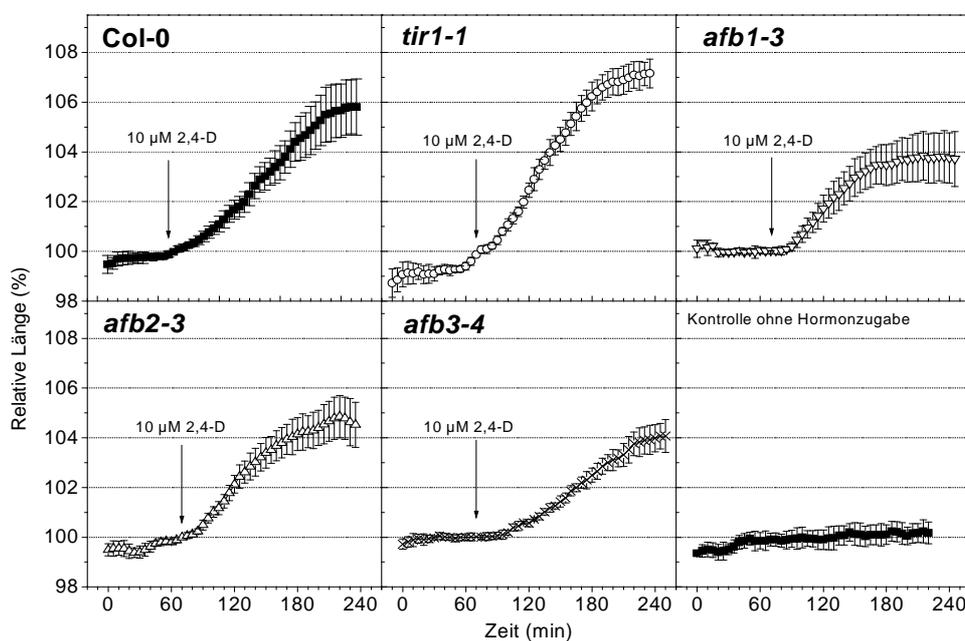


Abb. 3.3: Verlauf des auxininduzierten schnellen Streckungswachstums in Hypokotylsegmenten von *A. thaliana* nach Applizierung von 10 μM 2,4-D. Untersucht wurden der Wildtyp (Col-0) sowie die F-Box-Protein-Einzelmutanten *tir1-1*, *afb1-3*, *afb2-3* sowie *afb3-4*. Die einzelnen Kurven repräsentieren gemittelte Werte aus mindestens 10 Einzelmessungen.

3.2.3 Zusammenfassung über die Einzelmutanten

Die hier untersuchten Pflanzen zeichneten sich durch eine wildtypartige oder fast wildtypartige auxininduzierten Wachstumsreaktion aus. Die Primärantwort war unabhängig vom verwendeten Auxin (IAA oder 2,4-D) gut ausgeprägt.

Es sind bei der Applizierung von 10 μ M IAA im Falle von *afb2-3* und bei der Applizierung von 10 μ M 2,4-D im Falle von *afb1-3*, *afb2-3* und *afb3-4* leicht reduzierte Amplituden der Wachstumskurven festzustellen. Sie sind allerdings in allen Fällen höchstens um 2% niedriger als die des Wildtyps. Auch die lag-Phasen sind bei den Einzelmutanten nicht oder nur leicht verlängert. Diese Ergebnisse deuten auf eine Redundanz des F-Box-Auxinrezeptorsystems für die schnelle Wachstumsantwort hin. So könnte es sein, dass der Knockout eines einzelnen F-Box-Auxinrezeptors durch die Aktivität seiner Homologe gemildert wird.

3.3 Mehrfachmutanten

Die mögliche Redundanz der einzelnen F-Box-Auxinrezeptoren sollte nun durch die Untersuchung von Mehrfachknockouts der F-Box-Proteine geklärt werden. Die T-DNA-Insertionsmutanten *tir1-1 afb2-3 afb3-4* (im Folgenden als Tripelmutante bezeichnet) sowie *tir1-1 afb1-3 afb2-3 afb3-4* (Quadrupelmutante) wurden hierfür verwendet. Sie unterschieden sich bereits im Habitus deutlich vom Wildtyp wie auch von den Einzelmutanten.

3.3.1 Auswirkungen der Mehrfachknockouts auf den Habitus

Die für die vorliegende Arbeit verwendeten Mutanten unterschieden sich zum Teil als ausgewachsene Pflanzen sowie als Keimlinge deutlich im Habitus vom Wildtyp. Die F-Box-Einzelmutanten zeigten keine besonderen Unterschiede zum Wildtyp, aber die Tripel- und Quadrupelmutante waren im adulten Stadium sehr viel kleiner und bildeten wesentlich weniger Blüten als der Wildtyp (Abb. 3.4)



Abb. 3.4: Habitus von Wildtyp (Col-0, links), Tripelmutante (*tir1-1 afb2-3 afb3-4*, mittig) und Quadrupelmutante (*tir1-1 afb1-3 afb2-3 afb3-4*, rechts).

Der mehrfache Knockout von F-Box-Proteinen erwies sich als sehr schwerwiegend für die Entwicklung der Pflanze. Sie waren bei der Nachzucht auf besonders viel Licht und sehr häufiges Gießen angewiesen. Die Quadrupelmutante musste im Dauerlicht nachgezogen werden.

Auch die für die Wachstumsmessungen verwendeten Keimlinge zeigten im Falle der Tripel- und der Quadrupelmutante starke Unterschiede zum Wildtyp. So waren bei 70% der gekeimten Samen die Wurzeln wie auch die Hypokotyle kaum oder gar nicht entwickelt. Diese Beobachtung wurde auch schon von Dharmasiri *et al.* 2005 gemacht: sie klassifizierten diese Keimlinge als Klasse-I- und -II-Keimlinge. Lediglich die als Klasse-III-Keimlinge bezeichneten Pflanzen besitzen Wurzeln und Hypokotyle. Aus Klasse-III-Keimlingen gewonnene folgende Pflanzengenerationen keimten ebenfalls im Verhältnis 70% Klasse I und II zu 30% Klasse III aus. Die Autoren schlossen daraus, dass diese Aufspaltung keine genetische Variabilität des Materials repräsentiert.

Da nur Klasse-III-Keimlinge ein messbares Hypokotyl besaßen, wurden in der vorliegenden Arbeit nur diese für die Messung des Steckungswachstums verwendet.

3.3.2 Streckungswachstum der Mehrfachmutanten

Um zu prüfen, ob TIR1 sowie AFB1, 2 und 3 ein redundantes System zur Auxinperzeption mit dem Zweck der Induktion von schnellem Streckungswachstums darstellen, wurden Hypokotylsegmente der Tripelmutante sowie der Quadrupelmutante auf ihre Fähigkeit zu schnellem Streckungswachstum nach Applizierung von exogenem IAA und 2,4-D untersucht.

3.3.2.1 Antwort der der Mehrfachmutanten auf exogen appliziertes IAA

Es ergab sich, dass die Tripel- und die Quadrupelmutante bei verschiedenen IAA-Konzentrationen die Primärantwort auf IAA zeigten (Abb. 3.5).

Bei der sehr hohen Dosis von 100 μM IAA ließ sich in der Tripel- wie auch der Quadrupelmutante eine fast wildtypartige Reaktion feststellen. Die Streckung 180 Minuten nach der IAA-Zugabe betrug bei Col-0 6,5%, bei der Tripelmutante 6% und bei der Quadrupelmutante 5,5%. Bei der Betrachtung der lag-Phase zeigen sich deutlichere Unterschiede. Während der Wildtyp bereits ca. 15 Minuten nach der Applizierung eine Antwort zeigt, dauert die lag-Phase bei Tripel- und Quadrupelmutante mit 40 Minuten deutlich länger (Abb. 3.5, A).

Die verlängerte lag-Phase bei den Mehrfachmutanten war auch bei niedrigeren IAA-Konzentrationen zu beobachten: bei 10 μM IAA verlängerte sich die lag-Phase der untersuchten Tripelmutanten-Hypokotylsegmente (20min) leicht gegenüber dem Wildtyp (15 min), während die Quadrupelmutante mit 50 Minuten eine sehr lange lag-Phase aufwies. Die maximale Streckung im Laufe des Versuchs mit 10 μM IAA ergab, dass die Tripelmutante mit ca. 6% und die Quadrupelmutante mit ca. 7% annähernd die gleiche Längenänderung wie der Wildtyp (6%) erreichten (Abb. 3.5, B).

Bei einer IAA-Konzentration von 1 μM waren die Unterschiede zwischen den Mutanten und dem Wildtyp etwas deutlicher. Alle Segmente zeigten schnelles IAA-induziertes Wachstum. Der Wildtyp erreichte hier eine Längenzunahme von ca. 5%, während die Tripelmutante 4% und die Quadrupelmutante nur 2% wuchs. Die lag-Phase verhielt sich hier ähnlich wie bei der 10 μM -IAA-Applizierung. Die Tripelmutante reagierte mit einer 35minütigen lag-Phase auch bei dieser Konzentration unwesentlich langsamer als der Wildtyp (30 min), die Quadrupelmutante hingegen zeigte erst 60 Minuten nach der Zugabe des Auxins Streckungswachstum (Abb. 3.5, C). Bei der 0,1 μM IAA-Dosis war in allen Fällen die Primärantwort nicht mehr oder kaum noch detektierbar. Während die Tripel- und Quadrupelmutante kein Streckungswachstum zeigten, war dies bei Col-0 mit ca. 0,5 %

Längenänderung im Laufe des Versuchs gerade noch detektierbar. Die lag-Phase beim Wildtyp war hier mit 60 Minuten sehr lang (Abb. 3.5, D).

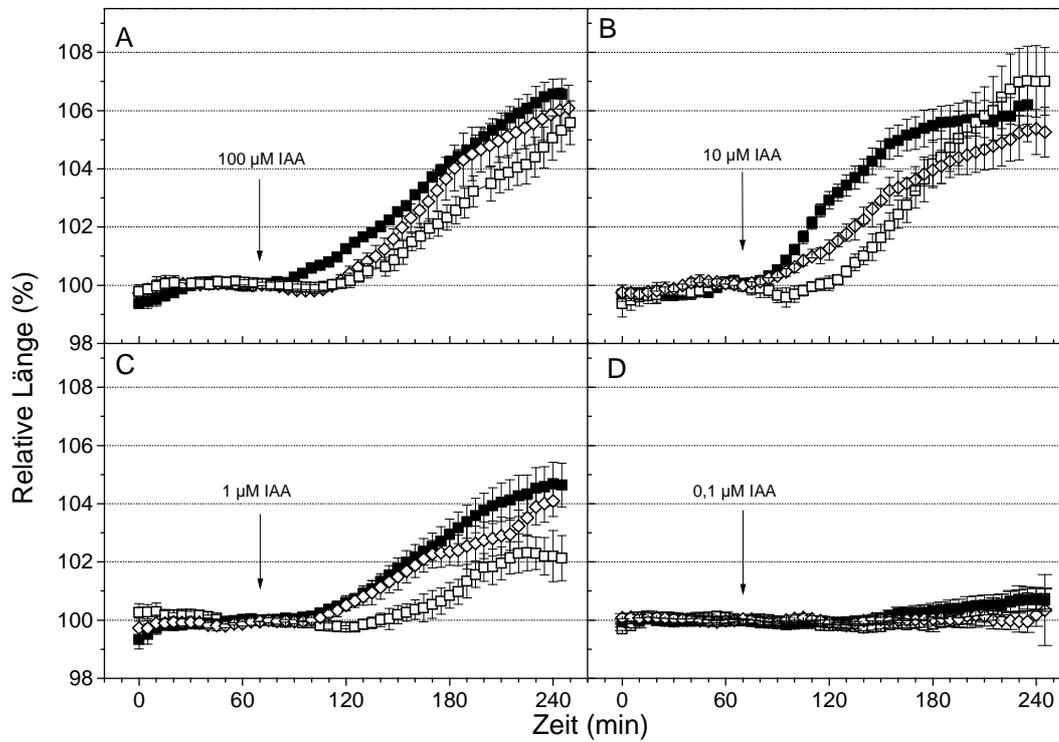


Abb. 3.5: Zeitverlauf des auxininduzierten Streckungswachstums von *A. thaliana*-Hypokotylsegmenten bei Zugabe verschiedener IAA-Konzentrationen. Darstellung: Col-0 (gefüllte Quadrate); Tripelmutante (offene Rauten); Quadrupelmutante (offene Quadrate). Die einzelnen Kurven repräsentieren gemittelte Werte aus mindestens 5 Einzelmessungen.

3.3.2.2 Antwort der Mehrfachmutanten auf exogen appliziertes 2,4-D

Im Gegensatz zu den Messungen mit IAA ergab sich hier insgesamt ein deutlich anderes Bild bezüglich der Primärantwort. Bei der höchsten angewendeten 2,4-D-Dosis (100 μM) zeigten sich zunächst kaum Unterschiede in der lag-Phase wie auch der maximalen Streckung. Die lag-Phase dauerte bei Wildtyp, Tripelmutante und Quadrupelmutante 15-20 Minuten, die maximale Streckung 180 Minuten nach der 2,4-D-Applizierung betrug bei allen Segmenten ca. 6% (Abb. 3.6, A). Bei Verwendung der 10 μM -Dosis begannen die Wildtypsegmente nach ca. 15 Minuten mit Streckungswachstum und erreichten ca. 6% Längenänderung, während die Tripel- und Quadrupelmutanten mit 50-60-minütigen lag-Phasen deutlich verzögert reagierten, und dann auch nur maximale Längenänderungen von 2% zeigten (Abb. 3.6, B).

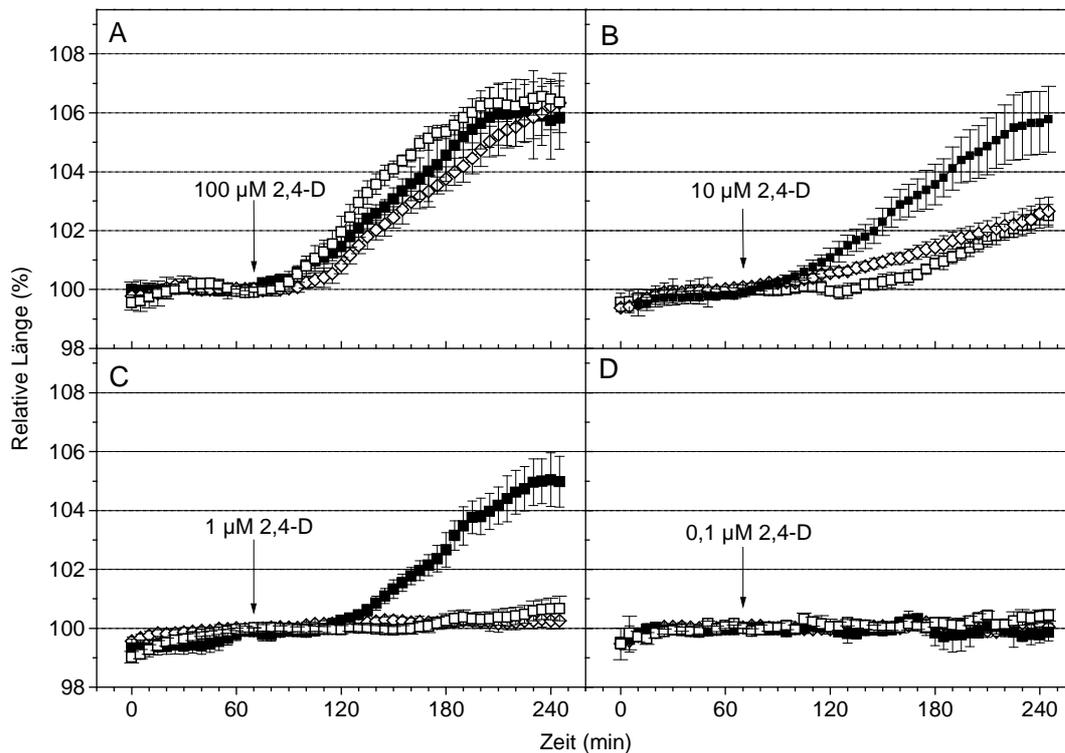


Abb. 3.6: Zeitverlauf des auxininduzierten Streckungswachstums von *A.-thaliana*-Hypokotylsegmenten nach Zugabe verschiedener 2,4-D-Konzentrationen. Darstellung: Col-0 (gefüllte Quadrate); Tripelmutante (offene Rauten); Quadrupelmutante (offene Quadrate). Die einzelnen Kurven repräsentieren gemittelte Werte aus mindestens 5 Einzelmessungen.

Am deutlichsten wurde der Unterschied zwischen Wildtyp und den F-Box-Mehrfachmutanten bei Anwendung der 1- μ M-2,4-D-Dosis. Hier konnte eine deutliche Streckung von Wildtypsegmenten (ca. 5%) beobachtet werden, während die Tripel- und Quadrupelmutanten nicht oder kaum reagierten (0-0,5% Längenänderung). Die lag-Phase der Wildtypsegmente bei 2,4-D-Zugabe war hier deutlich gegenüber der lag-Phase bei IAA-Zugabe gleicher Konzentration verzögert (Abb. 3.6, C). Bei Verwendung der niedrigsten Dosis (0,1 μ M 2,4-D) war weder bei Wildtypsegmenten noch bei Segmenten der F-Box-Mehrfachmutanten Wachstum detektierbar (Abb. 3.6, D).

3.3.2.3 Zusammenfassung über die maximale Streckung und lag-Phase der Mehrfachmutanten bei IAA und 2,4-D

Es ist festzustellen, dass die Mehrfachmutanten bei IAA-Zugabe grundsätzlich gegenüber dem Wildtyp mit einer deutlich verlängerten lag-Phase reagierten. Auch bei der 2,4-D-

Applizierung lässt sich diese Tendenz erkennen. Bei der Kenngröße der maximalen Streckung zeigen die Mehrfachmutanten bei IAA-Zugabe ähnliche Längenänderungen wie der Wildtyp. Hypokotylsegmente der Tripelmutante und Quadrupelmutante liegen bei verschiedenen IAA-Konzentrationen 0-1% hinter den Wildtypsegmenten zurück, lediglich bei 1 μM fällt die Quadrupelmutante mit ca. 3 % deutlicher hinter der maximalen Streckung des Wildtyps (5%) ab. Nach Applizierung des synthetischen Hormons 2,4-D zeigen die aus Mehrfachmutanten gewonnen Hypokotylsegmente aber stark reduziertes Längenwachstum. In Abb. 3.7 wird die maximale Streckung der Wildtyp-, Tripel- und Quadrupelmutanten-Hypokotylsegmente in Abhängigkeit von Dosis und verwendetem Hormon halblogarithmisch dargestellt.

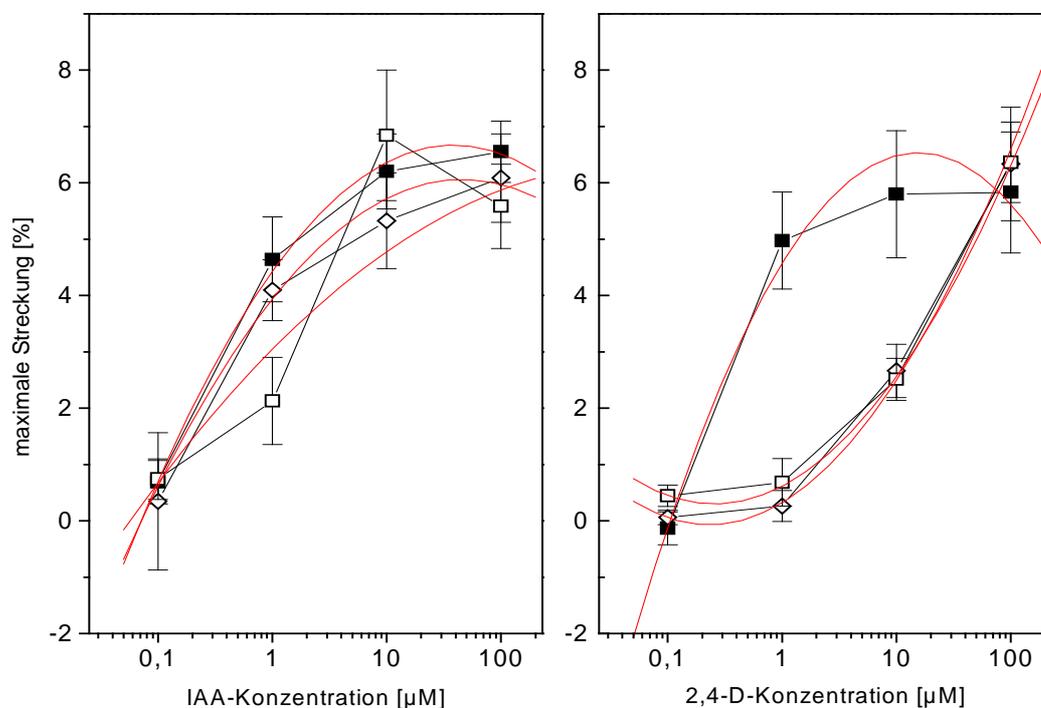


Abb. 3.7: Dosis-Wirkungskurven der Mehrfachmutanten und Col-0 in Abhängigkeit des verwendeten Hormons. Zusätzlich werden durch polynomische Regression ermittelte Ausgleichskurven gezeigt. Darstellung: Col-0 (gefüllte Quadrate); Tripelmutante (offene Rauten); Quadrupelmutante (offene Quadrate)

Während bei IAA alle Hypokotylsegmente eine ähnliche Dosis-Wirkungscharakteristik zeigen, heben sich bei Verwendung von 2,4-D die Mehrfachmutanten stark von Col-0 stark ab. Der Wildtyp hingegen behält die bei Anwendung von 2,4-D die Charakteristik, die er auch bei Anwendung von IAA zeigt (Abb. 3.7).

Die Ergebnisse der Untersuchung der Mehrfachmutanten deuten auf eine 2,4-D-Insensitivität, nicht aber auf eine IAA-Insensitivität der Tripel- wie auch der Quadrupelmutanten hin.

3.4 Untersuchungen zum Auxintransport der Mehrfachmutanten

3.4.1 Antwort der Mehrfachmutanten auf exogen appliziertes 2,4-D und den Methylester dieses Auxins.

Dass die Tripel- und die Quadrupelmutante in erster Linie resistent gegen 2,4-D und nicht gegen IAA sind, mag mit der Aufnahme des Auxins in die Zelle zu tun zu haben. Wo IAA auch ohne Auxintransporter in die Zellen eindringen kann, ist die Aufnahme von 2,4-D auf einen funktionierenden Auxintransporter angewiesen. Die Expression des Auxinfluxcarriers LAX3 ist bei den Mehrfachmutanten gestört, so dass 2,4-D möglicherweise nicht mehr effizient aufgenommen und in der Zelle akkumuliert werden kann.

Um zu prüfen, ob die 2,4-D-Resistenz der Tripel- und Quadrupelmutante auf der Perzeptionsebene oder der Transportebene beruht, wurde der 2,4-D Methylester (2,4-DM) getestet, der im Gegensatz zu 2,4-D nicht auf einen Influxcarrier angewiesen ist, sondern die Plasmamembran aufgrund seiner höheren Lipophilie auch ohne einen Influxcarrier passieren kann. Der 2,4-D Methylester wird nach der Passage durch die Plasmamembran von Esterasen gespalten. Das dabei freigesetzte 2,4-D kann dann leicht an einen intrazellulären Auxinrezeptor binden.

Während die Applizierung von 1 μ M 2,4-D nur bei Col-0 Streckungswachstum auslösen kann, konnte bei Applizierung des 2,4-D Methylesters bei allen untersuchten Hypokotylsegmenten starkes Streckungswachstum beobachtet werden (Abb. 3.8). Im Falle des Wildtyps lag die maximale Streckung nach drei Stunden mit 12% noch weit über der Streckung mit 2,4-D (7,5%). Die Hypokotylsegmente der Tripelmutante wie auch die der Quadrupelmutante begannen sich nach der Zugabe des 2,4-D Methylesters stark zu strecken. Sie zeigten maximale Längenänderungen von 9,5% bzw. 11%. Sie streckten sich also fast genauso stark wie der Wildtyp. Interessant ist auch hier die Betrachtung der lag-Phase. Sie lag bei Anwendung des 1 μ M 2,4-D Methylesters auf den Wildtyp bei etwa 30 Minuten und ist damit etwas kürzer als bei Verwendung von 1 μ M 2,4-D. Die bisher bei IAA und 2,4-D festgestellten verlängerten lag-Phasen der Tripel- und Quadrupelmutante sind auch im Experiment mit dem 2,4-D Methylester wiederzufinden. Sie liegen bei der Tripelmutante wie auch bei der Quadrupelmutante bei 50 Minuten.

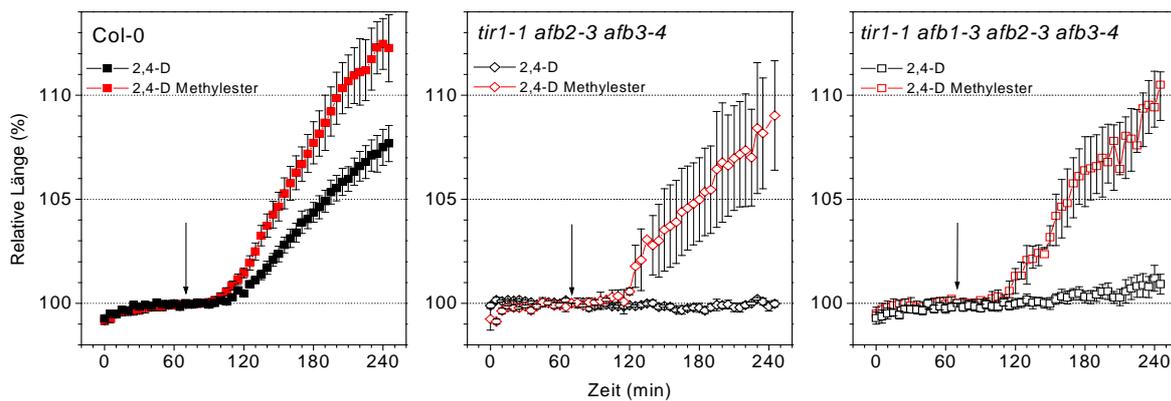


Abb. 3.8: Zeitverlauf des mit 2,4-D Methyl ester induzierten Streckungswachstums von *A. thaliana*-Hypokotylsegmenten im Vergleich zum 2,4-D induzierten Streckungswachstum. Darstellung: Col-0 (gefüllte Quadrate); Tripelmutante (offene Rauten); Quadrupelmutante (offene Quadrate). Die einzelnen Kurven repräsentieren gemittelte Werte aus mindestens 4 Einzelmessungen.

3.5 Detektion der auxininduzierten Genexpression mit Hilfe der *DR5::GFP*-Reportergentechnik

Diese Untersuchungen dienen der Beantwortung der Frage, inwiefern sich die Auxinbehandlung in *A. thaliana* auf die Expression auxininduzierter Gene in Wildtyp und Tripelmutante auswirkt und ob diese Genexpression mit dem Streckungswachstum korreliert. In *DR5::GFP*-Pflanzen wird das *GFP*-Gen unter die Kontrolle des synthetischen auxinsensitiven *DR5*-Promotors gestellt (Ulmasov *et al.* 1997a). Nach Auxinstimulation exprimieren diese Pflanzen das grün fluoreszierende Protein (GFP), welches sich photometrisch detektieren lässt. Somit ermöglicht dieses System die quantitative Messung der auxininduzierten Genexpression anhand der GFP-Fluoreszenz *in vivo*. Diese Fluoreszenz lässt sich in intakten Keimlingen schon vor der Zugabe exogenen Auxins in verschiedenen Bereichen detektieren, besonders in auxinreichen Geweben wie den Primärblättern und dem Wurzelmeristem.

Nach der Applizierung von 10 μM IAA auf *DR5rev::GFP*-Col-0-Keimlinge ergab sich zusätzlich zur Fluoreszenz in der Wurzelspitze eine zunehmende Fluoreszenz in der Streckungszone der Wurzel. Nach 250 Minuten stieg sie hier von ca. 330 ADU (Analog Digital Units) auf ca. 3400 ADU und erreichte nach 24 h ca. 12300 ADU. Auch nach der Behandlung mit 10 μM 2,4-D konnte diese Fluoreszenzzunahme in den Wurzeln intakter Keimlinge detektiert werden, allerdings in einem etwas kleineren Maße (360 ADU \rightarrow 2600 ADU \rightarrow 7200 ADU) (Abb. 3.9 oben).

Im Vergleich dazu konnte bei den ebenfalls mit dem *DR5rev::GFP*-Konstrukt versehenen Tripelmutantenkeimlingen zu keinem Zeitpunkt nach der IAA- oder 2,4-D-Behandlung eine signifikante Fluoreszenzsteigerung detektiert werden (Abb. 3.9 unten)

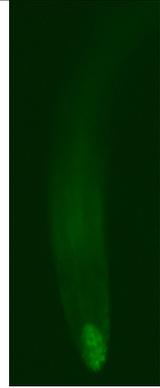
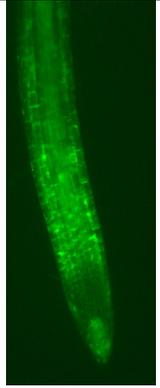
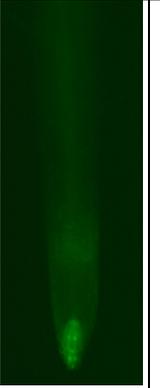
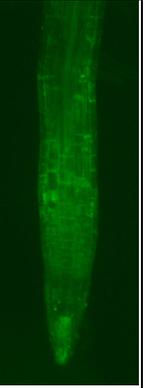
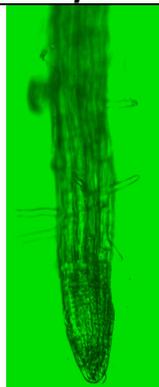
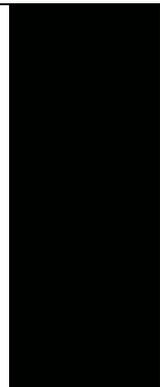
	IAA [10 μ M]			2,4-D [10 μ M]		
	0 min	250 min	24 h	0 min	250 min	24 h
Col-0	334	3398	12316	357	2604	7180
						
Tripel	297	-	450	272	178	476
						

Abb. 3.9: Zeitlicher Verlauf der GFP-Expression in Wurzeln 0 min, 4 h und 24 h nach IAA-Applizierung. Verglichen wird *DR5rev::GFP-Col-0* mit der mit dem *DR5rev::GFP* Konstrukt versehenen *tir1-1 afb2-1 afb3-1*-Mutante. Numerische Werte der Fluoreszenz werden in ADU (Analog Digital Units) angegeben.

Die mit dem *DR5rev::GFP*-Konstrukt versehenen Tripelmutanten wurden weiterhin auf ihre Fähigkeit zum Streckungswachstum untersucht. Sie zeigten nach der Applizierung von 10 μ M IAA sehr kräftiges Streckungswachstum (Abb. 3.10, A). Das Wachstum dieser Hypokotylsegmente übertraf das Wachstum von Col-0-Segmenten bei Weitem. Dies ist jedoch möglicherweise auf unterschiedliche genetische Hintergründe zurückzuführen. Die *DR5rev::GFP* Tripelmutante wurde nicht in den Ökotyp Columbia, sondern in Wassilewskija (Ws) eingebracht.

Es ließ sich jedoch feststellen, dass die Tripelmutante parallel zu der ausgeprägten Fähigkeit zu auxininduziertem Streckungswachstum eine stark reduzierte auxininduzierte Genexpression in den Hypokotylen zeigt (Abb. 3.10, B).

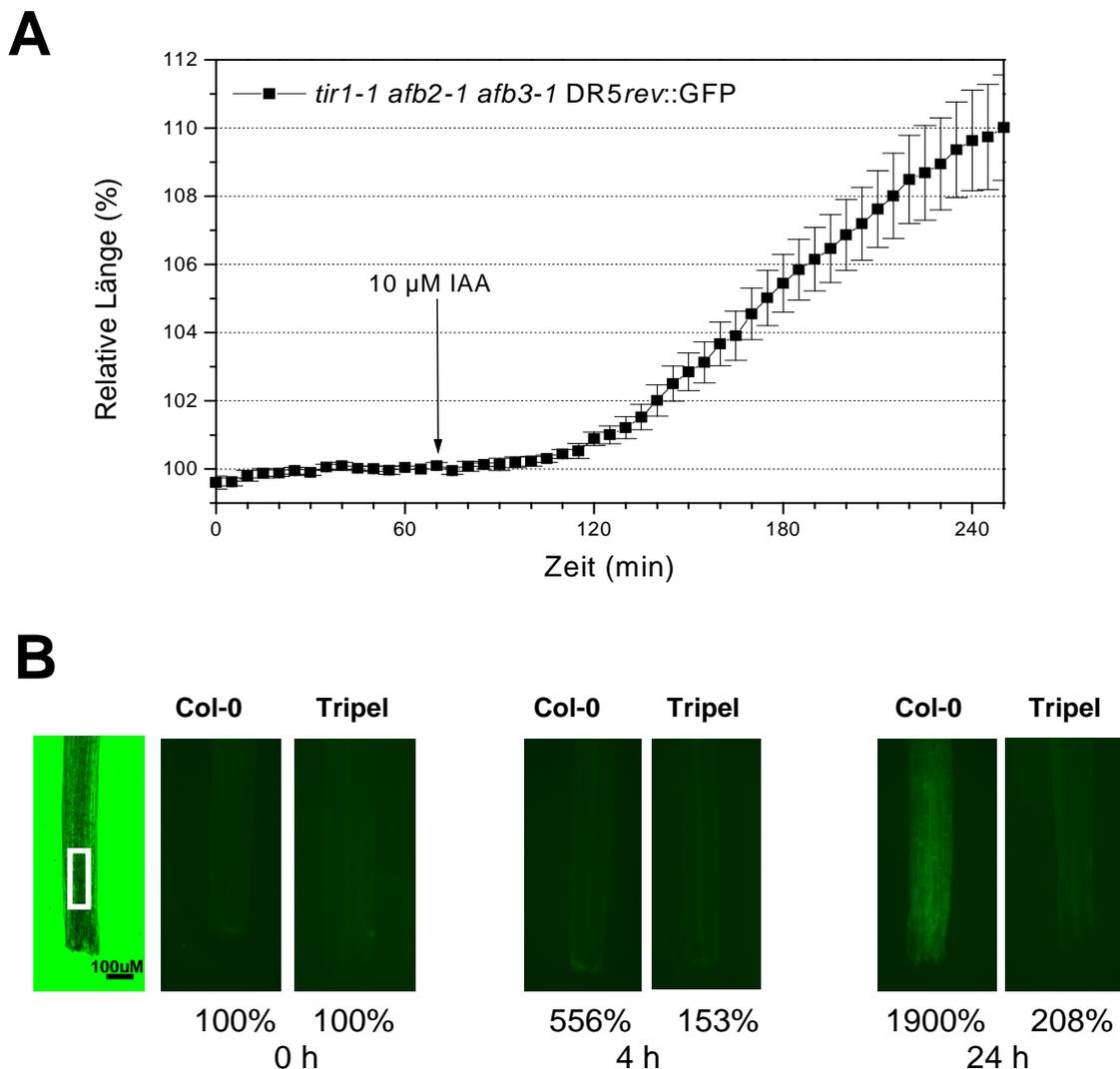


Abb. 3.10: Zeitverlauf des schnellen auxininduzierten Hypokotylwachstums der mit dem *DR5rev::GFP* Konstrukt versehenen *tir1-1 afb2-1 afb3-1*-Mutante (A). Zeitverlauf der GFP-Expression in Hypokotylsegmenten der gleichen Mutante im Vergleich zu *DR5rev::GFP* tragenden Col-0-Segmenten. Die Fluoreszenz zum Zeitpunkt 0 wurde gleich 100% gesetzt. Das weiße Rechteck zeigt die Messfläche für die photometrische Bestimmung der Fluoreszenzintensität an. Es liegt in der Streckungszone der Hypokotyle.

Die Zunahme der Fluoreszenz von *DR5rev::GFP-Col0* erreichte in Hypokotylsegmenten zwar nicht so hohe Werte wie in der Streckungszone der Wurzeln intakter Keimlinge, aber die Unterschiede zur *DR5rev::GFP-Tripelmutante* werden auch im Spross deutlich. Aus *DR5rev::GFP-Col-0* gewonnene Hypokotylsegmente versechsfachten ihre GFP-Fluoreszenz

4 h nach der IAA-Zugabe (10 μ M) und erreichten 24 h nach der Zugabe 19fach höhere GFP-Fluoreszenz. Die Tripelmutante hingegen zeigte auch bei der Untersuchung der Hypokotylsegmente kaum eine Zunahme der GFP-Fluoreszenz nach IAA-Zugabe und damit auch kaum auxininduzierte Genexpression.

3.6 Untersuchungen zur Klärung der verlängerten lag-Phase der Quadrupelmutante

Die gegenüber dem Wildtyp verlängerten lag-Phasen der Mehrfachmutanten nach Auxinzugabe zeigen sich bei allen verwendeten Hormonen und bei fast allen Konzentrationen. Prinzipiell sind sie das Hauptunterscheidungsmerkmal zwischen den Mehrfachmutanten und dem Wildtyp.

Die tatsächliche Erklärung für die verlängerte lag-Phase der Mehrfachmutanten könnte ein Schlüssel für die nach dem für das auxininduzierte schnelle Wachstum verantwortlichen Auxinrezeptor sein, da die Länge der lag-Phase einerseits durch die auxininduzierte Genexpression bestimmt werden könnte und andererseits durch die Aktivität bereits vorhandener Proteine nach der Auxinzugabe.

Um den Grund für die verlängerte lag-Phase zu finden, wurde in der vorliegenden Arbeit ein von der auxininduzierten Genexpression unabhängiges Experiment durchgeführt. Die Verwendung des Pilzgiftes Fusicoccin (FC) aus dem Pilz *Phomopsis amygdali* aktiviert direkt plasmamembranständige Protonenpumpen, indem es das 14-3-3-Protein irreversibel an diese bindet. Dadurch wird starkes säureinduziertes Wachstum hervorgerufen (Oecking *et al.* 1994).

3.6.1 Fusicoccin-induziertes Wachstum

Die Messungen ergaben, dass 1 μ M FC beim Wildtyp sofortiges Streckungswachstum ohne lag-Phase auslöste, wohingegen die Quadrupelmutante erst nach einer 20minütigen lag-Phase auf das Pilzgift reagierte. In Abb. 3.11 wird dieser Unterschied dokumentiert.

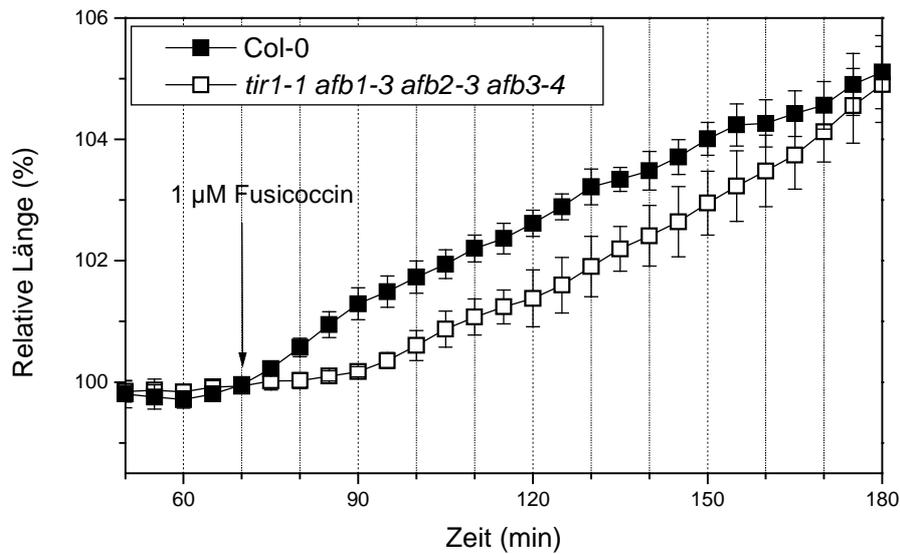


Abb. 3.11: Zeitverlauf des Streckungswachstum nach Applizierung von 1 μM FC auf Col-0- und Quadrupelmutanten-Hypokotylsegmente. Die einzelnen Kurven repräsentieren gemittelte Werte aus mindestens 5 Einzelmessungen

Zur Verdeutlichung der Bedeutung dieses Ergebnisses wird in Abb. 3.12 die lag-Phase der Quadrupelmutante im Vergleich zum Wildtyp bei allen eingesetzten Effektoren in den physiologischen Konzentrationen dargestellt.

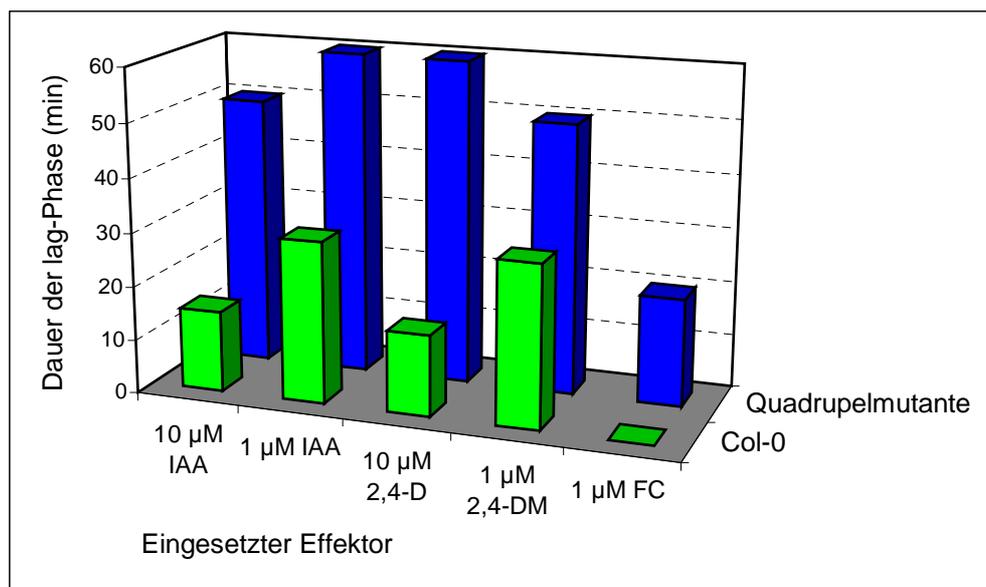


Abb. 3.12: Die Dauer der lag-Phase bei der Quadrupelmutante (blaue Säulen) im Vergleich zum Wildtyp (grüne Säulen) bei physiologischen Konzentrationen verschiedener Effektoren. 2,4-DM = 2,4-D Methyl ester.

In Abbildung 3.12 wird deutlich, dass die Quadrupelmutante grundsätzlich 20-35 Minuten länger als der Wildtyp für das Einsetzen des schnellen Streckungswachstums benötigt, unabhängig davon, ob der Effektor die Genexpression aktivieren kann oder nicht. Dies spricht für niedrigere Proteinlevel schon vor der Effektorapplizierung. Der übermäßig große Unterschied zwischen der Quadrupelmutante und dem Wildtyp bei Einsatz von 2,4-D liegt an der verminderten Auxintransportfähigkeit der Quadrupelmutante (siehe Abschnitt 3.4.1, Abb. 3.8)

3.7 Untersuchungen zur Rezeptorrolle von ABP1

3.7.1 Messungen zum Streckungswachstum der ABP1-Überexprimierer *C-myc-ABP1-ox 1-3* und *I-myc-ABP1-ox 3-7* im Vergleich zum Wildtyp Col-0

Da keine ABP1-Knockout-Pflanzen embryoletal sind und daher für physiologische Untersuchungen nicht zur Verfügung standen, wurden *A. thaliana*-ABP1-Überexprimierer in der vorliegenden Arbeit verwendet. Es handelt sich um transgene Pflanzen, in denen zum Einen überexprimiertes ABP1 mit einem C-terminalen c-myc-tag (*C-myc-ABP1-ox 1-3*) und zum Anderen mit einem internen c-myc-tag (*I-myc-ABP1-ox 3-7*) versehen ist. Sie wurden von Matthias Klode (AG Sauter, Universität Kiel) hergestellt und zur Verfügung gestellt.

Die durchgeführten Messungen dokumentieren die IAA-Antwort der hier verwendeten ABP1-Überexprimierer im Vergleich zum Wildtyp. Hypokotylsegmente der Überexprimierer *C-myc-ABP1-ox 1-3* (im folgenden *C1-3* genannt) und *I-myc-ABP1-ox 3-7* (im Folgenden *I3-7* genannt) zeigten ähnliche lag-Phasen wie der Wildtyp.

Bei der eingesetzten Dosis von 100 μM IAA wiesen alle Segmente lag-Phasen von 20-30 Minuten auf. Die maximale Streckung der Überexprimierer war gegenüber Col-0 jedoch stärker. Während die Wildtypsegmente in diesem Versuchsblock nur eine maximale Längenänderung von 5% erreichten, streckten sich die mit dem C-terminalen myc-tag versehenen ABP1-Überexprimierer um ca. 7% und die mit dem internen myc-tag versehenen ABP1-Überexprimierer sogar um ca. 8,5% (Abb. 3.13, A). Bei niedrigeren Konzentrationen reagierten die *I3-7*-Segmente ebenfalls etwas sensitiver als der Wildtyp. Sie zeigten gegenüber Col-0 eine kürzere lag-Phase (20 min) und streckten sich um maximal 6,5%. *C1-3*-Segmente reagierten mit einer lag-Phase von 25 min leicht verzögert gegenüber *I3-7*, aber immer noch deutlich schneller als der Wildtyp, der in diesem Versuchsblock ca. 40 Minuten bis zum Einsetzen des Wachstums benötigte. Die maximale Streckung von *C1-3* und Col-0

war hier in etwa gleich mit 5,5% bzw. 6% (Abb. 3.13, B). Bei der Applizierung von 1 μM IAA zeigten alle untersuchten Segmente ähnlich starkes Streckungswachstum. Die lag-Phasen aller Segmente variierten zwischen 30 und 40 Minuten und die maximale Streckung schwankte zwischen 3,5% und 5%. Interessanterweise zeigten die ABP1-Überexprimierer bei dieser Dosis leicht niedrigere maximale Längenänderungen als der Wildtyp (Abb. 3.13, C). Die Anwendung der niedrigsten Dosis IAA (0,1 μM) zeigte wieder das typische Bild: *I3-7* zeigte die höchste maximale Streckung mit ca. 3% Längenänderung, *C1-3* streckte sich um durchschnittlich 2% und der Wildtyp lediglich um ca. 0,5% (Abb. 3.13, D). Bei der sehr niedrigen Dosis von 0,1 μM IAA fällt ganz besonders der Effekt der ABP1-Überexpression auf. Der Wildtyp ist bei dieser IAA-Konzentration kaum zu Streckungswachstum in der Lage. Die ABP1-Überexpression führt zu einer Hypersensitivität der Pflanzen.

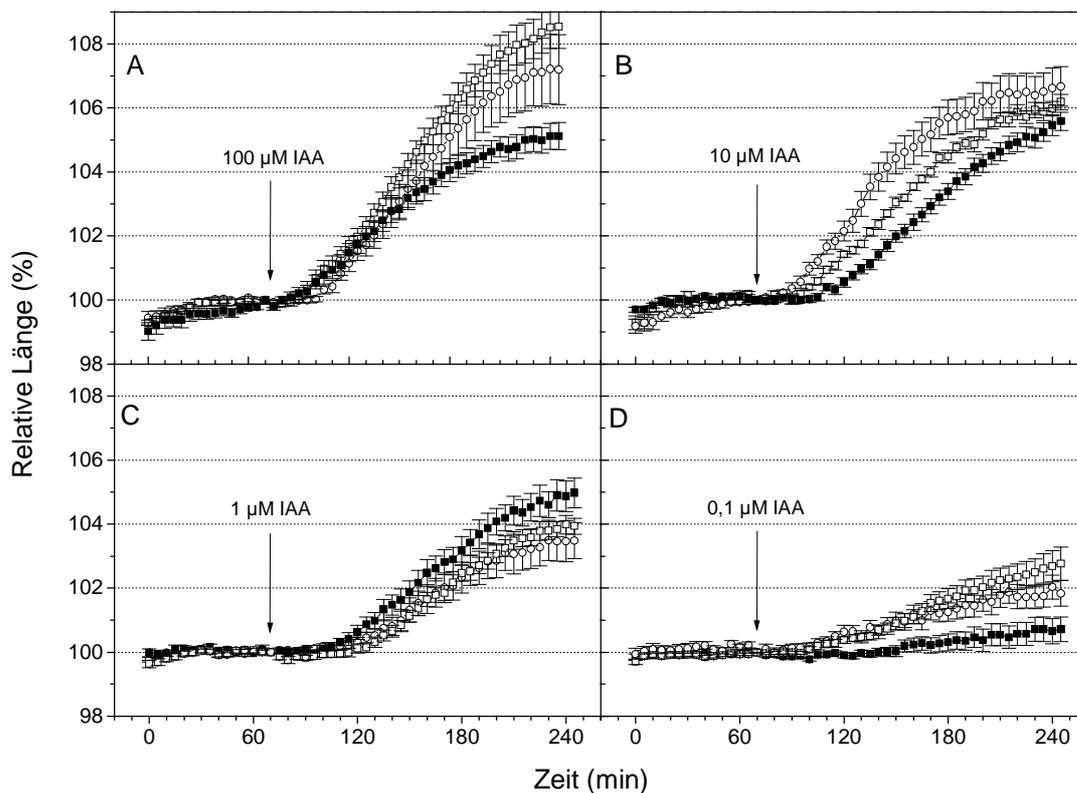


Abb. 3.13: Zeitverlauf des auxininduzierten Streckungswachstums von *A.-thaliana*-Hypokotylsegmenten nach der Zugabe verschiedener IAA-Konzentrationen. Darstellung: Col-0 (gefüllte Quadrate); *C-myc-ABP1-ox 1-3* (offene Kreise); *I-myc-ABP1-ox 3-7* (offene Quadrate). Die einzelnen Kurven repräsentieren gemittelte Werte aus mindestens 9 Einzelmessungen.

In Abb. 3.14 ist die maximale Streckung der Überexprimierer im Vergleich zum Wildtyp in Abhängigkeit von der IAA-Dosis aufgetragen. Auch hier wurden die Kurven nicht-linear gefittet, um die unterschiedliche Wachstumscharakteristik zu verdeutlichen (vergleiche auch Abb. 3.7). Bei den mittleren IAA-Dosen waren kaum Unterschiede zwischen Wildtyp und ABP1-Überexprimierern festzustellen. Bei der sehr niedrigen und der sehr hohen Dosis reagierten die ABP1-Überexprimierer mit deutlich größeren Längenänderungen als der Wildtyp.

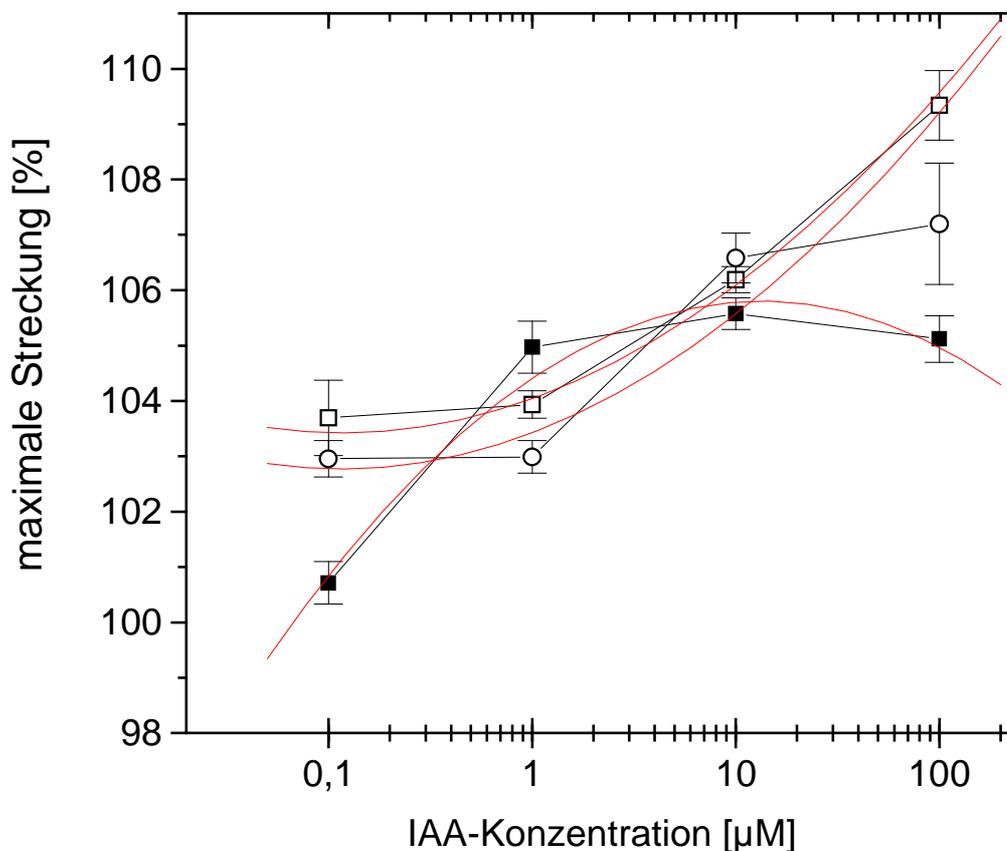


Abb. 3.14: Dosis-Wirkungskurven der ABP1-Überexprimierer und Col-0 in Abhängigkeit des verwendeten Hormons. Es wurden zusätzlich polynomische Ausgleichskurven eingezeichnet. Darstellung: Col-0 (gefüllte Quadrate); *I-cmyc-ABP1-ox 3-7* (offene Quadrate); *C-cmyc-ABP1-ox 1-3* (offene Kreise)

3.7.2 Messungen zum Streckungswachstum des ABP1-Überexprimierers *C-cmyc-EGFP-ox 1-14* im Vergleich zum Wildtyp Col-0

Der weiterhin untersuchte ABP1-Überexprimierer *C-cmyc-EGFP-ox 1-14* unterscheidet sich von den in Abschnitt 3.7.1 genannten Überexprimierern dadurch, dass hier ein ABP1-EGFP Fusionsprotein exprimiert wird. Demzufolge kann in dieser Mutante überexprimiertes ABP1 fluoreszenzmikroskopisch detektiert werden. Gleichzeitig ist davon auszugehen, dass das EGFP-ABP1-Fusionsprotein aufgrund der durch EGFP verursachten sterischen Störungen seine Funktion nicht mehr erfüllen kann.

Auch diese Mutante wurde von Matthias Klode (AG Sauter, Universität Kiel) hergestellt und zur Verfügung gestellt.

Tatsächlich reagierte *C-cmyc-EGFP-ox 1-14* bei der Messung des Streckungswachstums nach Zugabe der Dosen 1 μM und 0,1 μM IAA wildtypartig (Abb. 3.15).

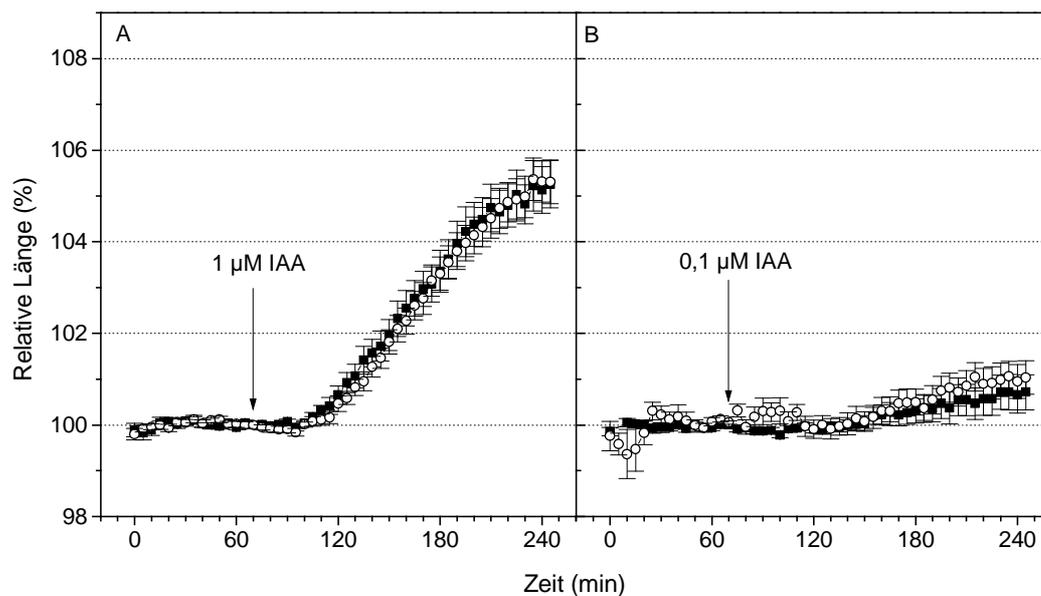


Abb. 3.15: Zeitverlauf des auxininduzierten Streckungswachstums von *A. thaliana*-Hypokotylsegmenten nach der Zugabe verschiedener IAA-Konzentrationen. Darstellung: Col-0 (gefüllte Quadrate); *C-cmyc-EGFP-ox 1-14* (offene Kreise); Die einzelnen Kurven repräsentieren gemittelte Werte aus mindestens 11 Einzelmessungen.

Diese Ergebnisse zeigen, dass das überexprimierte EGFP-ABP1-Fusionsprotein aus *C-cmyc-EGFP-ox 1-14* im Gegensatz zu dem in Abschnitt 3.7.1 untersuchten ABP1 aus *I-cmyc-ABP1-ox 3-7* und *C-cmyc-ABP1-ox 1-3* nicht funktionell ist.

3.8 Messungen zur ABP1-induzierten Genexpression auxininduzierter Gene

Zusätzlich zu den Untersuchungen über ABP1-induziertes Streckungswachstum wurde mit *DR5rev::GFP-Col0*-Protoplasten eine mögliche ABP1-induzierte Genexpression untersucht.

Protoplasten reagieren auf Auxine mit einer schnellen Volumenzunahme. Diese Reaktion kann auch mit synthetischen Oligopeptiden mit der C-terminalen Aminosäuresequenz von ABP1 ausgelöst werden (Steffens *et al.* 2001). Man geht davon aus, dass das Peptid durch Interaktion mit dem ABP1-Dockingprotein den ABP1-Signalweg aktivieren kann. In der vorliegenden Arbeit wurde diese Reaktion erneut untersucht, aber mit Protoplasten, die aus der transgenen *DR5rev::GFP-Col-0*-Linie aus *A. thaliana* hergestellt wurden. Daher konnte hier ein mögliches Signalling der C-terminalen Helix von ABP1 auf die Expression auxininduzierter Gene mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie parallel zur Schwellreaktion gezeigt werden. Es ergab sich, dass die untersuchten Protoplasten bei Applizierung des C-terminalen Peptids von ABP1 aus *A. thaliana* zwar eine Nettovolumenvergrößerung, nicht aber eine GFP-Anreicherung erfuhren. In Abb. 3.16 ist dokumentiert, dass eine Applizierung von 5 μ M IAA genauso wie die Applizierung des C-terminalen Peptids von ABP1 eine Nettovolumenvergrößerung in Protoplasten auslöste.

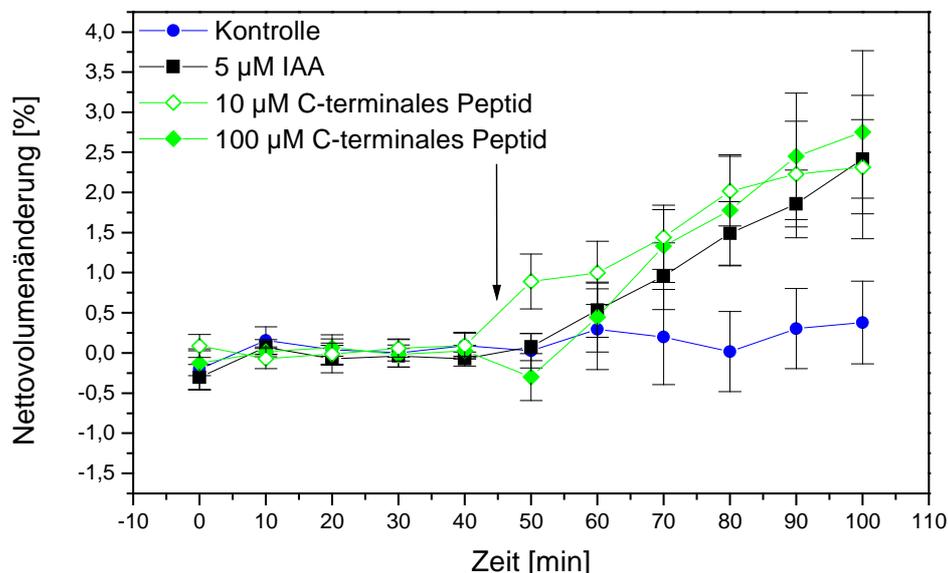


Abb. 3.16: Schwellreaktion von *DR5rev::GFP-Col-0*-Protoplasten nach Applizierung von IAA oder dem C-terminalen Peptid von ABP1 aus *A. thaliana*. Dargestellt sind Mittelwerte aus Experimenten mit mindestens 10 Einzelmessungen.

Im Falle der auxininduzierten Genexpression ließ sich auch in einzelnen Protoplasten eine signifikante Erhöhung der GFP-Fluoreszenz nach Zugabe von IAA detektieren (Abb. 3.17,A). Nach 12 Stunden hatte sich die Fluoreszenzintensität nach Zugabe von 10 μM IAA mehr als verdreifacht und hielt dann auch nach 24 Stunden dieses Level. Im Falle der hohen Konzentration von 100 μM IAA konnte sogar nach 24 h sogar eine Zunahme der GFP-Fluoreszenz auf das Fünffache des Ausgangswertes registriert werden. Das C-terminale Peptid von ABP1 löste im Gegensatz zu IAA aber keine Zunahme der GFP-Fluoreszenz aus, die Zellen fluoreszierten hier wie die unbehandelten Kontrollprotoplasten (Abb. 3.17, B).

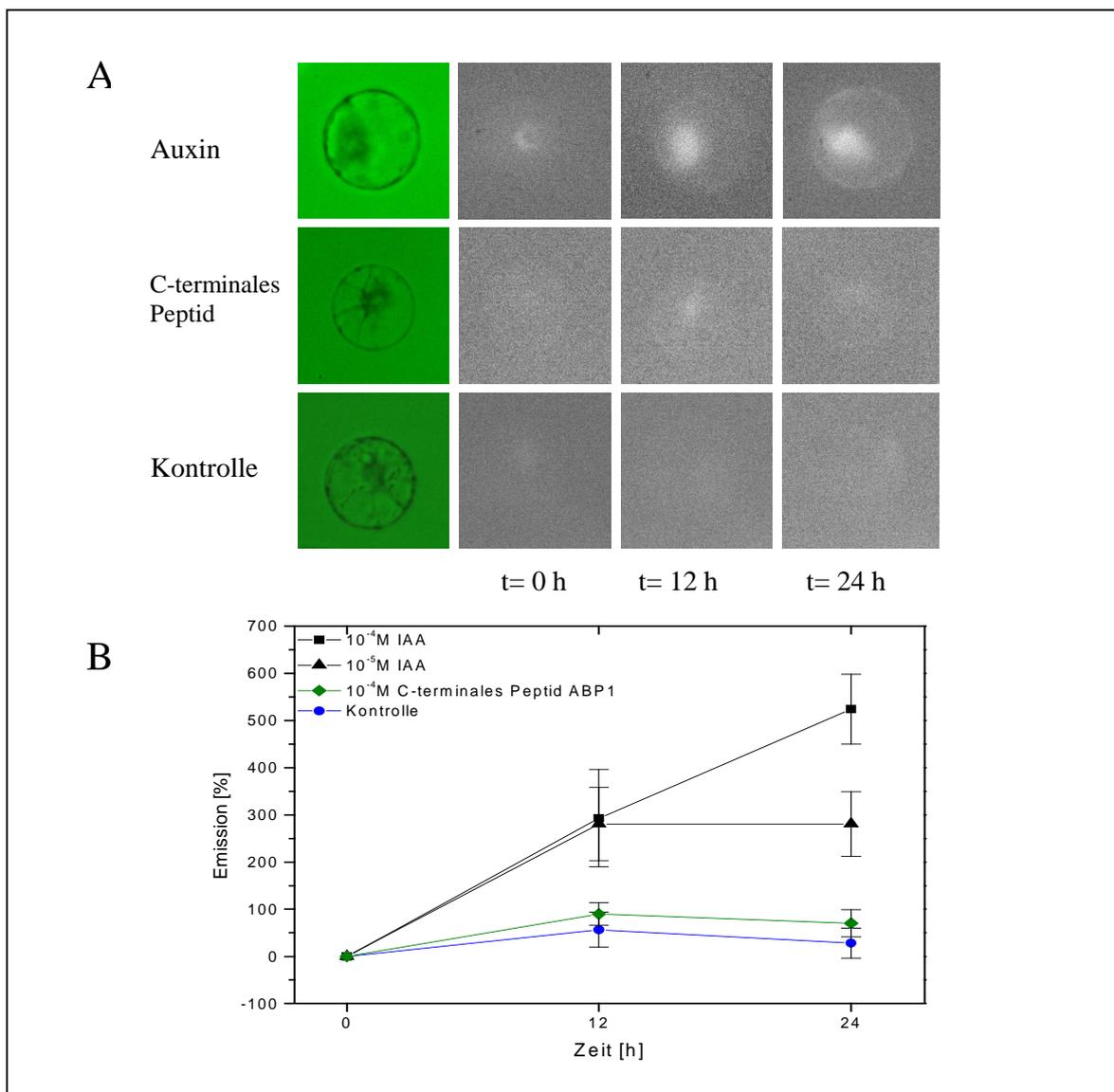


Abb. 3.17: Photometrische Messung der GFP-Fluoreszenz in *DR5rev::GFP-Col-0*-Protoplasten nach Applizierung von IAA oder dem C-terminalen Peptid von ABP1 aus *A. thaliana*. Die Fluoreszenz zum Zeitpunkt 0 wurde gleich 0% gesetzt. Die mittleren Pixelwerte zur Bestimmung der Fluoreszenz ergaben sich aus der Vermessung der gesamten Zelle. Dargestellt sind Mittelwerte aus Experimenten mit mindestens 9 Einzelmessungen.

Es konnte damit keine ABP1-induzierte Aktivierung des *DR5rev*-Promotors dokumentiert werden.

3.9 Aufreinigung eines ABP1-bindenden Proteins mittels

Affinitätschromatographie

Auf der Suche nach dem ABP1-bindenden Dockingprotein wurde mit Hilfe des C-terminalen Peptids von ABP1 eine Affinitätschromatographie durchgeführt. Membranproteinfraktionen bestehend aus der mikrosomalen Fraktion und der Plasmamembranfraktion wurden nach Solubilisierung mit Dodecylmaltosid auf die mit dem C-terminalen Peptid von ABP1 gekoppelte CNBr-Säule gegeben. Proteine, die nach Waschen an die Säule gebunden hatten, wurden mit einem NaCl-Gradienten eluiert. In Abb. 3.18 ist die UV-Absorption des durch die Säule geflossenen Plasmamembransolubilisats in Abhängigkeit von Elutionsvolumen und der NaCl-Konzentration im Elutionspuffer dargestellt. Die von der Säule bei 250 mM NaCl eluierten Proteine wurden in 1ml-Fractionen gesammelt und für die SDS-PAGE weiterverwendet. Entsprechend des Elutionsvolumens wurden die für die SDS-PAGE verwendeten Fraktionen 7, 18, 19, 20, 21, 22, 23 und 24 benannt.

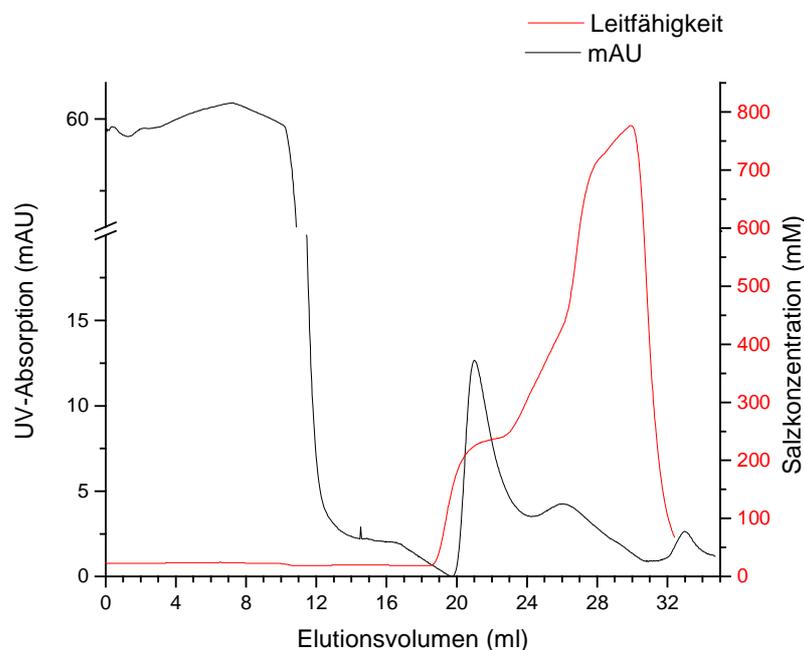


Abb. 3.18: Affinitätschromatographie der mit Dodecylmaltosid solubilisierten Plasmamembranfraktion von Maiskoleoptilen. Die schwarze Kurve zeigt die UV-Absorption des durch die Säule geflossenen Solubilisats, die rote Kurve die durch die NaCl-Konzentration bedingte Leitfähigkeit.

Es ergab sich, dass eine Reihe von Proteinbanden im SDS-Gel nach der Coomassie-Färbung zu erkennen waren, von denen die intensivsten Banden ausgeschnitten und für die ESI-MS-MS-Untersuchung weiterverwendet wurden. Dabei stellte sich heraus, dass mit der hier durchgeführten Affinitätschromatographie vermutlich nur unspezifisch Proteine aus der mikrosomalen Fraktion gebunden wurden. Nach der Sequenzanalyse konnten Peptidfragmente der mitochondrialen MDH und der F1-ATPase identifiziert werden (Abb. 3.19, rechts). Diese Proteine konnten auch in der Plasmamembranfraktion wiedergefunden werden, allerdings in abgereicherterem Maße. Es wurden lediglich zwei Proteinbanden stark im Eluat des PM-Solubilisats relativ zum Eluat der mikrosomalen Fraktion angereichert (Abb. 3.19, links, 23 kDa Jasmonsäure induziertes Protein Homolog).

Fraktion

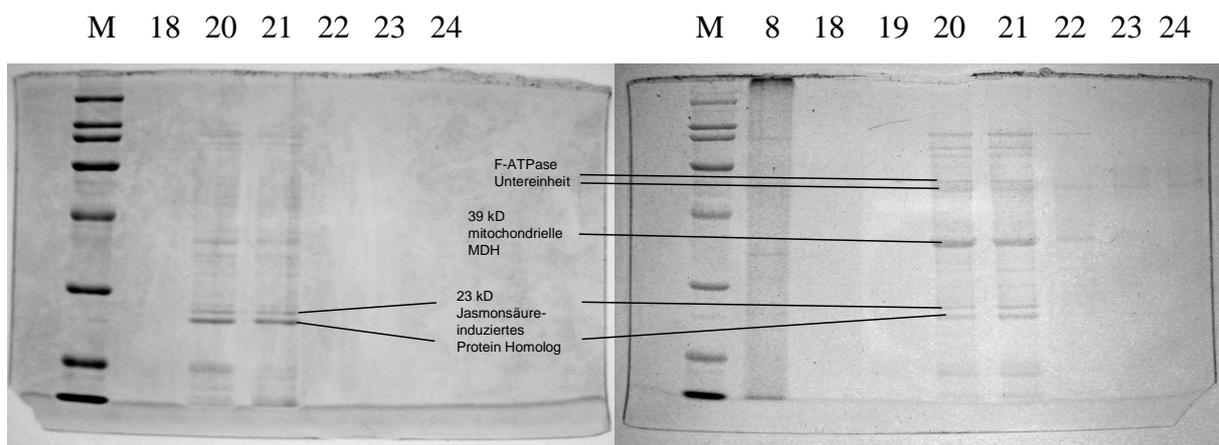


Abb. 3.19: Nach der FPLC-Affinitätschromatographie durchgeführte SDS-PAGE. Linke Seite: Eluat der Affinitätschromatographie mit Plasmamembranfraktionen. Rechte Seite: Eluat der Affinitätschromatographie mit der mikrosomalen Fraktion.

Die aus der massenspektroskopischen Untersuchung gewonnenen Peptidsequenzen der ersten Bande (Abb. 3.19 links, obere Bande) lauteten: DFVVAWYIPWDNIPTR und AYTEIGSENYFK

Nach Recherche in den zur Verfügung stehenden Datenbanken konnten die beiden Peptidsequenzen in dem folgenden Protein aus *Zea mays* gefunden werden. Sie sind blau bzw. rot markiert.

[gb|ACF85057.1|](#) unknown [Zea mays]
 mspfgavitpetlkymskyqgreitqvdcareamrlihaedknlkaedsawelkkkfgng
 vstmvlvynatgaslsldvddgkdwmgsvysspipdtfhngqwiaflhvkpgslaggsqaa
 rvfrgrdvdgrtrdfvvawyipwdniprotrayteigsenyfktrwssvktslghsrrvtra
 kdencastvsiggyttafciaavlqhgfqplpeere

Dieses aus 215 Aminosäuren bestehende Protein hat ein berechnetes Molekulargewicht von 23,6 kDa. Mit Hilfe des Broad Range Markers wurde hingegen aus der Position der Proteinbande ein Molekulargewicht von 27,1 kDa ermittelt. Aus der Datenbank lässt sich für dieses Protein zunächst keine Information über die Funktion ermitteln.

Die zweite im Gel markierte Bande (Abb. 3.19 links, untere Bande) wurde ebenfalls Massenspektrometrisch untersucht. Hier konnte ein Peptid mit der Sequenz DFAMAWSTPWGASK identifiziert werden.

Auch hier wurde in den Datenbanken nach Übereinstimmungen gesucht. In einem hypothetischen Protein wurde die exakte Peptidsequenz gefunden.

```
>18697.m000021 | AZM5_84678 | conserved hypothetical protein
MANCFGDIVDNYKLDTMPRYVGKTKTXEDRAREASYLNNENEKSKKAKDYVNMLKDWYGN
GASTLCVIYNQTTGGTLRYIDDKDWLGYPGPTPYXTEIGNGQWASFLHVHKTGAASGMAA
VVYRGKDGGGSEDFAMAWSTPWGASKNRAYCEIGSVGSFQSQWDKLYTNLNKAGYTTNA
SSTHSSISAATAKGSSPDFKAYVKIPYSA*
```

Auch zu diesem Protein sind bisher keine Funktionen bekannt. Es hat eine Länge von 210 Aminosäuren, daraus ergibt sich ein theoretisches Molekulargewicht von 23,1 kDa. Das mit dem Broad range marker aus der SDS-PAGE ermittelte Molekulargewicht beträgt demgegenüber 25,1 kDa.

Die beiden hier identifizierten Proteine haben eine hohe Homologie, wie eine Alignmentuntersuchung mit dem Programm LALIGN zeigt:

```
41.8% identity in 177 aa overlap (4-180:5-180); score: 468 E(10000):
2.5e-40
```

```

      10      20      30      40      50      60
Bande1 FGAVITPETLKYMSKYQGREITQVDCAREAMRLIHAEDKNLKAEDSAWELKKKFGNGVST
      :: ..   :  :  :: :.  :  :  ::::  :  .  .:::  :::  .  ::  .:::..::
Bande2 FGDIVDNYKLDTMPRYVGKTKTXEDRAREASYLNNENEKSKKAKDYVNMLKDWYNGAST
      10      20      30      40      50      60
```

```

          70          80          90          100          110          120
Bande1 MVLVYNATGASLSLVDDGKDWMGSVYSSPIPDTFHNGQWIAFLHVKPGSLAQGSQAARVF
      . . . . . : : : . . . : : : : : . : . : : : . : : : . : : : : : : .
Bande2 LCVIYNQTGGTLRYIDD-KDWLGYPPGTPYXTEIGNGQWASFLHVHKTGAASGSMAAVVY
          70          80          90          100          110          120

          130          140          150          160          170          180
Bande1 RGRDVDGRTDRDFVVAWYIIPWDNIPTRAYTEIGSENYFKTRWSSVKTSLGHSRRVTRA
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
Bande2 RGKDGGGSEKDFAMAWSTPWGASKNRAYCEIGSVGSFQSQWDKLYTNLNKAGYTTNA
          130          140          150          160          170          180

```

Es ist davon auszugehen, dass es sich hierbei um Isoformen handelt.

Beide hier entdeckten Proteinsequenzen wurden auf Homologe im Pflanzenreich untersucht, indem BLASTs durchgeführt wurden. Es wurden homologe Proteine nur in Reis, Gerste und *Chlamydomonas reinhardtii* gefunden. Eines der Homologe, das 23 kDa Jasmonsäure-induzierte Protein (JIP-23) aus Gerste ist dabei etwas besser charakterisiert. Es handelt sich um ein Protein, welches durch Jasmonsäure bei osmotischem Stress induziert wird (Hause *et al.* 1996).

Es wurden jedoch keinerlei Homologe zu diesem Protein in *A. thaliana* gefunden, was dagegen spricht, dass es sich bei dem identifizierten Protein um das gesuchte Dockingprotein handelt.

4. Diskussion

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die funktionelle Charakterisierung der Auxinrezeptoren TIR1/AFB sowie ABP1. Zentraler Teil der Arbeit war die Aufklärung der Bedeutung beider Rezeptoren für das schnelle auxininduzierte Streckungswachstum höherer Pflanzen.

4.1 Untersuchungen zum schnellen auxininduzierten Streckungswachstum

Dharmasiri et al. 2005 stellten bei der Tripel- und Quadrupelmutante eine Resistenz gegen 2,4-D fest. Als Parameter nutzten diese Autoren die Hemmung des Wurzelwachstums. Eine ähnliche Hemmung des Wurzelwachstums fanden Schenck *et al.* (2009, eingereicht, im Anhang). Allerdings wurden diese Messungen erst nach 5 Tagen ausgewertet, so dass eine schnelle Wachstumsreaktion hier nicht erfasst wird. Die Expression einer kaum überschaubaren Zahl von Genen (siehe Overvoorde *et al* 2005, supplementary data) wird durch TIR1 / die AFBs gesteuert, so dass davon auszugehen ist, dass der Vierfachknockout dieses Auxinrezeptors zu schweren Defekten in der Entwicklung der gesamten Pflanze führt. Diese Entwicklungsstörung konnte bei der Nachzucht der Quadrupel- und Tripelmutante am Phänotyp festgestellt werden (Abb. 3.4). Die Messung der Wurzellänge der einer F-Box-Knockoutmutante nach 5 Tagen kann daher keine Aussagen über die Auxinperzeption und das Signalling für das schnelle Streckungswachstum liefern, sondern nur die Entwicklungsstörung der gesamten Pflanze aufzeigen.

Die in der vorliegenden Arbeit angewendete Methode zur Messung des auxininduzierten Streckungswachstums hat sich als sehr empfindlich herausgestellt. Mit ihr wurden hier erstmals die Auswirkungen der Knockouts der F-Box-Kernrezeptoren wie auch der ABP1-Überexpression auf das **schnelle Streckungswachstum** dokumentiert. Die Methode erlaubt daher eindeutige Rückschlüsse auf die Funktion der hier untersuchten Auxinrezeptoren.

4.1.1 Vermitteln TIR1/AFB direkt das schnelle auxininduzierte Streckungswachstum?

Alle Untersuchungen zu den F-Box-Einzelmutanten wie auch zu den F-Box-Mehrfachmutanten sprechen dafür, dass die kernlokalisierten Auxinrezeptoren nicht direkt für das schnelle Streckungswachstum verantwortlich sind. Im Folgenden gehe ich auf die Gründe für diese Aussage ein.

4.1.1.1 TIR1/AFB-Knockoutmutanten sind nicht resistent gegen das natürliche Auxin IAA

Alle Knockoutmutanten sind bei physiologischen IAA-Konzentrationen zu fast wildtypartigem Streckungswachstum in der Lage. Durch die Experimente mit den F-Box-Einzelmutanten konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass nicht ein bestimmtes F-Box-Protein (TIR1, AFB1, AFB2 oder AFB3) für die Vermittlung des Streckungswachstums notwendig ist: alle untersuchten Einzelmutanten zeigten keine Resistenz gegen IAA (Abb. 3.2).

Aber auch die wahrscheinliche Redundanz der hier untersuchten F-Box-Proteine betrifft nicht die Fähigkeit zum Streckungswachstum: wie in Abbildung 3.5 zu erkennen ist, zeigen die untersuchten Mehrfachmutanten *tir1-1 afb2-3 afb3-4* (Tripelmutante) sowie *tir1-1 afb1-3 afb2-3 afb3-4* (Quadrupelmutante) 180 Minuten nach der IAA-Applizierung die gleiche maximale Streckung wie der Wildtyp. Es konnte in einigen Fällen eine leichte Reduktion der maximalen Streckung (um 2%) beobachtet werden (siehe Abb. 3.5 C). Dies liegt aber am reduzierten Auxintransport in den Mehrfachmutanten, nicht aber an einer reduzierten Auxinperzeption (siehe folgender Abschnitt).

4.1.1.2 Die beobachtete Resistenz der Tripel- und Quadrupelmutante insbesondere gegenüber dem synthetischen Auxin 2,4-D beruht auf einer Störung der Auxinaufnahme

In der vorliegenden Arbeit wurde festgestellt, dass die Tripel- und Quadrupelmutante eine Resistenz gegen 2,4-D zeigen, wohingegen die F-Box-Einzelmutanten keine ausgeprägte Resistenz aufweisen (Abb. 3.3 und 3.6) In diesem Fall scheint sich also eine Redundanz der F-Box-Proteine auf die Reaktion der Hypokotylsegmente auszuwirken. Die unterschiedliche Wirkung von 2,4-D und IAA wird besonders in Abbildung 3.7 deutlich. Die maximale Streckung der Tripel- und Quadrupelmutante ist bei Anwendung von IAA dem Wildtyp bei jeder verwendeten Dosis sehr ähnlich, bei 2,4-D aber bei den niedrigen Dosen von (0,1 bis 10 μ M) extrem herabgesetzt.

Der ausgeprägte Unterschied zwischen der Wirkung von 2,4-D und IAA zeigt sich auch bei der Hemmung des Wurzelwachstums im Langzeitversuch (Schenk *et al.* 2009, eingereicht) Zwei denkbare Modelle erklären die differenzielle Wirkung der beiden Auxine:

a) 2,4-D bindet hauptsächlich die hier ausgeschalteten Rezeptoren aber im Gegensatz zu IAA nicht an die in der Tripel- und Quadrupelmutante noch aktiven F-Box-Proteine.

b) In der Tripel- oder Quadrupelmutante ist die Aufnahme von 2,4-D, nicht aber von IAA, aufgrund der verminderten auxininduzierten Genexpression vermindert.

Tatsächlich unterscheidet sich die Aufnahme von 2,4-D deutlich von der des natürlichen Auxins. IAA kann leichter als 2,4-D durch Diffusion der freien Säure in die Hypokotylzellen eindringen, 2,4-D hingegen muss fast ausschließlich über Influxcarrier aufgenommen werden. Dies liegt an der sehr niedrigen Säurekonstante von 2,4-D: aufgrund seines pK_s -Werts von 2,6 liegt 2,4-D bei pH-Werten um 6 (dem im Versuch verwendeten pH-Wert der Inkubationslösung) nur zu 0,04 % in nicht dissoziierter Form vor. In ionisierter Form kann 2,4-D die PM aber nicht passieren. In den Mehrfachmutanten muss die Expression der Auxin-Influxcarrier AUX1 und LAX3 stark reduziert sein (Swarup *et al.* 2008, Overvoorde *et al.* 2005), was die Aufnahme von 2,4-D stark vermindern würde.

Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde in der vorliegenden Arbeit 2,4-D-Methylester eingesetzt. Aufgrund seiner sehr hohen Membranpermeabilität kann der Methylester auch unabhängig von Auxininfluxcarriern die Membran sehr gut passieren, und nach Spaltung durch Esterasen freies 2,4-D in der Zelle freisetzen, das defekte Carriersystem der Mehrfachmutanten somit umgehen. Tatsächlich löste 2,4-D ME auch in der Quadrupelmutante ein sehr kräftiges, wildtypartiges Wachstum aus (Abb. 3.8). Somit kann davon ausgegangen werden, dass die Resistenz der Mehrfachmutanten gegen 2,4-D nur auf dem Fehlen der Auxinaufnahmecarriern (z.B. AUX1 und LAX3) beruht. Die auxininduzierte Expression der Influxcarriergene wird über die auxinbindenden F-Box-Proteine vermittelt und ist daher bei multiplem Knockout dieser Rezeptorgene stark eingeschränkt.

Im Gegensatz zu 2,4-D liegt IAA mit einem pK_s -Wert von 4,75 bei pH 6 zu 5,6% als Säure vor. Die membranpermeable Säureform von IAA liegt also über mindestens 100fach konzentrierter als die Säureform von 2,4-D bei gleicher Gesamthormonkonzentration vor. Daher kann IAA in der Quadrupel- und Tripelmutante bei niedrigen Dosen auch ohne Influxcarrier in die Zellen eindringen, seine Wirkung entfalten und fast wildtypartiges Streckungswachstum induzieren. Das Fehlen der Influxcarrier äußert sich in diesem Fall nur bei Verwendung einer niedrigen IAA-Konzentration (1 μ M) mit einer um 2% niedrigeren Längenänderung der Quadrupelmutante.

Zusammenfassend lässt sich aus den in der vorliegenden Arbeit gezeigten Daten folgern, dass der drei- und vierfache Knockout der F-Box-Auxinrezeptoren hauptsächlich den Auxintransport, aber nicht das auxininduzierte Streckungswachstum stören. Diese Daten lassen den Schluss zu, dass die ausgeschalteten Rezeptoren die eigentliche schnelle Wachstumsreaktion nicht direkt auslösen.

4.1.1.3 Das schnelle auxininduzierte Wachstum korreliert nicht linear mit der auxininduzierten Genexpression.

Die Ergebnisse zur auxininduzierten GFP-Expression der *DR5rev::GFP*-Pflanzen im Wildtyphintergrund und der *DR5rev::GFP*-Tripelmutante visualisieren, dass die auxininduzierte Genexpression in der *DR5rev::GFP*-Tripelmutante gegenüber *DR5rev::GFP* Col-0 sehr stark reduziert ist. Ganz besonders auffällig ist dieser Effekt in den Streckungszonen von Wurzeln intakter Keimlinge: *DR5rev::GFP* Col-0 reagiert 4 h nach der IAA-Applizierung mit einer Verzehnfachung der Fluoreszenz und nach 24 h gar mit einer Zunahme um den Faktor 370. Ähnliche, nur leicht niedrigere Größenordnungen findet man auch bei Verwendung von 2,4-D wieder (Abb. 3.9). In der *DR5rev::GFP*-Tripelmutante werden solche Fluoreszenzwerte nicht mal annähernd erreicht. Hier konnte selbst 24 h nach der Auxinzugabe nur eine Erhöhung der Fluoreszenz um den Faktor 1,5 festgestellt werden.

Auch die Messung der Fluoreszenz in Hypokotylsegmenten zeigte solch starke Unterschiede zwischen Wildtyp und Tripelmutante: während bei *DR5rev::GFP* Col-0 4 Stunden nach der Applizierung von 10 μ M IAA die GFP-Fluoreszenz im geschnittenen Hypokotyl etwa sechsfach, und 24 h nach der Applizierung etwa 19fach ansteigt, kann bei der *DR5rev::GFP*-Tripelmutante nach 4 Stunden nur eine 1,5fache und nach 24 Stunden nur eine 2fache Erhöhung detektiert werden (3.10B).

Der stark eingeschränkten Genexpression der mit dem *DR5rev::GFP*-Konstrukt versehenen Tripelmutante steht ein sehr kräftiges IAA-induziertes schnelles Streckungswachstum gegenüber, das Col-0 sogar übertrifft (vgl. Abb. 3.10A und 3.1). Dass die *DR5rev::GFP*-Tripelmutante Col-0 im Streckungswachstum sogar übertrifft, muss darauf zurückgeführt werden, dass hier nicht die gleichen genetischen Hintergründe eingesetzt werden. Somit ist die Intensität des Streckungswachstums nicht direkt vergleichbar.

Trotz der unterschiedlichen hier eingesetzten Wildtyphintergründe zeigen die Ergebnisse zur IAA-induzierten Genexpression in der *DR5rev::GFP*-Tripelmutante, dass die Genexpression nicht mit der Fähigkeit zum auxininduzierten Streckungswachstum korreliert. Dies wiederum

spricht dafür, dass die auxininduzierte Genexpression nicht direkt das schnelle Streckungswachstum steuert. Sollte es einen Zusammenhang geben, wäre dieser extrem nichtlinear.

4.1.1.4 Die Verlängerung der lag-Phase der Quadrupelmutante

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals die lag-Phase der schnellen Wachstumsreaktion bei den Tripel- und Quadrupel-Mutanten erfasst werden. Insbesondere die Quadrupelmutante erwies sich zwar nicht als auxinresistent, aber die Auxinreaktionen waren in diesen Pflanzen deutlich verzögert. Wieder lassen sich zwei Erklärungen finden:

a) verzögerte Expression wachstumsrelevanter Gene

Ein wachstumslimitierendes Genprodukt eines auxininduzierten Gens akkumuliert nach der Auxinapplizierung aufgrund der gezeigten verminderten Genexpression in den Mutanten langsamer als im Wildtyp.

b) niedrigere Level wachstumsrelevanter Proteine

Wesentliche wachstumsrelevante Genprodukte stehen unter Auxinkontrolle und sind aufgrund des Heranwachsens mit gestörter auxininduzierter Genexpression in den Mutanten nur in verminderten Mengen vorhanden, so dass bei der Aktivierung der Genprodukte nach Auxinapplizierung mehr Zeit für die Aufweichung der Zellwand benötigt wird.

Um zwischen beiden Modellen unterscheiden zu können, wurden Experimente mit dem Pilztoxin Fusicoccin durchgeführt. Die Wirkungsmechanismen von FC sind sehr gut bekannt (Oecking *et al.* 1994, Borch *et al.* 2002). FC stabilisiert die Bindung eines 14-3-3-Proteins an die PM-H⁺-ATPase und stimuliert sie durch Aufhebung der C-terminalen Autoinhibition irreversibel. Die resultierende Ansäuerung der Zellwand verursacht dann eine Aufweichung der Zellwand und ein Wachstum, dessen Amplitude der des auxininduzierten Wachstums entspricht. Die wachstumsfördernde Wirkung von FC ist also unabhängig von der auxininduzierten Genexpression und von der Wirkung der F-Box-Rezeptoren.

In der vorliegenden Arbeit reagierten Hypokotyle der Quadrupelmutante auf eine FC-Applizierung sehr viel langsamer als der Wildtyp mit Streckungswachstum. Im Wildtyp setzte die Wirkung des Toxins sofort ein, während in der Quadrupelmutante eine lag-Phase von 20 Minuten registriert wurde (Abb. 3.11). Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass die

Verlängerung der lag-Phase kein auxinspezifisches Phänomen ist. Der Befund ist mit der Vorstellung vereinbar, dass die Quadrupelmutante schon vor der Effektorzugabe über niedrigere Level der für das Streckungswachstum nötigen Proteine verfügt, da sie ja mit einer stark verminderten Expression auxininduzierter Gene herangewachsen sind. Es muss davon ausgegangen werden, dass der für das FC-induzierte Streckungswachstum nötige „Satz“ von Proteinen (z.B. H⁺-ATPase, Kaliuminfluxkanäle, Expansine (Hager 2003, Tode und Lüthen 2001, Cosgrove und Li 1993) in der Quadrupelmutante zumindest zum Teil in reduzierter Quantität vorliegt und so eine längere lag-Phase verursacht. Dennoch muss diese niedrigere Quantität aber bereits für ein sehr kräftiges Streckungswachstum ausreichen, denn die Amplitude des FC-induzierten Streckungswachstums ist wildtypartig.

Der niedrigere Proteinlevel wirkt sich natürlich auch bei der Applizierung von Auxinen auf das Streckungswachstum aus: die Verlängerung der lag-Phase der Quadrupelmutante bei Verwendung von FC tritt in einer ähnlichen Größenordnung wie die Verlängerung der lag-Phase bei Verwendung von IAA oder 2,4-D auf (Abb. 3.12). Die verlängerte lag-Phase eines Quadrupelmutantenhypokotyls ist demnach schon **vor** der Auxinzugabe festgelegt. Sie kann aufgrund der FC-Daten nicht mit einer reduzierten Genexpression **nach** der Auxinzugabe erklärt werden. Auch diese Ergebnisse passen daher mit der These, dass TIR1/AFB nicht direkt das Streckungswachstum über die Genexpression induzieren, zusammen.

4.1.1.5 Zusammenfassung zum schnellen Streckungswachstum der F-Box-Mutanten

In der vorliegenden Arbeit konnten die Unterschiede der F-Box-Mutanten zum Wildtyp im Streckungswachstum an verschiedenen Kenngrößen festgestellt werden. Die Gründe für diese Unterschiede konnten ebenfalls aufgezeigt werden:

1. Die 2,4-D-Resistenz der Tripel- und Quadrupelmutante und die nur leicht abgeschwächte Antwort auf IAA beruht auf reduzierter Auxinaufnahme-Fähigkeit der Mehrfachmutanten, nicht aber auf einer generellen Auxinresistenz.
2. Die auxininduzierte Genexpression korreliert nicht linear mit dem Streckungswachstum.
3. Die Verlängerung der lag-Phase der Quadrupelmutante beruht auf schon vor der Effektorzugabe vorhandenen geringeren Proteinleveln der für das Streckungswachstum nötigen Proteine

Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass TIR1 / AFB1 / AFB2 / AFB3 nicht die eigentliche Auslösung des schnellen Streckungswachstums vermitteln, sondern nur für die Rahmenbedingungen (Auxintransport, Proteinausstattung) verantwortlich sind.

4.1.1.6 Könnten die verbliebenen AFB-Proteine im Kern das schnelle auxininduzierte Streckungswachstum direkt vermitteln?

Es besteht die Möglichkeit, dass die in der Tripel- und Quadrupelmutante verbliebenen AFBs (AFB1, AFB4, AFB5 in der Tripelmutante, AFB4 und AFB5 in der Quadrupelmutante) als Teil eines redundanten Systems immer noch ausreichen, um durch ihre Genexpression das schnelle Streckungswachstum direkt zu vermitteln. Aufgrund der in Abschnitt 4.1.1.5 genannten Punkte ist es aber sehr unwahrscheinlich. Diese Annahme würde voraussetzen, dass die Genexpression das Streckungswachstum überhaupt nicht linear steuert. Die sehr stark reduzierte Genexpression der Tripelmutante würde in diesem Fall immer noch für sehr starkes Streckungswachstum genügen.

Aufgrund des Habitus der Mehrfachmutanten ist aber zu sagen, dass sich die Dreifach- und Vierfachknockouts der Gene TIR1, AFB1, AFB2 und AFB3 sehr stark auf die Entwicklung der Pflanzen auswirken (Dharmasiri *et al.* 2005b). Sie sind ausgewachsen sehr viel kleiner als der Wildtyp und besitzen weniger Seitenwurzeln (Abb. 3.4). Schon bei der Keimung sind 70% der Pflanzen nicht in der Lage, Wurzeln und Hypokotyle auszubilden. Dies spricht dagegen, dass AFB4 und 5 die Funktion von TIR1 sowie AFB1, 2 und 3 vollständig ersetzen können. Bei der Fluoreszenzmessung der auxininduzierten Genexpression in der *DR5rev::GFP tir1-1 afb2-1 afb3-1* Mutante zeigt sich ja auch genau diese Tatsache (Abb. 3.9 und 3.10B).

Auch das stark reduzierte Vermögen der Tripel- und Quadrupelmutante zum Auxintransport sowie die verlängerte lag-Phase bei FC-Applizierung sprechen dafür, dass sich das Fehlen von vier von sechs F-Box-Auxinrezeptoren auf das Proteom der Pflanzen auswirkt.

Dass die Drei- und Vierfachmutanten trotz sehr stark verringerter auxininduzierter Genexpression, einer verringerten Ausstattung mit Auxintransportproteinen und wachstumsrelevanten Proteinen sowie stark in ihrer Entwicklung eingeschränkten Keimlingen dann aufgrund der übriggebliebenen F-Box-Rezeptoren noch zu wildtypartigem Streckungswachstum fähig sind, ist eher unwahrscheinlich. Eine einfachere Erklärung für die Fähigkeit zum Streckungswachstum der Mehrfachmutanten wäre die, dass es von einem

anderen Auxinrezeptor vermittelt wird, der in den hier getesteten F-Box-Mutanten völlig intakt ist.

4.1.2 ABP1-Überexprimierer sind auxinhypersensitiv

Die Untersuchungen zu den kernlokalisierten F-Box-Proteinen TIR1, AFB1, AFB2 und AFB3 ergaben, dass diese Proteine nicht für die eigentliche Auslösung des auxininduzierten schnellen Streckungswachstums verantwortlich sind. Für die Vermittlung der Primärantwort kommt nun noch ABP1 in Frage (Christian *et al.* 2006). Da für die Messungen des Streckungswachstums aufgrund der Embryoletalität (Chen 2001) keine ABP1-Knockout-Pflanze zur Verfügung stand, wurde auf drei ABP1-Überexprimierer zurückgegriffen, die aus einer Kooperation mit Matthias Klode und Bianka Steffens aus der Arbeitsgruppe Sauter (Universität Kiel) zur Verfügung standen. Die Messungen des Streckungswachstums ergab eine Auxinhypersensitivität der ABP1-Überexprimierer *C-myc-ABP1-ox 1-3* und *I-myc-ABP1-ox 3-7* im Vergleich zum Wildtyp Col-0 (Abb. 3.13 und 3.14). Bei der sehr niedrigen Dosis von 0,1 μM IAA und der sehr hohen Dosis von 100 μM zeigten die ABP1-Überexprimierer deutlich größere Längenänderungen als der Wildtyp. Bei den mittleren IAA-Dosen (1 μM und 10 μM) reagierten die Überexprimierer mit ähnlichem Streckungswachstum wie der Wildtyp. Bei Betrachtung der Dosis-Wirkungskurve (Abb. 3.14) zeigt sich aber, dass das maximale Streckungswachstum der ABP1-Überexprimierer insgesamt gegenüber dem Wildtyp erhöht ist. Diese Ergebnisse sprechen sehr dafür, dass hier zusätzliches funktionsfähiges ABP1 für ein zusätzliches Vermögen zum Streckungswachstum verantwortlich ist. Die Ergebnisse werden durch die Kontrollexperimente mit dem ABP1-EGFP-Fusionsprotein unterstützt: *C-myc-EGFP-ox 1-14*-Pflanzen reagieren auf Auxin insgesamt ähnlich wie der Wildtyp. Dieses Resultat deutet darauf hin, dass das EGFP-ABP1-Fusionsprotein nicht als Auxinrezeptor funktionell ist und seine Expression daher keine Hypersensitivität bewirken kann. (Abb. 3.15). Somit zeigt dieses Kontrollexperiment gut, dass die Hypersensitivität der Überexprimierer tatsächlich auf funktionalem ABP1 basiert. Insgesamt deuten die Ergebnisse der Untersuchungen der ABP1-Überexprimierer darauf hin, dass ABP1 an der Auslösung des Streckungswachstums direkt beteiligt ist.

4.1.2.1 Könnte ABP1 das schnelle auxininduzierte Streckungswachstum direkt vermitteln?

Die Antwort auf diese Frage lautet eindeutig: ja. In der vorliegenden Arbeit konnte erstmalig ein direkter Zusammenhang zwischen ABP1 und der Primärantwort der Pflanze auf IAA festgestellt werden. Die in vorhergehenden an Protoplasten durchgeführten Experimente

zeigten, dass ABP1 Prozesse wie Hyperpolarisierung (Barbier-Brygoo *et al.* 1989), Protoplastenschwellung (Steffens *et al.* 2001) sowie Aktivierung der plasmamembranständigen H⁺-ATPase (Rück *et al.* 1993) direkt vermittelt. Mit Hilfe der hier gezeigten Versuche können diese schnellen durch ABP1 vermittelten Vorgänge an der Plasmamembran in direkte Verbindung mit dem Streckungswachstum gebracht werden. Diese Verbindung wurde von mir auch bereits in Versuchen mit der Tomatenmutante *diageotropica* aufgezeigt, allerdings nur indirekt (Christian *et al.* 2003) Siehe Einleitung, Abschnitt 1.6.2).

Leider ist die Signaltransduktion von ABP1 immer noch nicht aufgeklärt. Dieser Schritt wäre sehr wichtig, um die Funktion von ABP1 genau zu verstehen, aber es ist sehr wahrscheinlich, dass ABP1 die Funktion des Signalgebers für die Auslösung des Streckungswachstums in der Pflanze übernimmt.

4.2 ABP1 induziert keine auxininduzierte Genexpression

Die Experimente mit ABP1-Überexprimierern in der vorliegenden Arbeit zeigen, dass ABP1 direkt das Streckungswachstum fördert. Weiterhin vermittelt ABP1 die Schwellreaktion von Protoplasten (Steffens *et al.* 2001, Christian *et al.* 2003). Unbeantwortet blieb bisher die Frage, ob ABP1 auch die auxininduzierte Genexpression vermitteln könnte. Mit den zur Verfügung stehenden *A. thaliana* *DR5rev::GFP-Col-0* –Pflanzen konnte getestet werden, ob ABP1 Teil eines Signalweges ist, der die auxininduzierte GFP-Expression über den *DR5rev*-Promotor vermittelt.

Es ergab sich, dass das hier applizierte C-terminale Peptid von ABP1 wie IAA die Schwellreaktion in *DR5rev::GFP Col-0* –Protoplasten auslösen konnte. Im Gegensatz dazu ließ sich nur bei Zugabe von IAA in *DR5rev::GFP-Col-0*-Protoplasten, nicht aber bei Zugabe des C-terminalen Peptids, eine GFP-Expression detektieren (Abb. 3.16 und 3.17). Somit kann davon ausgegangen werden, dass sich die Funktion von ABP1 auf die Initiierung des Streckungswachstums (bzw. der Protoplastenschwellung) beschränkt. Zumindest die Expression von Genen über den synthetischen *DR5rev*-Promotor wird nicht durch ABP1 induziert.

Braun *et al.* 2008 detektierten allerdings schon einen Zusammenhang zwischen ABP1 und der auxininduzierten Genexpression. Bei konditionaler Repression von ABP1 in *A. thaliana* konnte direkt darauf folgend eine Reduktion mehrerer AUX/IAA-Transkripte beobachtet. Diese Ergebnisse deuten auf einen Crosstalk von ABP1 und TIR1/AFB hin. Möglicherweise fungiert ABP1 als negativer Regulator der auxininduzierten Genexpression. Es ist nach wie vor nicht bekannt, wie der Crosstalk zwischen ABP1 und TIR1 aussehen könnte.

4.3 Ein ABP1-bindendes Plasmamembranprotein gemäß der Dockingprotein-Hypothese konnte nicht gefunden werden

Es konnte in der vorliegenden Arbeit kein Protein aus der PM gefunden werden, das ein möglicher Kandidat für das Dockingprotein sein könnte. Die hier durchgeführte Affinitätschromatographie erwies sich als nicht spezifisch oder empfindlich genug, um ein Membranprotein zu isolieren, das als Dockingprotein in die Signaltransduktion von ABP1 involviert ist.

Bei den in der vorliegenden Arbeit aufgereinigten Proteinen handelt es sich zum einen um mitochondriale Proteine (mitochondriale MDH und F-ATPase) und zum anderen um ein Protein mit einer hohen Homologie zum Protein JIP-23 aus Gerste. JIP-23 scheint nach Hause *et al.* (1996) um ein durch Jasmonsäure und osmotischen Stress induziertes Protein. Bei den mitochondrialen Proteinen handelt es sich vermutlich um unspezifisch an die Säule gebundene Proteine. Auch das JIP-23-Homologe wurde vermutlich nur durch unspezifische Interaktion mit der CNBr-Säule gebunden. Es ist mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht das gesuchte Dockingprotein, da keine Homologe zum identifizierten 23kD-Protein in *A. thaliana* vorhanden sind. Da aber ABP1 aus Mais und *A. thaliana* eine hohe Homologie aufweisen, ist zu erwarten, dass ABP1-Bindeprotein in beiden Systemen ebenfalls mit einer hohen Homologie vorhanden ist. Somit bleibt das Dockingprotein im Dunkeln.

4.4 Ein möglicher Signalweg von ABP1

Neben der Feststellung, dass ABP1 das Streckungswachstum direkt vermittelt, konnte in der vorliegenden Arbeit auch ein wichtiger Hinweis für den Ort der Auxinbindung aufgezeigt werden. So zeigen die Versuche mit den F-Box-Mehrfachmutanten, dass diese aufgrund der reduzierten auxininduzierten Genexpression Defekte bei der Auxinaufnahme in die Zelle haben (Siehe Ergebnisse, Abschnitt 3.4 und Diskussion Abschnitt 4.1.1.2), was sich auf das Vermögen dieser Pflanzen zu 2,4-D-induziertem Streckungswachstum auswirkt. Dieses Ergebnis setzt voraus, dass der Auxinrezeptor für das schnelle Streckungswachstum das Hormon **intrazellulär** bindet. Dies bestätigt frühere physiologische Befunde (Vesper & Kuss 1990, Claussen et al. 1996). Wenn man unterstellt, dass ABP1 dieser Auxinrezeptor ist, muss davon ausgegangen werden, dass ABP1 tatsächlich im Golgi oder ER Auxin bindet.

Nun ergibt sich aus dem vorhandenen Wissen über die Lokalisation, Auxinbindung und dem Wirkort von ABP1 in Verbindung mit den Ergebnissen dieser Arbeit ein Bild von ABP1, das vermutlich im Golgi Auxine bindet, durch eine Konformationsänderung sein KDEL-Motiv

maskiert und so an die Außenseite der Plasmamembran sekretiert wird. Dort würde vorhandenes ABP1 sein Signal an andere Proteine weitergeben und letztlich die Aufweichung der Zellwand bewirken. In Abbildung 4.1 ist ein Modell für diesen möglichen Signalweg dargestellt. Dieser Signalweg von ABP1 wurde schon von Henderson *et al.* (1997) vermutet, allerdings konnte eine erhöhte Sekretion von ABP1 nach Auxinapplizierung in einem Insektenzellen-Baculovirus-Expressionssystem nicht gezeigt werden. Auch in einem von Tian *et al.* 1995 angewendeten Expressionssystem, in dem ABP1 in COS7-Zellen (Nierenzellen der grünen Meerkatze) exprimiert wurde, konnte keine ABP1-Sekretion nach Auxinapplizierung beobachtet werden. Möglicherweise ist ein Expressionssystem aus Insektenzellen oder Säugetier-Nierenzellen zur Messung der ABP1-Sekretion aber nicht geeignet, da unter Umständen ein Carrier für den Transport des Auxins in das ER vonnöten ist. Wenn dem so ist, könnte im ER von tierischen Zellen lokalisiertes ABP1 aufgrund fehlender Carrier nicht in Kontakt mit Auxin kommen.

Tatsächlich konnte ein Auxincarrier im ER von Pflanzen gefunden werden (PIN8, Jiri Friml, pers. komm.), der das in Abb. 4.1 dargestellte Modell unterstützt und die nicht stattfindende ABP1-Sekretion in tierischen Expressionssystemen erklären könnte. Zwar ist der pH-Wert im ER mit ca. 7,0 sehr ungünstig für die Auxinbindung (Tian *et al.* 1995), allerdings ist im Golgi bei einem pH-Wert um 6,5 (Kim *et al.* 1998) schon eine Auxinbindung möglich.

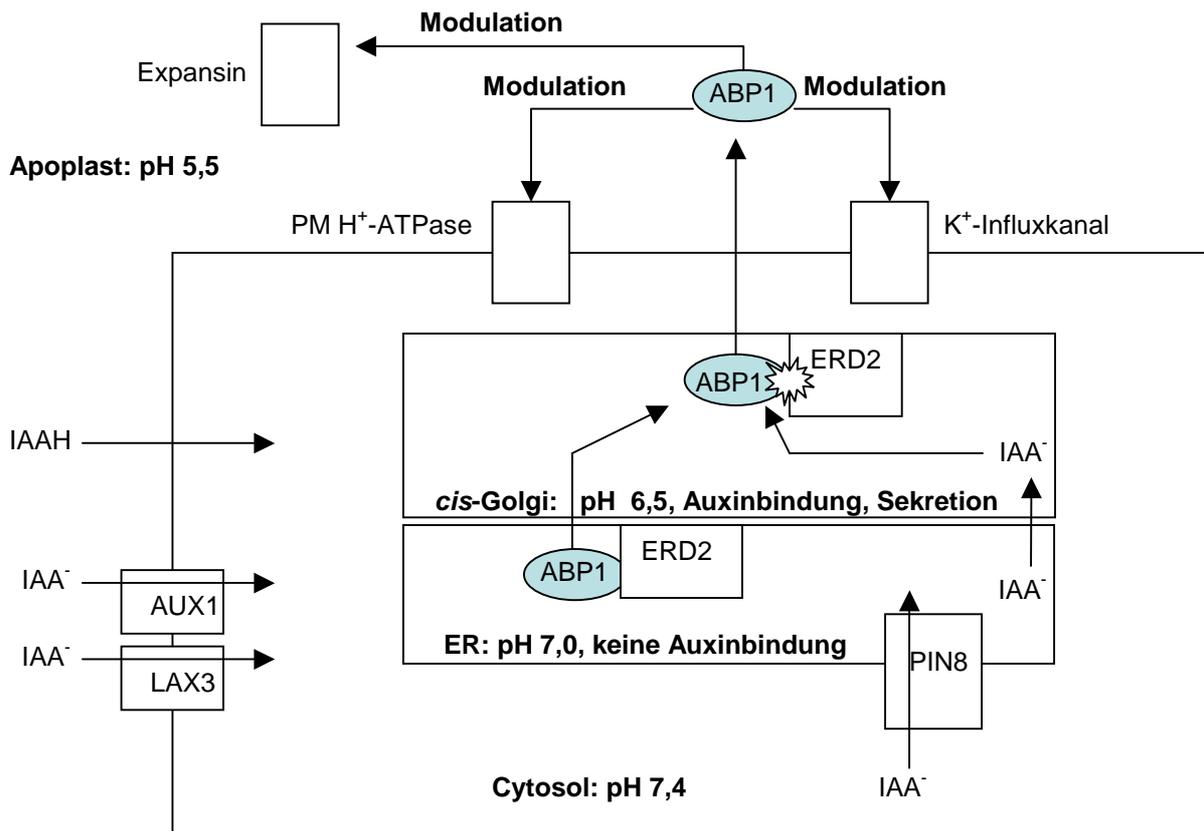


Abb. 4.1: Modell des ABP1-Signalweges. IAA gelangt über Auxin-Influxcarrier (AUX1, LAX3) oder direkt über die PM in die Zelle. IAA wird über PIN8 weiter in das ER transportiert, wo es aufgrund des dort herrschenden pH-Werts von ca. 7,0 nicht durch ABP1 gebunden wird. Im cis-Golgi bindet ABP1 IAA und wird nach einer Konformationsänderung, bei der das ER-Retentionssignal maskiert wird, in den Apoplasten sekretiert. Dort moduliert es die Aktivität wachstumsrelevanter Proteine.

Interessant bei der Betrachtung der Sekretion von ABP1 ist auch das Bindeverhalten des KDEL-Rezeptors ERD2. Seine optimale Fähigkeit zur Bindung der C-terminalen Helix von ABP1 liegt im Sauren (ca. pH5) und bei pH6,5 noch bei etwa 20% des Optimums. Insofern herrschen im *cis*-Golgi Bedingungen, bei denen Auxin wie auch ERD2 nicht besonders gut an ABP1 binden. Eine sehr feine Regulation der Retention bzw. Sekretion von ABP1 könnte durch die Auxinkonzentration im ER oder Golgi gesteuert werden und damit auch das Streckungswachstum, welches durch extrazelluläres ABP1 vermittelt werden könnte.

An der PM könnte ABP1 an Membranproteine binden, was nach den beobachteten durch ABP1 vermittelten Reaktionen von Protoplasten wahrscheinlich ist. Aber auch ein alternativer Signalweg von ABP1 ist möglich: Shimomura konnte 2006 mit einer Photoaffinity-crosslinking-Studie einen möglichen Bindepartner von ABP1 identifizieren, nämlich das GPI-

verankerte Protein SKU5. Dieses Protein gehört zu einer Familie von Kupferoxidasen zu denen auch die Ascorbatoxidase sowie die Laccasen gehören. SKU5 ist wie ABP1 auf der Außenseite der Plasmamembran lokalisiert, des Weiteren auch in der Zellwand. Möglicherweise liegt die Funktion von SKU5 darin, die Zellwand zu modifizieren und damit das turgogetriebene Streckungswachstum zu fördern, oder die Eigenschaften der Mittellamelle zu verändern, damit die Zellen sich streckender Gewebe aneinander vorbeigleiten können (Sedbrook *et al.* 2002).

Die Hyperpolarisation, der Protonenflux und die Volumenveränderungen von Protoplasten, die über ABP1 vermittelt werden, passen allerdings nicht direkt mit dem möglichen Signalling von SKU5 zusammen. Diese Reaktionen erfordern die Aktivierung von transmembranen Proteinen der Plasmamembran. Daher bleibt trotz der Photoaffinity-Crosslinking-Studien von Shimomura die Dockingproteinhypothese ein möglicher Signalweg von ABP1.

4.5 Fazit

In der vorliegenden Arbeit wurden die Auxinrezeptoren ABP1 sowie TIR1 und seine Homologe, die AFBs charakterisiert. Es wurde festgestellt, dass TIR1/AFB über die auxininduzierte Genexpression zwar die Entwicklung der Pflanze steuern, nicht aber das schnelle Streckungswachstum direkt auslösen. Diese Aufgabe fällt ABP1 zu. Leider konnte ein mit ABP1 interagierendes Protein in dieser Arbeit nicht gefunden werden. Ob ABP1 tatsächlich an ein Dockingprotein, SKU5 oder weitere Proteine bindet, muss in zukünftigen Arbeiten untersucht werden. Somit konnte zwar erstmals die direkte Bedeutung von ABP1 für das schnelle Streckungswachstum bestätigt werden, die genaue Signaltransduktion dieses Auxinrezeptors bleibt aber unklar.

5. LITERATUR

- Abel S., Oeller P.W., Theologis A. (1994) Early auxin-induced genes encode short-live nuclear proteins. PNAS; 91: 326-330
- Abel S., Nguyen M.D., Theologis A. (1995) The PS-IAA4/5-like family of early auxin-inducible mRNAs in *Arabidopsis thaliana*. J Mol Biol; 251(4):533-49.
- Arango M, Gévaudant F, Oufattole M, Boutry M. (2003) The plasma membrane proton pump ATPase: the significance of gene subfamilies. Planta; 216(3):355-65.
- Batt S., Wilkins M.B, Venis M.A. (1976) Auxin Binding to Corn Coleoptile Membranes: Kinetics and Specificity. Planta; 130: 7-13
- Bertosa B., Kojić-Prodić B., Wade R.C., Tomić S. (2008) Mechanism of auxin interaction with Auxin Binding Protein (ABP1): a molecular dynamics simulation study. Biophys J.; 94(1):27-37
- Benková E., Michniewicz M., Sauer M., Teichmann T., Seifertová D., Jürgens G., Friml J. (2003) Local, efflux-dependent auxin gradients as a common module for plant organ formation. Cell; 115(5):591-602
- Braun N., Wyrzykowska J., Muller P., David K., Couch D., Perrot-Rechenmann C., Fleming A.J. (2008) Conditional Repression of AUXIN BINDING PROTEIN1 Reveals That It Coordinates Cell Division and Cell Expansion during Postembryonic Shoot Development in *Arabidopsis* and Tobacco. Plant Cell. [Epub ahead of print]
- Borch J., Bych K., Roepstorff P., Palmgren M.G., Fuglsang A.T. (2002) Phosphorylation-independent interaction between 14-3-3 protein and the plant plasma membrane H⁺-ATPase. Biochem Soc Trans.; 30(4): 411-5
- Chen J.G. (2001) ABP1 is required for organized cell elongation and division in *Arabidopsis* embryogenesis. Genes Dev.; 15 (7): 902-11

-
- Christian M., Steffens B., Schenck D., Burmester S., Böttger M., Lüthen H. (2006) How does auxin enhance cell elongation? Roles of auxin-binding proteins and potassium channels in growth control. *Plant Biol (Stuttg.)*; 8(3): 346-52
- Christian M., Steffens B., Schenck D., Lüthen H. (2003) The *diageotropica* mutation of tomato disrupts a signalling chain using extracellular auxin binding protein 1 as a receptor. *Planta*; 218: 309-314
- Claussen M., Lüthen H., Blatt M., Böttger M. (1997) Auxin-induced growth and its linkage to potassium channels. *Planta* 201: 227-234
- Clough S.J., Bent A.F. (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.*; 16(6): 735-43
- Cosgrove D.J. (1999) Enzymes and other agents that enhance cell wall extensibility. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*; 50: 391-417
- Cosgrove D.J., Li Z.C. (1993) Role of Expansin in Cell Enlargement of Oat Coleoptiles (Analysis of Developmental Gradients and Photocontrol). *Plant Physiol.*; 103(4): 1321-1328
- Cross J.W., Briggs W.R. (1978) Properties of a Solubilized Microsomal Auxin-binding Protein from Coleoptiles and Primary Leaves of *Zea mays*. *Plant Physiol*; 62(1):152-157.
- Dharmasiri N., Dharmasiri S., Estelle M. (2005a) The F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature*; 435: 441 - 445
- Dharmasiri N, Dharmasiri S, Weijers D, Lechner E, Yamada M, Hobbie L, Ehrismann JS, Jürgens G, Estelle M. (2005b) Plant development is regulated by a family of auxin receptor F box proteins. *Dev Cell.*; 9 (1): 109-19
- Diekmann W., Venis M.A., Robinson D.G. (1995) Auxins induce clustering of the auxin-binding protein at the surface of maize coleoptile protoplasts. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 92 (8): 3425-3429

-
- Dohrmann U., Hertel R., Kowalik H. (1978) Properties of auxin binding sites in different subcellular fractions from maize coleoptiles. *Planta*; 140: 97-106
- Van Duijn B., Heimovaara-Dijkstra S. (1993) Intracellular microelectrode membrane potential measurement in tobacco cell-suspension protoplasts and barley aleurone protoplasts: interpretation and artifacts. *Biochimica et Biophysica Acta*; 1193 (1994): 77-84
- Felle H., Peters W., Palme K. (1991) The electrical response of maize to auxins. *Biochimica et Biophysica Acta*; 1064: 199-204
- Fricker M.D., White N.S., Thiel G., Millner P., Blatt M.R. (1994) Peptides derived from the auxin binding protein elevate Ca^{2+} and pH in stomatal guard cells of *Vicia faba*: a confocal fluorescence ratio imaging study. *Symp Soc Exp Biol.*;48:215-28.
- Fuchs I., Philippar K., Hedrich R. (2006) Ion channels meet auxin action. *Plant Biol* 8 (3): 353-359
- Gee M., Hagen G., Guilfoyle T.J. (1991) Tissue-Specific and Organ-Specific Expression of Soybean Auxin-Responsive Transcripts GH3 and SAURs. *Plant Cell*; (3): 419-430
- Guilfoyle J.T., Hagen G. (2007) Auxin response factors. *Current Opinion in Plant Biology*; 10:453-460
- Guilfoyle T, Hagen G, Ulmasov T, Murfett J. (1998) How Does Auxin Turn On Genes? *Plant Physiol.* 118: 341-347
- Hagen G., Guilfoyle T. (2002) Auxin-responsive gene expression: genes, promoters and regulatory Factors. *Plant Molecular Biology* 49: 373–385
- Hagen G., Kleinschmidt A., Guilfoyle T. (1984) Auxin-regulated gene expression in intact soybean hypocotyl and excised hypocotyl sections. *Planta*; 162 (2): 147-153

-
- Hager A. (2003) Role of the plasma membrane H⁺-ATPase in auxin-induced elongation growth: historical and new aspects. *J Plant Res.*; 116(6):483-505
- Hager A., Debus G., Edel H.-G., Stransky H., Serrano R. (1991) Auxin induces exocytosis and the rapid synthesis of a high-turnover pool of plasma-membrane H⁺-ATPase. *Planta*; 185:527-537
- Harper J.F., Manney L., DeWitt N.D., Yoo M.H., Sussman M.R. (1990) The *Arabidopsis thaliana* plasma membrane H⁽⁺⁾-ATPase multigene family. Genomic sequence and expression of a third isoform. *J Biol Chem*; 265(23):13601-8.
- Henderson J., Baulry J.M., Ashford D.A., Oliver S.C., Hawes C.R., Lazarus C.M., Venis M.A., Napier R.M. (1997) Retention of maize auxin-binding protein in the endoplasmatic reticulum: quantifying the escape and the role of auxin. *Planta*; 202(3):313-23
- Hause B., Demus U., Teichmann C., Parthier B., Wasternack C. (1996) Developmental and Tissue-Specific Expression of JIP-23, a Jasmonate-Inducible Protein of Barley. *Plant Cell Physiol.*; 37 (5):641-649
- Hertel R., Thomson K.S., Russo V.E.A. (1972) In vitro auxin binding to particulate Fractions from corn coleoptiles. *Planta*; 107: 325-240
- Jones A.M., Im K.H., Savka M.A., Wu M.J., DeWitt N.G., Shillito R., Binns A.N. (1998) Auxin-Dependent Cell Expansion Mediated by Overexpressed Auxin-Binding Protein 1. *Science*; 282: 1114-1117
- Karimi M., Inze D., Depicker A., (2002) Gateway vectors for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Trends Plant Sci.*; 7(5): 193-195
- Kepinski S, Leyser O. (2005) The *Arabidopsis* F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature*; 435: 446 - 451

-
- Kim J.H., Ludger J., Goud B., Antony C., Lingwood C.A., Daneman R., Grinstein S. (1998) Noninvasive measurement of the pH of the endoplasmatic reticulum at rest and during calcium release. PNAS; 95: 2997-3002
- Klämbt D. (1990) A view about the function of auxin-binding proteins at plasma membranes. Plant Mol Biol; 14(6):1045-50
- Laemmli U.K. (1970) Cleavage of structural Proteins during the Assembly of the Head of the Bacteriophage T4. Nature; 227: 680-685
- Larsson C. (1985). Plasma membranes. In "Cell Components" (H.F. Linskens and J.F. Jackson, eds.), Seiten. 85-104. Modern Methods of Plant Analysis, New Series, Vol. 1. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg
- Leblanc N., David K., Grosclaude J., Pradier J.M., Barbier-Brygoo H., Labiau S., Perrot-Rechenmann C. (1999) A novel immunological approach establishes that the auxin-binding protein, Nt-abp1, is an element involved in auxin signaling at the plasma membrane. J Biol Chem.;274(40):28314-20.
- Lewis M.J., Sweet D.J., Pelham H.R. (1990) The ERD2 gene determines the specificity of the luminal ER protein retention system. Cell; 61 (7): 1359-1363
- Löbler M., Klämbt D. (1985a) Auxin-binding protein from coleoptile membranes of corn (*Zea mays* L.). Purification by immunological methods and characterisation. Journal of biological chemistry; 260: 9848-9853
- Löbler M., Klämbt D. (1985b) Auxin-binding protein from coleoptile membranes of corn (*Zea mays* L.). II. Localization of a putative auxin receptor. J Biol Chem.; 260 (17): 9854-9.
- McClure B.A., Guilfoyle T. (1987) Characterization of a class of small auxin-inducible soybean polyadenylated RNAs. Plant Molecular Biology; 9 (6): 611-623

-
- Munro S., Pelham H.R. (2002) A C-terminal signal prevents secretion of luminal ER proteins. *Cell*; 48 (5): 899-907
- Murphy G.J.P. (1980) A Reassessment of the Binding of Naphthaleneacetic Acid by Membrane Preparations from Maize. *Planta*; 149: 417-426
- Nagpal P., Ellis C.M., Weber H., Ploense S.E., Barkawi L.S., Guilfoyle T.J., Hagen G., Alonso J.M., Cohen J.D., Farmer E.E., Ecker J.R., J.W. Reed (2005) Auxin response factors ARF6 and ARF8 promote jasmonic acid production and flower maturation. *Development*; 132: 4107-4118
- Oecking C, Eckerskorn C, Weiler EW. (1994) The fusicoccin receptor of plants is a member of the 14-3-3 superfamily of eukaryotic regulatory proteins. *FEBS Lett.*; 352 (2): 163-166
- Overvoorde P.J., Okushima Y., Alonso J.M., Chan A., Chang C., Ecker J.R., Hughes B., Liu A., Onodera C., Quach H., Smith A., Yu G., Theologis A. (2005) Functional genomic analysis of the AUXIN/INDOLE-3-ACETIC ACID gene family members in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*;17(12):3282-300
- Pan Z.Q., Kentsis A., Dias D.C., Yamoah K., Wu K. (2004) Nedd8 on cullin: building an expressway to protein destruction *Oncogene*; 23: 1985–1997
- Philippar K., Fuchs I., Lüthen H., Hoth S., Bauer C.S., Haga K., Thiel G., Ljung K., Sandberg G., Böttger M., Becker D., Hedrich R. (1999) Auxin-induced K⁺ channel expression represents an essential step in coleoptile growth and gravitropism. *PNAS*; 96: 12186-12191
- Philippar K., Ivashikina N., Ache P., Christian M., Lüthen H., Palme K., Hedrich R. (2004) Auxin activates KAT1 and KAT2, two K⁺-channel genes expressed in seedlings of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*; 37(6):815-27

-
- Ray P.M., Dohrmann U., Hertel R. (1977) Characterization of Naphthaleneacetic Acid Binding to Receptor Sites on Cellular Membranes of Maize Coleoptile Tissue. *Plant Physiol.*; 59: 357-364.
- Rück A., Palme K., Venis M.A., Napier R.M., Felle H. (1993) Patch-clamp analysis establishes a role for an auxin-binding protein in the auxin stimulation of plasma membrane current in *Zea mays* protoplasts. *Plant Journal*; 4: 41-46
- Ruegger M., Dewey E., Gray W.M., Hobbie L., Turner J., Estelle M. (1997) The TIR1 protein of Arabidopsis functions in auxin response and is related to human SKP2 and yeast Grr1p. *Genes & Development* ; 12: 198-207
- Sedbrook J.C., Carroll K.L., Hung K.F., Masson P.H., Somerville C.R. (2002) The Arabidopsis SKU5 Gene Encodes an Extracellular Glycosyl Phosphatidylinositol-Anchored Glycoprotein Involved in Directional Root Growth. *The Plant Cell*; 14:1635–1648
- Shimomura O., Johnson F.H., Saiga Y. (1962) Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*. *J Cell Comp Physiol.*; 59:223-39.
- Shimomura S., Sotobayashi T., Futai M., Fukui T. (1986) Purification and properties of an auxin-binding protein from maize shoot membranes. *The journal of biochemistry*; 99 (5): 1513-1524
- Shimomura S. (2006) Identification of a glycosylphosphatidylinositol-anchored plasma membrane protein interacting with the C-terminus of auxin-binding protein 1: a photoaffinity crosslinking study. *Plant Mol Biol.*; 60(5):663-77.
- Staswick P.E., Serban B., Rowe M., Tiryaki I., Maldonado M.T., Maldonado M.C., Suza W. (2005) Characterization of an Arabidopsis enzyme family that conjugates amino acids to indole-3-acetic acid. *Plant Cell*; 17(2):616-27

-
- Steffens B., Feckler C., Palme K., Christian M., Böttger M., Lüthen H. (2001) The auxin signal for protoplast swelling is perceived by extracellular ABP1. *The Plant Journal*; 27 (6): 591-599
- Swarup K., Benková E., Swarup R., Casimiro I., Péret B., Yang Y., Parry G., Nielsen E., De Smet I., Vanneste S., Levesque M.P., Carrier D., James N., Calvo V., Ljung K., Kramer E., Roberts R., Graham N., Marillonnet S., Patel K., Jones J.D., Taylor C.G., Schachtman D.P., May S., Sandberg G., Benfey P., Friml J., Kerr I., Beeckman T., Laplaze L., Bennett M.J. (2008) The auxin influx carrier LAX3 promotes lateral root emergence. *Nat Cell Biol.*; 10 (8): 946-54
- Tan X., Calderon-Villalobos L.I.A., Sharon M., Zheng C., Robinson C.V., Estelle M., Zheng N. (2007) Mechanism of auxin perception by the TIR1 ubiquitin ligase. *Nature* 446: 640-645
- Tanaka H., Dhonukshe P., Brewer P.B., Friml J. (2006) Spatiotemporal asymmetric auxin distribution: a means to coordinate plant development. *Cell Mol Life Sci.*; 63 (23): 2738-54
- Tian H., Klämbt D., Jones A.M. (1995) Auxin-binding Protein 1 does not bind auxin within the endoplasmatic reticulum despite this being the predominant subcellular location for this hormone receptor. *Journal of biological chemistry*; 270: 26962-26969
- Tiwari S.B., Hagen G., Guilfoyle T. (2003) The roles of auxin response factor domains in auxin-responsive transcription. *Plant Cell*;15(2):533-43.
- Tode K., Lüthen H. (2001) Fusicoccin- and IAA-induced elongation growth share the same pattern of K⁺ dependence. *J Exp Bot.*; 52(355): 251-5
- Uehara T., Okushima Y., Mimura T., Tasaka M., Fukaki H. (2008) Domain II mutations in CRANE/IAA18 suppress lateral root formation and affect shoot development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.*; 49(7):1025-38.
- Ulmasov T, Hagen G., Guilfoyle T.J. (1999a) Dimerization and DNA binding of auxin response factors. *The Plant Journal*; 19 (3):309-319

-
- Ulmasov T., Hagen G., Guilfoyle T.J. (1999b) Activation and repression of transcription by auxin response Factors. PNAS; 96: 5844–5849
- Ulmasov T., Murfett J., Hagen G., Guilfoyle T. (1997a) Aux/IAA proteins repress expression of reporter genes containing natural and highly active synthetic auxin response elements. Plant Cell 9: 1963–1971
- Ulmasov T., Hagen G., Guilfoyle T.J. (1997b) ARF1, a Transcription Factor That Binds to Auxin Response Elements. Science; 276 (5320): 1865 - 1868
- Ulmasov T., Liu Z.B., Hagen G., Guilfoyle T.J. (1995) Composite Structure of Auxin Response Elements. The Plant Cell; 7: 1611-1623
- Venis M.A., Napier R.M., Barbier-Brygoo H., Maurel C., Perrot-Rechenmann C., Guern J. (1992) Antibodies to a peptide from the maize auxin-binding protein have auxin agonist activity. Proc Natl Acad Sci U S A; 89(15):7208-12.
- Weijers D., Benkova E., Jäger K.E., Schlereth A., Hamann T., Kientz M., Wilmoth J.C., Reed J.W., Jürgens G. (2005) Developmental specificity of auxin response by pairs of ARF and Aux/IAA transcriptional regulators. EMBO J; 24(10):1874-85.
- Wilmoth J.C., Wang S., Tiwari S.B., Joshi A.D., Hagen G., Guilfoyle T.J., Alonso J.M., Ecker J.R., Reed J.W. (2005) NPH4/ARF7 and ARF19 promote leaf expansion and auxin-induced lateral root formation. Plant J.; 43(1):118-30.
- Wilson D.W., Lewis M.J., Pelhams H.R.B. (1993) pH-dependent Binding of KDEL to its Receptor in Vitro The journal of biological chemistry; 268 (10):7465-7466
- Yamasaki K., Kigawa T., Inoue M., Tateno M., Yamasaki T., Yabuki T., Aoki M., Seki E., Matsuda T., Tomo Y., Hayami Y., Terada T., Shirouzu M., Osanai T., Tanaka A., Seki M., Shinozaki K., Yokoyama S. (2004) Solution Structure of the B3 DNA Binding

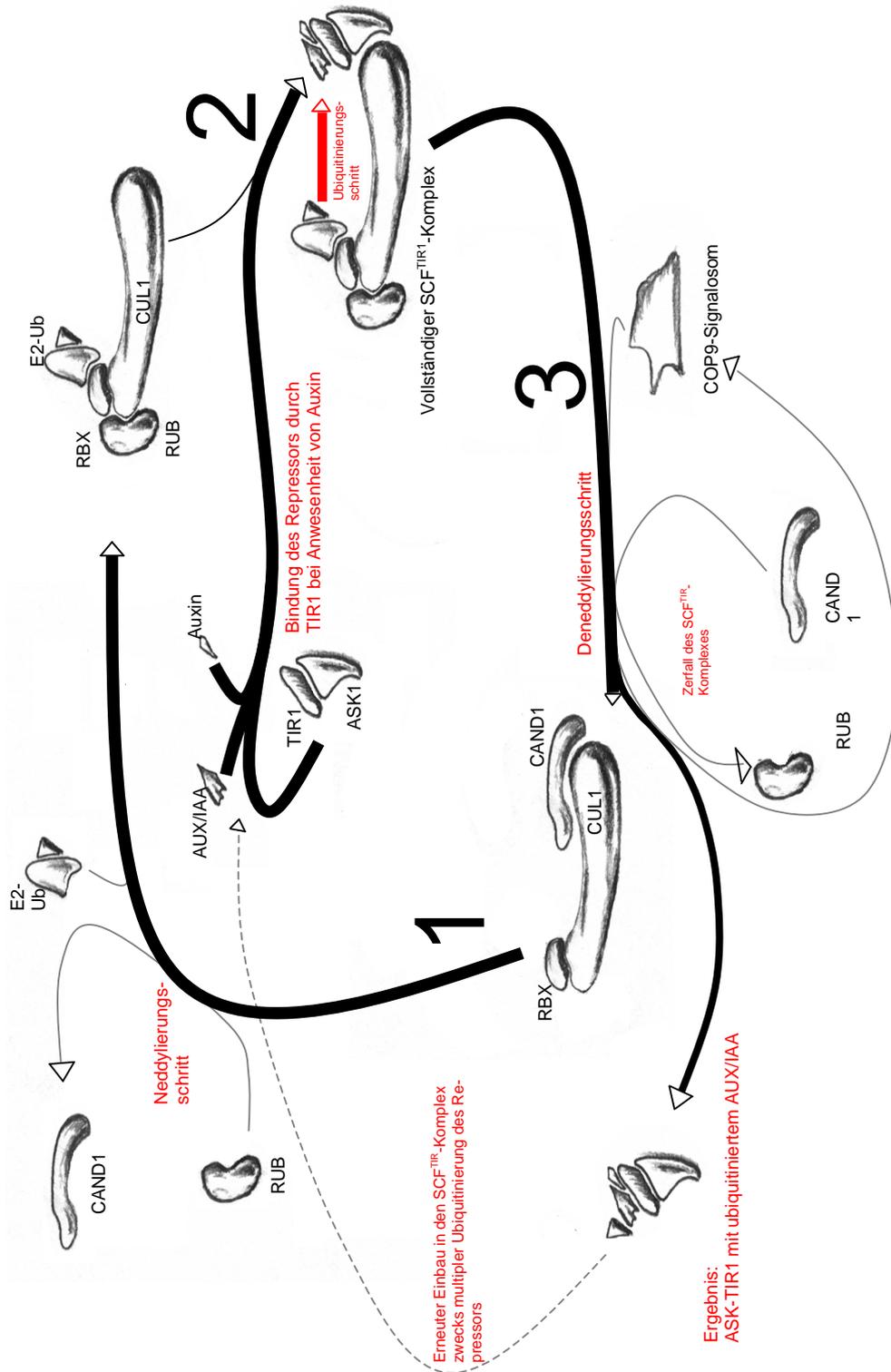
Domain of the Arabidopsis Cold-Responsive Transcription Factor RAV1. *Plant Cell*; 16: 3448–3459

Yang T., Poovaiah B.W. (2000) Molecular and Biochemical Evidence for the Involvement of Calcium/Calmodulin in Auxin Action. *J Biol Chem*; 275 (5): 3137-3143

Waldo G.S., Standish B.M., Berendzen J., Terwilliger T.C. (1999) Rapid protein-folding assay using green fluorescent protein. *Nat Biotechnol*. Jul;17(7):691-5.

Walker J.C., Key J.L. (1982) Isolation of cloned cDNAs to auxin-responsive poly(A) RNAs of elongating soybean hypocotyl. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79: 7185–7189

Woo E.J., Marshall J., Baulry J., Chen J.G., Venis M., Napier R., Pickersgill R.W. (2002) Crystal structure of auxin-binding protein 1 in complex with auxin. *Embo Journal*; 21 (12): 2877-2885



ANHANG A: Modell der TIR1-vermittelten Ubiquitinierung am SCF^{TIR1}-Komplex. Das aus CUL1, CAND1 und RBX bestehende Grundgerüst des Komplexes wird in einem von AXR1 katalysierten Neddylierungsschritt aktiviert, indem CAND1 abdissoziiert und RUB kovalent an den Komplex bindet. (1) Hierdurch kann RBX E2-Ub (den „Ubiquitinlieferanten“) an den Komplex binden. Bei Anwesenheit von Auxin kann an ASK1 gebundenes TIR1 ein AUX/IAA-Repressor binden und gleichzeitig über CUL1 an den SCF-Komplex binden. Durch das Zusammenbringen von E2-Ub und AUX/IAA kommt es zur Ubiquitinierung des Repressors (2). Durch das COP9-Signalosom wird RUB vom Komplex abgespalten und CAND1 assoziiert wieder an CUL1 (Deneddylierung, 3). In einem zyklischen Prozess werden die Schritte 1-3 wiederholt und der AUX/IAA-Repressor mehrfach ubiquitiniert (Pan *et al.* 2004).

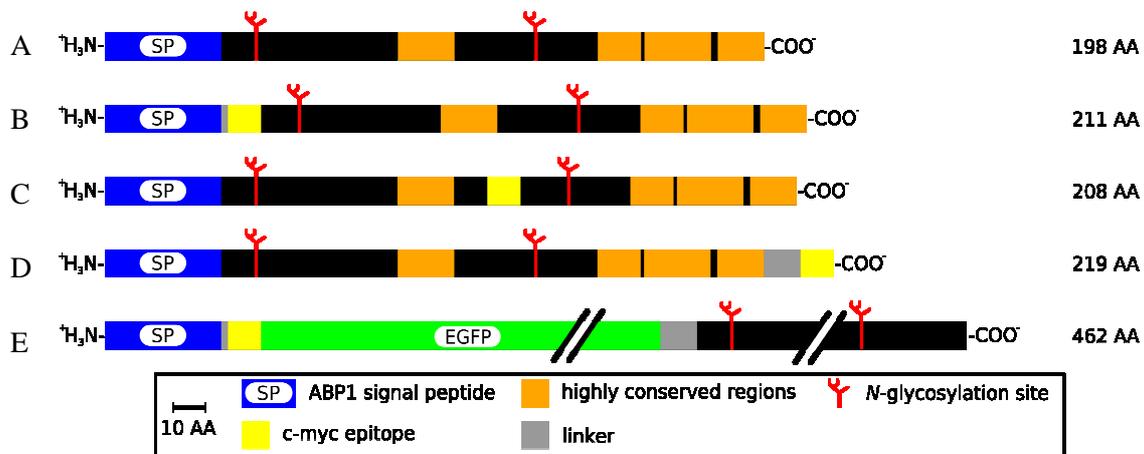
Herstellung der ABP1-Überexprimierer (Durchführung: Mathias Klode, Universität Kiel)

Der ORF von AtABP1 (At4g02980) wurde mit Hilfe geeigneter Primer amplifiziert und gerichtet in pENTR (Invitrogen) kloniert. N-terminal, intern und C-terminal wurde mit Hilfe von Extension-PCR und geeigneten Primern ein Sequenzabschnitt eingefügt, der für den c-myc tag kodiert (5'-gaa caa aaa ctt att tct gaa gaa gat ctg-3'). N-terminal wurde dieser Bereich 3' des Signalpeptids nach einem kurzen Linker (CCA AGA) eingefügt (gga gct cct GGT TCT GAA CAA AAA CTT ATT TCT GAA GAA GAT CTG ctt tgt). Die interne Markierung wurde an der Position 373 des ORF (AS: AETH-c-myc-GNFP) eingefügt. Die C-terminale Markierung wurde direkt vor dem Stoppcodon angefügt. Die für den tag kodierende Sequenz wurde durch eine Linkersequenz vom Rest des C-Terminus getrennt (Linker33, Waldo *et al.* 1999).

Für das EGFP-ABP1 Fusionsprotein wurde das Signalpeptid von ABP1 und zwei Aminosäuren als Kurzlinkern amplifiziert. Daran wurde der c-myc-tag, die kodierende Sequenz von EGFP und die restliche Sequenz von ABP1 mittels Überhang-PCR gehängt. Detektiert wurden 24 positive Pflanzen vom EGFP-ABP1 Fusionsprotein, die Expression wurde mittels Western Blot und Fluoreszenzmikroskopie überprüft.

Alle Konstrukte wurden gerichtet in pENTR (Invitrogen) kloniert und durch Sequenzierung überprüft. Mit Hilfe einer gerichteten Rekombination wurden die Konstrukte in den Zielvektor pB7WG2 (Karimi *et al.*, 2002) transferiert und in Agrobakterien des Stamms EHA105 transformiert. Mit Hilfe der floral dip-Methode (Clough and Bent, 1998) wurde *Arabidopsis thaliana* Ökotyp Columbia transformiert. Transgene Pflanzen wurden über Sprühen mit Glufosinat selektiert. Die Überexpression wurde mittels RT-PCR und Westernblot überprüft und Pflanzen, die markiertes ABP1 überexprimierten, wurden weiter propagiert. T-2 Pflanzen, die nur Glufosinat-resistente Nachkommen hervorbrachten, wurden als homozygot angesehen und für die Versuche weiter verwendet.

Die Konstrukte für die ABP1-Überexprimierer sind der folgenden Abbildung dargestellt.



Konstrukte für die Herstellung der ABP1-Überexprimierer. Von oben nach unten: ABP1 (A), ABP1 mit N-terminalem c-myc-tag (B, in der vorliegenden Arbeit nicht verwendet), ABP1 mit internem c-myc-tag (C), ABP1 mit C-terminalem c-myc tag (D), EGFP-ABP1-Fusionsprotein (E).

Lebenslauf

Daniel Schenck

Geboren am 11.01.1977 in Hamburg

Staatsangehörigkeit: deutsch

Familienstand: ledig

1983–1987	Besuch der Grundschule	Westerschule, Hamburg
1987–1996	Besuch des Gymnasiums	Gymnasium Finkenwerder, Hamburg Abschluss mit Abitur
1996-1997	Zivildienst	Mobile Hilfe für Behinderte GmbH Tätigkeit als Betreuer und Fahrer
1997-1999	Geographiestudium	Universität Hamburg Grundstudium
1999–2005	Biologiestudium	Universität Hamburg Diplom mit der Fächerkombination Allgemeine Botanik, Biochemie und Mikrobiologie. Thema der Diplomarbeit: „Untersuchungen zur Funktion des putativen Auxinrezeptors Auxin- Bindeprotein 1“ unter Anleitung von Prof. Dr. Michael Böttger
2005-2008	Promotionsstudium	Universität Hamburg

Lehrerfahrung

SS 08

14.006 Einführung in die Pflanzenphysiologie
Praktikum mit Seminar, 6st, *Daniel Schenck*

WS 07/08

14.064 Pflanzenphysiologisches Praktikum für Fortgeschrittene, Teil 2: Signaltransduktion
Praktikum, Hartwig Lüthen und *Daniel Schenck*

WS02/03, SS03, WS03/04, SS04 und WS04/05

14.046 Pflanzenphysiologischer Kurs für DB und LAOA
Praktikum, 4st, Michael Böttger, Hartwig Lüthen
Assistent im Praktikum

SS 03 und SS04

00.462 Biochemisches Praktikum II
Praktikum, 3 st., Hartwig Lüthen, Michael Böttger
Assistent im Praktikum

Publikationsliste

- Schenck D.**, Christian M., Jones A.M., Lüthen H. (2009) Do auxin-binding F-box receptors control rapid auxin-induced elongation growth in *Arabidopsis thaliana*? Plant Cell, eingereicht
- Lüthen H., Böttger M., **Schenck D.** (2007) Receptors for the Five Classical Plant Hormones. Progress in Botany (Heidelberg).; 68: 221-241
- Christian M., Steffens B., **Schenck D.**, Burmester S., Böttger M., Lüthen H. (2006) How does auxin enhance cell elongation? Roles of auxin-binding proteins and potassium channels in growth control. Plant Biol (Stuttg).; 8(3): 346-52
- Christian M. **Schenck D.**, Böttger M., Steffens B., Lüthen H. (2006) New insight into auxin perception, signal transduction and transport. Progress in Botany (Heidelberg); 67: 219-247
- Christian M., Steffens B., **Schenck D.**, Lüthen H. (2003) The *diageotropica* mutation of tomato disrupts a signalling chain using extracellular auxin binding protein 1 as a receptor. Planta; 218: 309-314

Konferenzbeiträge

- Schenck D.** and Lüthen H. (2007) ABP1 and/or TIR1/AFB: Which auxin receptor triggers rapid elongation growth? Botanikertagung 2007 in Hamburg, Posterpräsentation
- Schenck D.** (2004) Perception and transduction of the auxin signal in control of elongation growth. Botanikertagung 2004 in Braunschweig
Kurzvortrag
- Schenck D.**, Lüthen H. (2004) Auxin signal transduction mutants – a tool to shed light upon growth mechanisms. Botanikertagung 2004 in Braunschweig, Posterpräsentation

Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle bei Dr. Hartwig Lüthen bedanken, ohne dessen sehr engagierte Betreuung diese Arbeit nicht zustande gekommen wäre. Danke, Hartwig! Mir hat die Zusammenarbeit mit Dir sehr viel Spaß gemacht!

Ich bedanke mich auch bei den anderen Auxinforschern, mit denen ich während meiner Promotion zusammengearbeitet habe, insbesondere bei Dr. May Christian, Matthias Glenz und Sonia Burmester, mit denen ich viele anregende Diskussionen zum Thema Auxin und darüber hinaus hatte.

Mein Dank gilt weiterhin Dr. Sabine Lühje und all ihren Mitarbeitern aus dem Labor schräg gegenüber, die mir die proteinbiochemische Arbeit an der FPLC näher gebracht haben.

Auch Prof. Dr. Böttger und Dr. Olaf Döring haben mich immer wieder mit wissenschaftlichen und technischen Tipps unterstützt!

Ich bedanke mich bei allen früheren und jetzigen Mitarbeitern der AG Böttger und AG Warnecke, mit denen ich meine Laborsorgen geteilt habe und mit denen ich unzählige schöne Stunden bei Kaffee, Kuchen, Bier, Sekt, Spinatauflauf, Pizza und vielem, vielem mehr erlebt habe.

Auch möchte ich mich bei Mathias Klode und Dr. Bianka Steffens aus dem Labor von Prof. Dr. Margret Sauter der Universität Kiel für die ABP1-Überexprimierer, bei Prof. Dr. Mark Estelle der University of California (San Diego, USA) für die F-Box-Mutanten und nicht zuletzt bei Dr. Friedrich Buck und seinem Team (Universität Hamburg) für die Durchführung der ESI-MS-MS-Untersuchungen bedanken.

Schließlich danke ich meiner Familie für die große Unterstützung. Mein Bruder Stephan hat mir darüber hinaus auch sehr wertvolle wissenschaftliche Hinweise gegeben, für die ich ihm sehr dankbar bin.