

Funktionelle Charakterisierung des AtPIN1-Proteins

aus *Arabidopsis thaliana*

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität zu Köln

vorgelegt von

Olaf Tietz

aus Köln

Köln 2003

Berichterstatter: Prof. Dr. Sabine Waffenschmidt

Prof. Dr. Ulf-Ingo Flügge

Prof. Dr. Klaus Palme

Tag der letzten mündlichen Prüfung: 25. November 2002

Inhaltsverzeichnis

	Abkürzungen.....	V
1	EINLEITUNG.....	1
1.1	Auxin.....	1
1.2	Auxintransport.....	4
1.2.1	Nicht-polarer Auxintransport.....	4
1.2.2	Lateraler Auxintransport.....	5
1.2.3	Polarer Auxintransport.....	5
1.2.4	Physiologische Bedeutung des polaren Auxintransports.....	7
1.2.5	Der Auxinefflux-Carrier und seine Regulation.....	9
1.2.6	Molekulare Komponenten des polaren Auxintransportsystems	11
1.3	Zielsetzung	17
2	MATERIAL UND METHODEN	19
2.1	Material.....	19
2.1.1	Enzyme.....	19
2.1.2	Chemikalien.....	19
2.1.3	Bakterienstämme und Hefe	19
2.1.4	Vektoren.....	20
2.1.5	Geräte.....	20
2.1.6	Datenverarbeitung.....	21
2.1.7	Kulturmedien.....	21
2.1.7.1	Bakterienmedien.....	21
2.1.7.2	Hefe.....	22
2.1.7.3	Pflanzenmedien.....	22
2.1.7.4	Suspensionskulturmedien.....	22
2.1.7.5	Antibiotika, Hormone, andere Stammlösungen und Antikörper	23
2.1.8	Pflanzen.....	24
2.1.9	Suspensionskulturen.....	24
2.2	Methoden zur Analyse von Nukleinsäuren.....	25
2.2.1	DNA-Präparationen.....	25
2.2.1.1	Schnellpräparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	25
2.2.1.2	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> über Qiagen-Säulen.....	25
2.2.1.3	Isolierung von Plasmid-DNA aus Agrobakterien („Alkalische Lyse“)......	25
2.2.1.4	Isolierung von genomischer DNA aus Pflanzen.....	25
2.2.2	Enzymatische Reaktionen mit DNA.....	26
2.2.2.1	Verdau von DNA mit Restriktionsenzymen.....	26
2.2.2.2	Dephosphorylierung von Vektor-DNA.....	26
2.2.2.3	Auffüllreaktionen einzelsträngiger DNA-5'-Enden.....	26
2.2.2.4	Ligation von DNA-Fragmenten.....	27
2.2.2.5	DNA-Sequenzierung.....	27
2.2.3	Gelelektrophoretische Methoden.....	27

2.2.3.1	Elektrophoretische Auftrennung von DNA in Agarosegelen.....	27
2.2.3.2	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	27
2.2.4	Southern-Blot.....	27
2.2.4.1	Trennung und Transfer von genomischer <i>A.thaliana</i> DNA.....	27
2.2.4.2	Radioaktive Markierung von DNA.....	28
2.2.4.3	Nachweis der filtergebundenen DNA.....	28
2.2.5	Klonierung von AtPIN1 für die Expression in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> und <i>Xenopus</i> Oozyten.....	29
2.2.6	Transformationsmethoden.....	29
2.2.6.1	Präparation elektrokompenter <i>Escherichia coli</i> Zellen.....	29
2.2.6.2	Herstellung elektrokompenter <i>Agrobacterium tumefaciens</i> Zellen.....	29
2.2.6.3	Herstellung kompetenter <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Zellen.....	29
2.2.6.4	Bakterientransformation.....	30
2.2.6.5	Hefetransformation.....	30
2.2.7	Pflanzentransformation.....	30
2.2.7.1	Anzucht von <i>A. thaliana</i>	30
2.2.7.2	Transformation mittels Agrobakterien.....	30
2.3	Methoden zur Proteinanalyse.....	31
2.3.1	Präparation von Proteinen aus <i>A. thaliana</i>	31
2.3.2	Präparation von Proteinen aus <i>S. cerevisiae</i>	31
2.3.3	Präparation von Proteinen aus <i>Xenopus</i> Oozyten.....	31
2.3.4	Methoden zur Konzentrationsbestimmung	31
2.3.4.1	Bestimmung der Proteinkonzentration mit Bichinonsäure	31
2.3.5	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	32
2.3.6	Coomassie-Färbung	32
2.3.7	Transfer von Proteinen („Western-Blot“).....	32
2.3.8	Immundetektion von Proteinen.....	33
2.3.9	Reinigung des AtPIN1-Antikörpers.....	33
2.3.9.1	Expression und Reinigung des Antigens	33
2.3.9.2	Affinitätsreinigung des AtPIN1-Serums	33
2.4	Immuncytochemische Methoden.....	34
2.4.1	Detektion von Proteinen auf Längsschnitten von Sproßachsen.....	34
2.4.2	Detektion von Proteinen in intakten Wurzelspitzen.....	35
2.4.3	Detektion von Proteinen auf Schnitten von <i>Xenopus</i> Oozyten.....	35
2.5	GUS-Untersuchungen.....	35
2.6	Auxintransportstudien	36
2.6.1	Polarer Auxintransport in Stengelsegmenten von <i>A. thaliana</i>	36
2.6.2	Auxintransportmessungen in Suspensionskultur von <i>A. thaliana</i>	36
2.6.3	Auxinefflux-Messungen in <i>Xenopus</i> Oozyten.....	37
2.6.4	Auxinefflux-Messungen in <i>S. cerevisiae</i>	37
2.7	Kultivierung von <i>A. thaliana</i>-Pflanzen.....	37
2.7.1	Oberflächensterilisation von Samen	37
2.7.2	Segregationsanalysen.....	38
2.7.3	Kreuzung von <i>A. thaliana</i>	38
2.7.4	Herstellung von Wurzelkulturen.....	38

2.8	<i>A. thaliana</i> –Suspensionskultur-Methoden.....	39
2.8.1	Herstellung von Suspensionskulturen.....	39
2.8.2	Umsetzen von Suspensionskulturen.....	39
2.8.3	Bestimmung der Wachstumscharakteristik.....	39
2.8.4	Transformation von Suspensionskulturen.....	40
2.8.5	Regeneration von Pflanzen aus Suspensionskultur.....	40
2.8.6	Induktion von Wurzeln und Vermehrung.....	40
2.9	Phänotypische Untersuchungen.....	40
2.9.1	Färbung von Zellwänden der Wurzel.....	40
2.9.2	Untersuchung der gravitropen Wurzelwachstums von <i>A. thaliana</i> -Keimlingen...	41
2.9.3	Analyse der Seitenwurzelentwicklung.....	41
3	ERGEBNISSE.....	42
3.1	Konstitutive Expression von AtPIN1 im homologen System.....	42
3.1.1	Herstellung des 35S::AtPIN1-Konstrukts	42
3.1.2	Transformation einer <i>pin1-1</i> -Suspensionskultur.....	43
3.1.3	Regeneration von Pflanzen.....	43
3.1.4	Selektion und Charakterisierung homozygoter Enk(p1)35S::AtPIN1-Pflanzen...	46
3.1.5	<i>In planta</i> Transformation und Selektion transgener Col35S::AtPIN1- Pflanzen..	48
3.1.6	Phänotypische Charakterisierung der Enk(p1)35S::AtPIN1- und Col35S::AtPIN1-Pflanzen.....	48
3.1.7	Southern-Blot-Analysen der Enk(p1)35S::AtPIN1- und Col35S::AtPIN1-Pflanzen.....	53
3.1.8	Zeitliche Auflösung des gravitropen Wurzelwachstums	55
3.1.9	Western-Blot-Analyse.....	57
3.1.10	Lokalisierung von ectopisch exprimiertem AtPIN1 in Wurzelspitzen.....	58
3.1.11	AtPIN2-Lokalisierung in Wurzelspitzen von Enk(p1)35S::AtPIN1- und Col35S::AtPIN1-Pflanzen.....	60
3.1.12	Auxinverteilung in Wurzelspitzen von Enk(p1)35S::AtPIN1 und Col35S::AtPIN1- Pflanzen und <i>pin1-1</i> -Mutante.....	62
3.1.13	Untersuchung der Seitenwurzelentwicklung in der <i>pin1-1</i> -Mutante und in Enk(p1)- und Col35S::AtPIN1-Pflanzen.....	66
3.1.14	Untersuchung des polaren Auxintransports in Sproßachsen von Enk(p1)35S::AtPIN1-Pflanzen.....	68
3.1.15	Lokalisierung von AtPIN1 in Sproßachsen von Enk(p1)35S::AtPIN1-Pflanzen..	71
3.1.16	Phänotypische Analyse von etiolierten Keimlingen.....	73
3.2	Induzierbare AtPIN1-Expression im homologen System.....	74
3.2.1	Herstellung des <i>pTA</i> ::AtPIN1-Konstrukts	74
3.2.2	Transformation und Selektion von Col <p>TA::AtPIN1-Pflanzen.....</p>	75
3.2.3	Western-Blot-Analysen.....	76
3.2.4	Phänotypische Charakterisierung.....	77
3.3	Auxintransportstudien in heterologen Expressionssystemen.....	79
3.4	Auxintransport in <i>A. thaliana</i>-Suspensionskulturen.....	81
3.4.1	Etablierung von Col <p>TA::AtPIN1-Suspensionskulturen.....</p>	81
3.4.2	Bestimmung der Wachstumscharakteristik und der Induktionskinetik	82
3.4.3	Auxintransportstudien auf einer <i>A. thaliana</i> -Suspensionskultur	84

3.4.4	Auxintransportstudien auf einer AtPIN1-überexprimierenden <i>A. thaliana</i> -Suspensionskultur	86
3.4.5	Inhibierung des Auxintransports in einer AtPIN1-überexprimierenden <i>A. thaliana</i> -Suspensionskultur	87
3.5	AtPIN-Lokalisierungen in <i>pinoid</i>-Mutanten und PINOID-überexprimierenden Pflanzen.....	89
3.5.1	AtPIN1-Lokalisierung in Wurzelspitzen und Sproßachsen von <i>pinoid</i> -Mutanten und PINOID-überexprimierenden Pflanzen.....	89
3.5.2	Untersuchung des polaren Auxintransports in PINOID-überexprimierenden Pflanzen.....	94
3.5.3	Lokalisierung von AtPIN2 und AtPIN4 in Wurzelspitzen von PINOID-überexprimierenden Pflanzen.....	95
4	DISKUSSION	98
4.1	Konstitutive AtPIN1-Expression in <i>A. thaliana</i>	98
4.1.1	Funktionalität der <i>AtPIN1</i> -cDNA	98
4.1.2	Phänotypische Charakterisierung der AtPIN1-überexprimierenden Pflanzen.....	99
4.1.3	Kosuppression durch AtPIN1-Überexpression.....	105
4.2	Induzierbare AtPIN1-Expression in <i>A. thaliana</i>-Pflanzen.....	106
4.3	Auxintransportstudien in heterologen Expressionssystemen.....	107
4.4	Funktionelle Charakterisierung von AtPIN1 in <i>A. thaliana</i>-Suspensionskulturen und in <i>A. thaliana</i>-Pflanzen.....	108
4.5	Wechselwirkungen zwischen AtPIN-Proteinen und PINOID	112
4.6	Modell für die Funktion von AtPIN1.....	118
4.7	Ausblick	119
5	ZUSAMMENFASSUNG.....	122
6	LITERATUR.....	125

Abkürzungen

In der vorliegenden Arbeit beziehen sich kursiv dargestellte Abkürzungen auf die Nukleotidsequenz (die Unterscheidung zwischen Gen, RNA, cDNA oder Promotor erfolgt durch einen entsprechenden Zusatz); nichtkursive Abkürzungen beziehen sich auf die Proteine.

Abb.	Abbildung
ABP	Auxin-bindendes Protein bzw. Auxin-bindende Proteine
ADIS	Automatische DNA-Isolierung und –Sequenzierung
Ap ^R	Ampicillinresistenz
APS	Ammoniumperoxodisulfat
<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
<i>A. tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
BAP	N ⁶ -Benzylaminopurin
bidest.	bidestilliert
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
BY2	Tabakuspensionszellen (bright yellow 2)
CaMV	Blumenkohlmosaikvirus
Ci	Curie
cDNA	komplementäre DNA
Col/Columbia	<i>Arabidopsis thaliana</i> (L.) Heynh., Ökotyp Columbia
cpm	Zerfälle in der Minute
CTAB	Hexadecyltrimethylamoniumbromid
C-terminal	carboxyterminal
C-Terminus	Carboxyterminus
cv.	cultivar
2,4-D	2,4-Dichlorphenoxyessigsäure
d. h.	das heißt
DMF	Dimethylformamid
Da	Dalton
det.	detektiert
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglycoldiamintetraacetat
Enk/Enkheim	<i>Arabidopsis thaliana</i> (L.) Heynh., Ökotyp Enkheim, <i>ttg</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FITC	Fluoresceinthiocyanat
FW	Frischgewicht
GUS	β-Glucuronidase

h	Stunde
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-ethansulfonsäure
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-ethansulfonsäure
HRP	Horse raddish peroxidase
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IAA	Indol-3-essigsäure
IgG	Immunglobulin G
KAc	Kaliumacetat
KIM	Kallusinduktionsmedium
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
KLH	Keyhole Limpet Hemocyanin
kV	Kilovolt
L.	Linné
M	Molar
mA	Milliampère
MES	4-Morpholinsäure
Min	Minuten
mM	Millimolar
mRNA	messenger RNA
ms	Millisekunde
MS	Massenspektrometrie
MTSB	<i>microtubuli stabilisation buffer</i>
μF	Mikrofarad
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
1-NAA	1-Naphthylelessigsäure
2-NAA	2-Naphthylelessigsäure
NaAc	Natriumacetat
nm	Nanometer
NMM	4-Methylmorpholin
NPA	1-Naphthylphthalamid Säure
NTA	Nitrilotriacetat
<i>N. tabacum</i>	<i>Nicotiana tabacum</i>
N-terminal	aminoterminal
N-Terminus	Aminoterminus
OD	Optische Dichte
Ω	Ohm
PAA	4-Hydroxyphenylelessigsäure
9-iPAR	(N ⁶ (Δ^2 -Isopentenyl)-Adenosin)
PABA	p-Aminobenzoessäure
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol

pmol	Pikomol
PMSF	Phenylmethylsulfonylchlorid
PVDF	Polyvinylidendifluorid
PVPP	Polyvinylpyrrolidon
REG	Regenerationsmedium
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RP	Reversed Phase
UPM	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase PCR
SAP	Shrimps Alkaline Phosphatase
35S-Promotor	<i>CaMV35S</i> -Promotor (Promotor des Blumenkohlmosaikvirus)
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
s.	siehe
s.o.	siehe oben
SDS	Natriumdodecylsulfat
T-100	Triton-X100
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetraethylendiamin
φ	Durchmesser
Tet ^R	Tetracyclinresistenz
TIBA	2,3,5-Trijodbenzoesäure
theor.	theoretisch
TFA	Trifluoressigsäure
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit
u.a.	unter anderem
UBQ	Ubiquitin
UV	Ultraviolett
ü. N.	über Nacht
4-VP	4-Vinylpyridin
X-Gluc	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-β-D-Glucuronsäure
z. B.	zum Beispiel
ZM	Zellkulturmedium

Aminosäuren

A (Ala)	Alanin	N (Asn)	Asparagin
C (Cys)	Cystein	P (Pro)	Prolin
D (Asp)	Asparaginsäure	Q (Gln)	Glutamin
E (Glu)	Glutaminsäure	R (Arg)	Arginin
H (His)	Histidin	S (Ser)	Serin
I (Ile)	Isoleucin	T (Thr)	Threonin
K (Lys)	Lysin	V (Val)	Valin
L (Leu)	Leucin	W (Trp)	Tryptophan
M (Met)	Methionin	Y (Tyr)	Tyrosin

Nukleotide

A	Adenin	dATP	2'-Desoxyadenosin-5'-triphosphat
C	Cytosin	dCTP	2'-Desoxycytosin-5'-triphosphat
G	Guanin	dGTP	2'-Desoxyguanosin-5'-triphosphat
T	Thymin	dTTP	2'-Desoxythymidin-5'-triphosphat
		dNTPs	2'-Desoxyribonukleosidtriphosphate

1 Einleitung

Pflanzen können im Gegensatz zu Tieren auf Umweltveränderungen nicht mit einer aktiven Änderung ihres Standortes reagieren. Sie reagieren vielmehr durch lebenslanges Wachstum. Um das leisten zu können, sind sie in ihrer Entwicklung weniger stark festgelegt als Tiere, bei denen während der Embryonalentwicklung bereits die meisten Zellen fertig differenziert sind und später nur noch ein Auswachsen des Organismus stattfindet. In pflanzlichen Embryonen dagegen ist nur die vertikale Wachstumsachse, das apikale Sproß- und das apikale Wurzelmeristem fest angelegt. Die Meristeme bleiben das ganze Pflanzenleben über aktiv. Aus ihnen heraus erwachsen Primordien, deren Zellen sich über koordinierte Zellteilung, Differenzierung und Zellstreckung zu Organen, wie Blättern und Blüten, entwickeln. Aber auch dann sind Pflanzenzellen in ihrer Entwicklung noch nicht festgelegt. Sie können sich dedifferenzieren und danach wieder redifferenzieren. Beispiele hierfür sind Wundheilung, die Seitenwurzelentwicklung und die Regeneration von ganzen Pflanzen aus Kallusgewebe. Die Differenzierung der Zellen ist nicht, wie bei Tieren, festgelegt durch die Abstammung, sondern wird beeinflusst durch Nachbarzellen und die Position der Zellen im Gewebe. Daran beteiligt sind u.a. Pflanzenwuchsstoffe, die sogenannten Phytohormone. Im Gegensatz zu tierischen Hormonen sind Synthese- und Wirkungsort dieser Phytohormone nicht unbedingt streng voneinander getrennt (Davies, 1995). Phytohormone regulieren eine Vielzahl von Entwicklungsprozessen, von der Samenkeimung bis hin zur Seneszenz.

Die fünf klassischen Phytohormonklassen sind Auxine, Abszinsäure, Cytokinine, Ethylen und Giberelline. Später wurden niedermolekulare Substanzen entdeckt, die auch Phytohormon-ähnliche Wirkungen entfalten können. Dazu zählen u.a. Brassinosteroide, Jasmonsäure, Lipochitooligosaccharide und auch Peptide, wie z. B. Systemin (Davies, 1995).

1.1 Auxin

Charles Darwin postulierte bereits 1881, daß die Translokation eines Mediators („influence“) aus Koleoptilenspitzen von Gräsern, in der darunterliegenden Wachstumszone Zellstreckung auslöst (Darwin und Darwin, 1881). 1928 wurde diese als Auxin bezeichnete Substanz aus Hefe isoliert (Went, 1928) und wenig später als Indol-3-essigsäure (IAA) identifiziert (Kögl und Kostermans, 1934). In Pflanzen wurden neben IAA noch weitere Auxine nachgewiesen, so z.B. Indol-3-Buttersäure (IBA) und 4-Chlor-Indol-3-Essigsäure (4 Cl-IAA). Des Weiteren werden auch synthetische Verbindungen wie 1-Naphthylessigsäure (1-NAA) und 2,4-

Dichlorphenoxyessigsäure (2,4-D) zur Wirkstoffklasse der Auxine gezählt. In der Auxinforschung werden sie aufgrund ihrer höheren Stabilität bevorzugt eingesetzt.

Aktives Auxin kann sowohl aus Tryptophan als auch aus anderen indolischen Vorläufersubstanzen synthetisiert werden (Bartel, 1997). Ein Großteil (ca. 95%) liegt in Form von inaktiven Konjugaten vor. Als wichtigste Verbindungen sind Aminosäure-, Peptid-, *myo*-Inositol- und Kohlenhydrat-Konjugate zu erwähnen (Cohen und Bandurski, 1982). Durch enzymatisch gesteuerte Hydrolyse kann daraus wieder aktives Auxin freigesetzt werden (Bartel und Fink, 1995). Diese Konjugate dienen wahrscheinlich als Speicher- und Transportform für IAA und zur Aufrechterhaltung der Auxin-Homöostase (Bandurski *et al.*, 1995).

Auxinwirkung

Auxine sind an der Regulation von nahezu allen pflanzlichen Entwicklungsprozessen beteiligt. Die klassischen Wirkungsweisen von Auxin sind die Aufrechterhaltung der Apikaldominanz, die Entwicklung des vaskulären Systems sowie die Stimulation der Zellteilung und Zellstreckung (Davies, 1995). Auxin scheint aber auch noch auf komplexe Weise als Morphogen zu wirken. Dabei steuert die Verteilung von Auxin in Geweben die Anordnung, Teilung und Differenzierung von Zellen. Es wurde gezeigt, daß bei *Pinus sylvestris*-Bäumen die Entwicklung des vaskulären Gewebes von Seitentrieben u.a. gesteuert wird durch radial verlaufende Auxinkonzentrationsgradienten in den Seitenmeristemen (Uggla *et al.*, 1996). Radiale Auxingradienten in Blütenständen beeinflussen auch die Anordnung von lateralen Organen (Phylotaxis) in Tomate und *A. thaliana* (Reinhardt *et al.*, 2000). Mittels des synthetischen, auxininduzierbaren Promotorelements *DR5*, abgeleitet vom Promotor des *GH3*-Gens aus Sojabohne, ist es gelungen, indirekt die Auxinverteilung in Geweben zu untersuchen (Ulmasov *et al.*, 1997a). In transgenen *A. thaliana*, die ein *DR5::GUS*-Reportergenkonstrukt trugen, wurde in Wurzelspitzen die GUS-Reporteraktivität untersucht (Sabatini *et al.*, 1999). Dabei zeigten mehrere Mutanten mit Defekten im Auxintransport oder in der Auxinsignaltransduktion veränderte *DR5::GUS*-Signalstärken bzw. eine Verschiebung des Auxinmaximums innerhalb des Wurzelmeristems (Sabatini *et al.*, 1999; Friml *et al.*, 2002b). Seit kurzem wird auch die Wirkung von Auxin auf die Regulation von einzelnen Proteinen durch Ubiquitin-vermittelte-Proteindegradation diskutiert (zur Übersicht Kepinski und Leyser, 2002). Die Auxinsignaltransduktion kann möglicherweise auch über MAPK-Phosphorylierungskaskaden (*mitogen activated protein kinase*) erfolgen

(zur Übersicht DeLong *et al.*, 2002). Diese sind im Tierreich schon lange bekannt und gut untersucht.

Nachfolgend sind einige Auxinwirkungen beschrieben, die verdeutlichen, auf wie mannigfaltige Art dieses Phytohormon die Entwicklung von Pflanzen zu steuern vermag.

Ein gut untersuchter physiologischer Effekt ist das auxininduzierte Streckungswachstum von Graskoleoptilen (Bonner, 1933), das in der *Acid Growth Theory* zusammengefaßt wird (Kutschera, 1994; Cleland 1995). Bei Auxinzugabe steigt nach einer kurzen *lag*-Phase die Wachstumsrate an. Dies geht einher mit der Ansäuerung des Apoplasten, wodurch es zu einer chemischen Auflockerung der Zellwand kommt. Der Turgordruck bewirkt schließlich die Zellstreckung. Die Ansäuerung wird vermutlich verursacht durch Aktivitätssteigerung einer H⁺-ATPase, die vermehrt Protonen an die Außenseite der Plasmamembran pumpt, wodurch es zur Hyperpolarisation des Transmembranruhepotentials kommt (Hager *et al.*, 1991; Santoni *et al.*, 1990; Sze *et al.* 1999). Auxin muß dabei aber noch weitere Wirkungen besitzen, da auch inaktive Auxinanaloga, bei denen es nicht zu Zellstreckungswachstum kommt, eine Hyperpolarisation hervorrufen können (Felle *et al.*, 1991).

Auxin beeinflußt außerdem die Genexpression. Es wurden unterschiedliche Familien von Auxin-responsiven Genen identifiziert, die u.a. bei interzellulärer Kommunikation und Genexpressionskontrolle beteiligt sind. Dazu gehören *AUX/IAA*-, *GH3*- und *SAUR*-Gene (Zur Übersicht: Abel und Theologis, 1996). Nur einige der 29 *AUX/IAA*-Gene wurden bisher funktionell charakterisiert. Im Hefe-2-Hybrid-Test wurde für einige dieser Proteine gezeigt, daß sie untereinander Homo- und Heterodimere bilden, oder auch mit ARFs (*auxin response factor*) dimerisieren können. Die *ARF*-Genfamilie kodiert Transkriptionsfaktoren und umfaßt 23 Mitglieder, die ebenfalls untereinander dimerisieren können (Ouellet *et al.*, 2001). ARF1 bindet an spezifische Promotorelemente, die für Auxin-regulierte Genexpression verantwortlich sind (Ulmasov *et al.*, 1997a).

Als mögliche Rezeptoren für Auxin werden auxinbindende Proteine (ABPs) angesehen. Homologe Gene wurden in mehreren Pflanzenspezies identifiziert, u.a. in *A. thaliana* (Palme *et al.*, 1992). ABP-Proteine sind ca. 22 kDa groß und besitzen ein ER-Retentionssignal. ZmABP1 wurde immunocytochemisch im ER, Cytosol und Zellkern detektiert (Bronsema *et al.*, 1998). Bis jetzt wurde noch nicht eindeutig nachgewiesen, daß es Plasmamembran assoziiert ist, obwohl physiologische Versuche daraufhin deuten. Denn ABP1-Antikörper, appliziert auf Tabak- bzw. Maisprotoplasten, bewirken auxinspezifische Reaktionen, wie die Hyperpolarisation des Membranpotentials, sowie ein Anschwellen der Protoplasten (Venis *et al.*, 1992; Steffens *et al.*, 2001). Die Bedeutung des Proteins zeigt sich auch darin, daß ein

knock out des *ABPI*-Gens von *A. thaliana* Embryo-lethal wirkt (Chen *et al.*, 2000). Die Struktur dieses Proteins wurde jüngst aufgeklärt (Woo *et al.*, 2002). Als Protein mit „*barrel*“ Struktur gehört es zur Gruppe der Cupine. Bekannte pflanzliche Mitglieder dieser Familie sind 7S *Seed Storage* Proteine.

Die Mechanismen, mit denen Pflanzen die Auxinverteilung zwischen einzelnen Zellen bzw. Geweben kontrollieren, sind noch weitestgehend unklar. Die Konzentration von freiem Auxin wird in einem komplexen Zusammenspiel von Auxinbiosynthese, reversibler Konjugation, irreversibler Oxidation und Transport vom Syntheseort zum Wirkort reguliert (Bandurski *et al.*, 1995). Dabei kommt dem Transport und seiner Regulation eine hohe Bedeutung zu, da nicht alle Gewebe Auxin produzieren (Lomax *et al.*, 1995).

1.2 Auxintransport

Auxin wird in vielen Geweben wie jungen Blättern, Sproßspitzen, Blüten und sich entwickelnden Samen synthetisiert (Normanly *et al.*, 1991). Vom apikalen Syntheseort gelangt es über verschiedene Transportmechanismen zur Basis und weiter bis in die Wurzelspitzen hinein.

In Pflanzen gibt es drei verschiedene klassische Transportarten, die miteinander verbunden sind: der nicht polare-, der laterale-, und der polare Auxintransport (PAT).

Da IAA eine schwache Säure (pK_s : 4,75) ist, kann sie in ihrer protonierten Form auch durch Diffusion über Zellmembranen in Geweben verteilt werden (Goldsmith, 1977).

1.2.1 Nicht-polarer Auxintransport

Morris und Thomas (1978) haben radioaktiv markiertes IAA auf Blätter gegeben und seine Verteilung beobachtet. Zuerst ließ es sich im Phloem der Blätter und anschließend im Leitbündelgewebe von Stengeln nachweisen. Dort erfolgte der IAA Transport sowohl acropetal (nach oben), als auch basipetal (nach unten). Ein ungerichteter Auxintransport wurde auch im vaskulären Gewebe von Wurzeln nachgewiesen (Lomax *et al.*, 1995). Dadurch werden Auxinkonjugate (z.B. Zucker-IAA) transportiert. Dieser Transportweg stimmt gut überein mit dem bekannten Phloem-basierenden Transport von inaktiven Auxinkonjugaten

(Nowacki *et al.*, 1980). Er erfolgt relativ schnell (5-20 cm/h) und ist insensitiv gegenüber Inhibitoren des polaren Auxintransports.

1.2.2 Lateraler Auxintransport

Cholodny und Went versuchten in den 20er Jahren des 20. Jahrhunderts zu erklären, wie Auxin von der Sproßspitze zur Basis gelangt und wie die Krümmung des Stengels bei Stimulation durch Licht oder Schwerkraft zustande kommt. Das mündete in der Cholodny-Went-Hypothese, die, vereinfacht ausgedrückt, besagt, daß differentielles Zellwachstum an gegenüberliegenden Seiten durch radiale Auxingradienten verursacht wird, die wiederum durch lateralen Auxintransport erzeugt werden (Went, 1974; Firn *et al.*, 2000). Die molekularen Mechanismen der lateralen Auxintransports sind nur ansatzweise bekannt. Epel *et al.* (1992) vermuteten einerseits einen radialen symplastischen Transport über Plasmodesmata aus dem polaren Transportsystem heraus, andererseits wurde ein anionenspezifischer Carrier postuliert.

1.2.3 Polarer Auxintransport

Der polare Auxintransport (PAT) ist verbunden mit freiem Auxin und wird als der entwicklungsphysiologisch relevanteste Transportweg für Auxin angesehen (Lomax *et al.*, 1995). Der PAT im vaskulären Gewebe erfolgt im Gegensatz zum nicht-polaren Auxintransport gerichtet, ist ca. 10fach langsamer (5-20 mm/h) (Goldsmith, 1977) und ist blockierbar durch spezifische Inhibitoren. Im Stengel erfolgt der PAT strikt in basipetaler Orientierung hin zur Wurzel. Polarer und nicht-polarer Transport sind hier miteinander verbunden: IAA, das aus dem Phloem assoziierten Transport aus Blättern stammt, wurde in Xylem-Parenchymzellen, in denen PAT stattfindet (Goldsmith, 1977), detektiert (Cambridge und Morris, 1996). In Wurzeln von *A. thaliana* wurde sowohl ein acropetaler Transport im Zentralzylinder zur Spitze, als auch ein basipetaler zurück in Richtung Wurzelbasis gemessen (Rashotte *et al.*, 2000). In



Abb. A: Schematische Darstellung des PAT. Auxin wird, ausgehend vom Syntheseort in jungen Geweben, über das vaskuläre Gewebe des Sproßes in die Wurzel transportiert. In der Wurzelspitze erfolgt eine Umverteilung in den über Zellen der Epidermis verlaufenden, basipetalen Auxintransportweg.

Wurzeln von *Vicia faba* wurde gezeigt, daß basipetaler Auxintransport hauptsächlich über die äußere Zellschicht der Epidermis erfolgt (Tsurumi und Ohwaki, 1978). Beide Transportwege scheinen durch lateralen Auxintransport über die Columella-Zellen der Wurzelspitze miteinander verbunden zu sein (Young *et al.*, 1990; Friml *et al.*, 2002b).

Aufgrund von Transportstudien wird angenommen, daß der polare Auxintransport apoplastisch durch Zell-zu-Zell-Transport erfolgt und nicht über Plasmodesmata (Cande und Ray, 1976, Goldsmith, 1977; Epel *et al.*, 1992). Der Transport ist mit überschüssigem Auxin saturierbar und benötigt einen pH-Gradienten und ein Membranpotential über die Plasmamembran, das aufrechterhalten wird durch H^+ -ATPase-Aktivität (Benning, 1986). Dies sind klare Hinweise auf einen aktiven, Transporter vermittelten Mechanismus.

Die molekularen Grundlagen des polaren Auxintransports sind bis dato lediglich ansatzweise charakterisiert. Ein brauchbares Konzept zur Beschreibung des Transports auf zellulärer Ebene stellt noch immer die „chemiosmotische Hypothese“ dar (Goldsmith, 1977, Rubery und Sheldrake, 1974).

In Zellwänden mit einem pH-Wert von 5,5 ist ca. 15% des IAA (pK_s : 4,75) protoniert (IAAH), so daß es leicht über die Plasmamembran ins Cytoplasma (pH 7,0) diffundieren kann. Dort liegt es zu ca. 99% als IAA^- Anion vor, das nicht durch Diffusion die Zelle verlassen kann und somit aus dem Diffusionsgleichgewicht entzogen ist und daher mehr IAAH von Außen nachströmt. Überdies gibt es eine Transporter vermittelte Aufnahme durch

Auxininflux-Carrier Proteine. Der Export erfolgt passiv durch den elektrochemischen Gradienten über die Plasmamembran hinweg und ist sowohl spezifisch inhibierbar als auch saturierbar. Deswegen wurde dafür ein basal lokalisiertes plasmamembranständiges Molekül, der Efflux-Carrier, postuliert. Die Auxintransportrichtung sollte durch Anreicherung des Efflux-Carriers am basalen Zellende bestimmt sein (s. Abb. B).

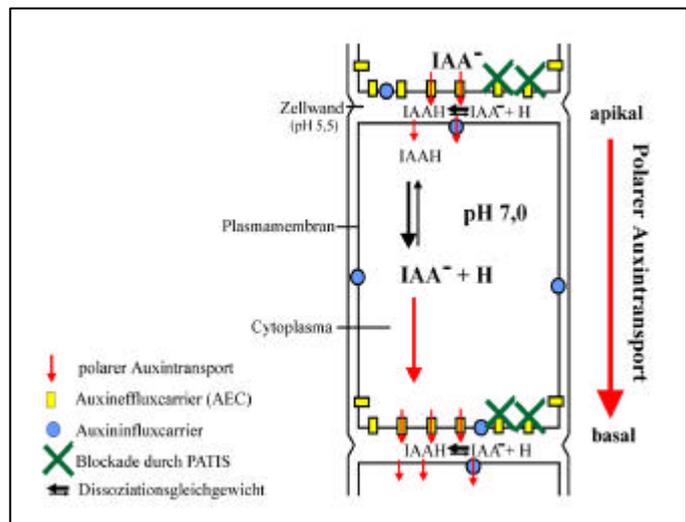


Abb. B: Schematische Darstellung der chemiosmotischen Hypothese des polaren Auxintransports. PATIS: polare Auxintransportinhibitoren, zur Erläuterung siehe 1.1.4 und 1.1.5

1.2.4 Physiologische Bedeutung des polaren Auxintransports

Die meisten Erkenntnisse über die Wirkungsweise des polaren Auxintransportsystems wurden durch Studien mit spezifischen Hemmstoffen (PATIS) erzielt. Inhibitoren des Efflux-Carriers sind synthetische Substanzen, Phytotropine genannt, wie z.B. 1-Naphthylphthalamidsäure (NPA), 1-Pyrenoylbenzoesäure (PBA) und 2,3,5-Trijodbenzoesäure (TIBA) (zur Übersicht: Rubery *et al.*, 1990). Als natürliche, endogene Regulatoren des polaren Auxintransports (PAT) werden Flavonoide angesehen (Jakobs und Rubery, 1988; Brown *et al.*, 2001). Der Influx-Carrier wird spezifisch inhibiert durch 1-Naphthoxylsäure (1-NOA) und 3-chloro-4-hydroxyphenylsäure (CHPAA) (Imhoff *et al.*, 2000). In letzter Zeit haben auch Mutanten bei der Untersuchung des PAT eine höhere Bedeutung gewonnen.

Embryonalentwicklung

Polar transportiertes Auxin wird als ein Mechanismus für die Etablierung der Polarität in Pflanzenzellen angesehen. Es wird angenommen, daß der kontinuierliche, gerichtete Strom von Auxin durch sich entwickelnde Zellen die polare Differenzierung derselben steuert (Sachs, 1991). Mittels radioaktiv markiertem Auxin wurde polarer Auxintransport bereits in Embryonen von mono- und dikotyledonen Pflanzen nachgewiesen (Greenwood und Goldsmith, 1970; Frey und Wangermann, 1976). Applikation von Phytotropinen zu somatischen Embryonen aus einer Karotten-Kallus-Kultur verhinderte den Übergang vom globulären zum herzförmigen Stadium und führte zu globulären Riesenembryos (Schiavone, 1987). In Embryonen von *Brassica juncea* (Senf) störte NPA die Anlage von zwei getrennten Keimblattprimordien und führte zu einem einzigen radialsymmetrischen, schüsselförmigen Keimblatt (Liu *et al.*, 1993). Die Analyse der *gnom*-Mutante aus *A. thaliana* ergab Hinweise auf die Bedeutung des intrazellulären Vesikeltransports beim PAT. GNOM ist ein Protein mit Guanin-Nukleotid-Austausch-Aktivität für ARF-GTPasen. Diese Proteine spielen eine Rolle im Vesikeltransport zwischen dem Golgi-Apparat und der Plasmamembran (Steinmann *et al.*, 1999). *Gnom*-Embryonen zeigen eine gestörte apikal-basal Polarität mit fusionierten oder falsch positionierten Kotyledonen. Diese Veränderungen wurden ebenfalls bei einer Embryonenkultur beobachtet, die in Anwesenheit von Auxintransportinhibitoren kultiviert wurde (Berleth und Jürgens, 1993).

Entwicklung des vaskulären Gewebes und der Blätter

Die Inhibierung des PAT durch NPA bewirkte eine verstärkte Bildung von vaskulärem Gewebe. Das vaskuläre Gewebe in Organprimordien entwickelt sich aus provaskulären Zellen und wächst polar als kontinuierlicher Strang, bis es Verbindung zum Sproßleitgewebe hergestellt hat. Verwundungsexperimente haben gezeigt, daß in bereits fertig differenzierten Organen unterbrochenes vaskuläres Gewebe durch sich neu entwickelnde Stränge ersetzt werden kann, was auf eine Selbstorganisation hindeutet (zur Übersicht Lyndon, 1990). Die molekularen Mechanismen sind nicht bekannt, jedoch scheint Auxin in diesem Prozeß eine wichtige Rolle zu spielen. Pflanzen mit erhöhtem Auxingehalt sind stärker vaskularisiert; und die Applikation von Auxin auf entwickelte Organe führt, von Parenchymzellen ausgehend, zur Bildung von neuem vaskulärem Gewebe (Jacobs, 1952; Klee *et al.*, 1987). Die Induktion von vaskulären Strängen durch exogenes Auxin erfolgt vom Applikationsort ausgehend nur basal und nicht apikal, was darauf hindeutet, daß der polare Auxintransport in die Vermittlung dieser Auxin-abhängigen Wachstumsantwort eingebunden ist (Sachs 1981/1991). Bei der Entwicklung des vaskulären Gewebes scheint Auxin auch auf die Transkription von Genen zu wirken. Die *monopteros (mp)* Mutante aus *A. thaliana* weist in ihrer Embryonalentwicklung, genauso wie *gnom*, Störungen in der Ausbildung der apikal-basal-Polarität auf (Berleth und Jürgens, 1993). Adulte Pflanzen haben unterbrochene vaskuläre Stränge und einen stark reduzierten polaren Auxintransport (Przemeck *et al.*, 1996). Das *MP*-Gen kodiert einen Transkriptionsfaktor der ARF-Familie (*auxin response factor*) und ist in sich entwickelndem vaskulärem Gewebe exprimiert (Hardtke *et al.*, 1998). Es wurde spekuliert, daß MP die Expression von Komponenten des Auxintransportsystems reguliert (Steinmann *et al.*, 1999); andererseits könnte der reduzierte polare Auxintransport aber auch das Resultat eines stark gestörten vaskulären Gewebes sein, ohne daß MP direkt daran beteiligt ist.

Mehrere Versuche haben gezeigt, daß die Entwicklung von Blättern in mindestens zwei Aspekten durch den PAT stark beeinflusst wird: Das Wachstum und die Verzweigung des vaskulären Gewebes (i) ist sensitiv gegenüber NPA (Mattson *et al.*, 1999) und das differentielle Zellstreckungswachstum (ii) an Blattoberseite und –unterseite kann durch NPA verändert werden (Hayes und Lippincott; 1976, Hayes, 1981).

Wurzelentwicklung

An der Seitenwurzelentwicklung ist basipetal, vom Sproß in die Wurzel transportiertes Auxin beteiligt. Tomatenkeimlinge, angezogen auf Medium mit NPA oder TIBA, entwickeln keine Seitenwurzeln (Muday und Hayworth, 1994). Es wurde außerdem gezeigt, daß durch

Applikation von NPA an den Sproß-Wurzel-Übergang von *A. thaliana*-Keimlingen die Entwicklung von Seitenwurzeln aus Zellen des Perizykel unterbunden wurde (Reed *et al.*, 1998). Der polare Auxintransport ist zudem von großer Bedeutung für das gravitrope Wurzelwachstum. Schon niedrige Konzentrationen von Transportinhibitoren können die Neuorientierung von Wurzeln nach gravitropen Stimuli verhindern. In *A. thaliana* wurde festgestellt, daß NPA sowohl den acropetalen Transport zur Wurzelspitze, als auch den basipetalen von der Wurzelspitze weg zur Wurzelbasis reduziert (Rashotte *et al.*, 2000). Gemäß der Cholodny-Went-Hypothese werden Tropismen durch asymmetrische Auxinverteilungen bewirkt. Diese wiederum werden durch differentiellen Auxintransport erzeugt. Bei gravistimulierten Wurzeln akkumuliert in Zellen an der erd zugewandten Wurzelseite mehr Auxin als in gegenüberliegenden Zellen, wodurch die Zellstreckung reduziert wird. Bei gleichzeitigem Wachstum der Zellen an der anderen Seite kommt es zu einer Krümmung der Wurzelspitze in Richtung des Schwerkraftvektors (zur Übersicht Firm *et al.*, 2000). Hinweise auf die Richtigkeit der Hypothese wurden in letzter Zeit erbracht: Das β -Glucuronidase-Gen, exprimiert unter der Kontrolle des Auxin-induzierbaren *DR5*-Promotorelements in *A. thaliana*, führte in gravistimulierten Wurzeln zu einem verstärkten Signal an der Gewebeunterseite, was durch Zugabe des Auxintransportinhibitors NPA unterdrückt wurde (Rashotte *et al.*, 2001; Ottenschläger, 2002).

1.2.5 Der Auxinefflux-Carrier und seine Regulation

Der Auxinefflux-Carrier besteht aus mehreren Proteinen, und seine Aktivität ist durch Kinase- und Phosphatase-Aktivität, Protein-*turnover*, Vesikeltransport und das Cytoskelett reguliert (zur Übersicht Muday und DeLong, 2001). Bei seiner Untersuchung waren die Inhibitoren des polaren Auxintransports (PATIS) sehr hilfreich. In Transportstudien mit radioaktiv markiertem IAA auf Tabak-Zellkulturen und in Membranvesikeln von Zucchini und Mais führte die Zugabe von PATIS wie z.B. NPA oder TIBA, durch Inhibierung des Auxinefflux, zu einer erhöhten Akkumulation von IAA (Delbarre *et al.*, 1996; Hertel *et al.*, 1983; Heyn *et al.*, 1987). In Sproßachsen inhibierten PATIS den basipetalen Auxintransport (Okada *et al.*, 1991).

Die molekularen Wirkungsweisen dieser Substanzen sind noch weitestgehend unverstanden. Es ist unklar, ob sie auf den postulierten Auxinefflux-Carrier direkt, oder über andere, periphere Membranproteine, oder mit dem Cytoskelett assoziierten Proteinen, wirken, da in verschiedenen subzellulären Fraktionen NPA-Bindungsaktivitäten nachgewiesen worden sind:

Über Bindung von tritiiertem NPA an Plasmamembran-Proteinfractionen und anschließender schrittweiser Solubilisierung der NPA-Bindungsaktivität wurde gefolgert, daß das NPA-bindende Protein (NBP) ein integrales Membranprotein ist. Einzelne Proteine konnten allerdings nicht isoliert werden (Bernasconi *et al.*, 1996). Neuerdings konnten über NPA-Affinitätschromatographie die ABC-Transporter ähnliche integralen Membranproteine AtMDR1 und AtPGP1 isoliert werden (Noh *et al.*, 2001). In Untersuchungen an *inside-out*-Membranvesikeln wurde das NBP als ein an der Cytoplasmaseite lokalisiertes, peripheres Membranprotein beschrieben (Hertel *et al.*, 1983; Dixon *et al.*, 1986). Weiterhin wurde das NBP als Actin-Cytoskelett assoziiertes Protein beschrieben. (Cox und Muday, 1994; Butler *et al.*, 1998). Eine Behandlung von Korn- und Zucchini-Hypokotylen mit Cytochalasin D, welches das Actin-Cytoskelett destabilisiert, führte zu einer Reduktion des PAT (Cande *et al.*, 1973; Butler *et al.*, 1998). Die verschiedenen Untersuchungen zeigen, daß es mehrere PATIS-bindende Proteine gibt, die an der Regulation des Auxinefflux beteiligt sind. In Plasmamembranvesikeln von Zucchini wurden z.B. zwei PATIS-Bindungsstellen mit verschiedenen Affinitäten für NPA und PBA identifiziert (Michalke *et al.*, 1992). Für einen komplexen, aus mindestens zwei Proteinen aufgebauten Auxinefflux-Carrier - nämlich einer katalytischen -, und einer NPA-bindenden regulatorischen Untereinheit- sprechen auch Beobachtungen in *Chara Vulgaris* (Grünalge): Dort wurde ein saturierbarer Auxinefflux gemessen, der nicht durch NPA inhibiert wurde; überdies konnte keine NPA-Bindungsaktivität nachgewiesen werden (Dibb-Fuller und Morris, 1992). Der Auxinefflux scheint zudem über die Proteindichte der Auxinefflux-Carrier-Komponenten an der Plasmamembran und nicht durch Proteindegradation reguliert zu sein: Die Behandlung von Zucchini-Hypokotylsegmenten und Tabak-Zellkulturen mit Brefeldin A (BFA), einem Inhibitor der durch den Golgi-Apparat vermittelten Vesikelsekretion, blockierten den Auxinefflux. Die Hemmung der Proteinbiosynthese durch Cycloheximid veränderte den Auxintransport nicht über einen Zeitraum von 80 min (Robinson *et al.*, 1999; Delbarre *et al.*, 1998). Diese Ergebnisse zeigen, daß die essentiellen Komponenten des Auxinefflux-Carriers eine hohe Stabilität besitzen. Es liegen klare Hinweise für eine Regulation des Auxinefflux durch Proteinphosphorylierung vor: Die Inhibierung des Auxinefflux in Tabak-Zellkulturen durch Kinaseinhibitoren wie z.B. Staurosporin zeigt, daß der Auxinefflux durch Phosphorylierung positiv reguliert wird (Delbarre *et al.*, 1998). Tyrosinkinase-Inhibitoren führten zu einer verminderten Inhibierbarkeit durch NPA, was zeigt, daß die Aktivität regulatorischer Proteine des Auxinefflux-Carriers durch Phosphorylierung moduliert wird (Bernasconi *et al.*, 1996).

1.2.6 Molekulare Komponenten des polaren Auxintransportsystems

Regulatorische Proteine

Biochemische Ansätze zur Identifizierung von Proteinen, die am polaren Auxintransport beteiligt sind, waren aufgrund technischer Schwierigkeiten nur partiell erfolgreich. Dabei wurde versucht, mittels radioaktiv markierter Auxine und Auxintransportinhibitoren bzw. deren radioaktiv markierte Azido-Verbindungen, Proteine spezifisch zu markieren (zur Übersicht Palme 1993; Libbenga und Mennes, 1995). Die anschließende Proteinaufreinigung erwies sich jedoch als sehr problematisch, so daß die Sequenz und das dazugehörige Gen in den meisten Fällen nicht ermittelt werden konnte.

Größere Fortschritte bei der Aufklärung des polaren Auxintransports gelangen durch die Analyse von *A. thaliana*-Mutanten und den dazugehörigen Genen.

Einige Mutanten wurden aufgrund ihrer verringerten Sensitivität gegenüber Auxintransportinhibitoren isoliert. *tir1* (*t*ransport *i*nhibitor *r*esponse) z.B. ist weniger sensitiv gegenüber NPA und Auxin und kodiert für ein F-Box Protein (Ruegger *et al.*, 1997/1998). Homologe Proteine aus Hefe sind im Ubiquitin-vermittelten Proteinabbau involviert. Dies deutet darauf hin, daß die Regulation des polaren Auxintransports auch über Proteindegradation erfolgen kann. Die *tir3*-Mutante zeigt eine reduzierte Apikaldominanz, verkürzte Wurzeln und Triebe und bildet außerdem weniger Seitenwurzeln. Überdies zeigt sie einen stark reduzierten polaren Auxintransport und besitzt weniger NPA-Bindungsstellen (Ruegger *et al.*, 1997). *TIR3* kodiert ein 560 kDa großes Protein, auch wegen seiner Größe BIG genannt. Das *BIG*-Gen weist Sequenzähnlichkeiten zu *Calossin/Pushover* Genen aus *D. melanogaster* und *C. elegans* auf. Diese Gene sind möglicherweise wichtig für den Vesikeltransport (Gil *et al.*, 2001).

Die Wurzel der *rcn1*-Mutante (*r*oot *c*urling on *NPA*) wächst auf NPA-haltigem Medium nicht gerade nach unten, sondern zeigt ein ausgeprägt wellenförmiges Wachstum mit gestörtem Gravitropismus und verringertem Wurzellängenwachstum (Garbers *et al.*, 1996). Der acropetale Auxintransport in Wurzeln ist nicht verändert, aber nahezu insensitiv gegenüber Inhibierung durch NPA. Dagegen ist der basipetale Auxintransport stark erhöht, zeigt aber eine normale Sensitivität gegenüber NPA. Die physiologischen Veränderungen der *rcn1*-Mutante konnten durch Behandlung von Keimlingen mit dem Phosphataseinhibitor Cantharidin phänokopiert werden (Rashotte *et al.*, 2001; Garbers *et al.*, 1996). Das *RCN1*-Gen kodiert eine Proteinphosphatase 2A-Untereinheit. Dies verdeutlicht, neben den oben

erwähnten Daten, daß die verschiedenen Richtungen des polaren Auxintransports auf unterschiedliche Weise durch Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung reguliert werden .

Direkt am polaren Auxintransport beteiligte Proteine

Seit wenigen Jahren sind Proteine bekannt, deren Eigenschaften und Mutanten-Phänotypen eine direkte Beteiligung am PAT anzeigen. Besonders zu erwähnen sind AUX1, PIN-Proteine und PINOID:

AUX1

Das *AUX1*-Gen kodiert ein Membranprotein mit Homologie zu pflanzlichen Aminosäurepermeasen. Von diesem Protein wird angenommen, daß es eine entscheidende Rolle bei der zellulären Aufnahme von Auxin besitzt (Bennett *et al.*, 1996). *Aux1*-Mutanten in *A. thaliana* zeigen ein gravitrop gestörtes Wurzelwachstum. Der Phänotyp von *aux1*-Mutanten kann durch Behandlung von Wildtyp-Pflanzen mit spezifisch den Auxininflux inhibierenden Substanzen 1-NOA und CHPAA phänokopiert werden (Parry *et al.*, 2001). Ein weiterer Hinweis auf einen verringerten Auxin-Import ist, daß das membranpermeable Auxin 1-NAA, aber nicht die weniger hydrophoben Auxine IAA und 2,4-D, deren Aufnahme in die Zelle hauptsächlich über Carrier vermittelten Transport erfolgt, die Defekte in *aux1*-Mutanten kompensieren kann (Marchant *et al.*, 1999).

Mehrere Untersuchungen legen nahe, daß der Ausfall der AUX1-Proteinfunktion zu einem reduzierten acropetalen Auxintransport (von der Basis zur Spitze) in Wurzeln führt: Mittels tritiierten Auxinen wurde gezeigt, daß in Wurzelspitzen von *aux1*-Mutanten weniger 2,4-D, aber genauso viel 1-NAA akkumuliert wie in Wildtyp-Pflanzen. Zudem wurde in quantitativen massenspektroskopischen Untersuchungen weniger Auxin in Wurzelspitzen von *aux1*-Mutanten detektiert (Marchant *et al.*, 1999; Swarup *et al.*, 2001) und eine reduzierte Anzahl von Seitenwurzeln, deren Wachstum u.a. durch acropetal transportiertes Auxin induziert wird, festgestellt (Marchant *et al.*, 2002; Reed *et al.*, 1998). In Übereinstimmung mit der möglichen Funktion von AUX1 als Auxininflux-Carrier ist das Protein in Zellen des Zentralzylinders der Wurzel am basalen (oberen) Ende lokalisiert, was mit der Auxintransportrichtung in diesem Gewebe korreliert (Swarup *et al.*, 2001).

PIN-Proteine

PIN-Proteine werden als katalytische Untereinheiten des Auxinefflux-Carrier diskutiert (Palme und Gälweiler, 1999). Sie sind membranständige Proteine mit zwei N- und C-terminalen hydrophoben Bereichen, mit jeweils 5-6 putativen Transmembrandomänen (s. Abb. C) und weisen eine ähnliche Topologie wie pro- und eukaryotische Transportproteine der MFS-Gruppe (*major facilitator superfamily*) auf. MFS-Proteine sind beteiligt am Transport von Ionen und kleinen organischen Molekülen (zur Übersicht Pao *et al.*, 1998). Die PIN-Proteinfamilie in *A. thaliana* umfaßt 8 Mitglieder mit über 60% identischen Aminosäuresequenzen. Aus den monokotyledonen Pflanzen *Zea mays* (Mais) und *Oryza sativa* (Reis) sind ebenfalls *PIN*-Gene bekannt: In Mais wurden bisher 3 *PIN*-Gene identifiziert, deren Proteine im Vergleich zu den Homologen in *A. thaliana* mit über 60% Identität sehr hoch konserviert sind (Tietz, 1997). 4 *PIN*-Gene aus *A. thaliana* wurden bisher hinsichtlich ihrer Expressionsprofile und Mutanten-Phänotypen charakterisiert.

Das erste bekannte *PIN*-Gen, *AtPIN1*, wurde über die im polaren Auxintransport defiziente *pin1*-Mutante isoliert, die *pin*-förmige (*pin* (engl.): Nadel), blütenlos endende Infloreszenzen ausbildet. Die detaillierte Charakterisierung dieser Mutante ergab weitere Hinweise auf die Beteiligung des AtPIN1-Proteins am PAT: So zeigen *pin1*-Mutanten Störungen in der Entwicklung und Anordnung (Phyllotaxis) von lateralen Organen (Goto *et al.*, 1987; Okada *et al.*, 1991, Bennett *et al.*, 1995). Diese Defekte sind zurückzuführen auf eine gestörte Zellentwicklung an der Peripherie des apikalen Sproßmeristems (Vernoux *et al.*, 2000). Da die punktuelle Applikation von Auxin auf den Apex von *pin1*-Mutanten zur Induktion von Blüten führte, liegt die Vermutung nahe, daß hier eine Störung der Auxinhomeostase oder des Auxintransports vorliegen könnte. (Reinhardt *et al.*, 2000). In AtPIN-Promotor-GUS-Analysen wurde festgestellt, daß *AtPIN1* im gesamten vaskulären Gewebe von *A. thaliana* exprimiert wird (T. Teichmann, persönliche Mitteilung). Mittels spezifischer Antikörper wurde AtPIN1 im Cambium und Xylem-Parenchymzellen von Infloreszenzen und im Zentralzylinder von Wurzeln detektiert. Interessanterweise ist AtPIN1 nur am unteren Ende der Zellen lokalisiert, was mit der Richtung des Auxinstroms in diesen Geweben und einer möglichen Funktion von AtPIN1 als katalytische Untereinheit des Auxinefflux-Carrier korreliert (Gälweiler *et al.*, 1998; Friml *et al.*, 2002b) Somit könnte AtPIN1 den in der „chemiosmotischen Hypothese“ (s. 1.1.3) postulierten Auxintransporter repräsentieren (Palme und Gälweiler, 1999). In Übereinstimmung damit ist in Sproßachsen von *pin1*-Mutanten der PAT stark reduziert (Okada *et al.*, 1991; Bennett *et al.*, 1995). Zudem können durch Wachstum von Wildtyp-Pflanzen auf NPA-haltigem Medium einige morphologische

Defekte der *pin1*-Mutante wie z.B. die verstärkte Vaskularisierung des Gewebes und die nadelförmige Infloreszenzspitze erzeugt werden (Gälweiler *et al.*, 1998). Brefeldin A (BFA) ein Inhibitor des PAT, der auf die intrazelluläre Vesikelsekretion wirkt, führt zu einem Herauslösen von AtPIN1 aus der Plasmamembran und zu Aggregation in noch nicht näher charakterisierten Kompartimenten, evtl. Endosomen. Dieser Prozeß ist reversibel und unabhängig von der *de novo* Proteinsynthese und deutet auf Zyklieren von AtPIN1 zwischen „Endosomen“ und der Plasmamembran hin. (Geldner *et al.*, 2001). Diese Eigenschaften von AtPIN1 stimmen überein mit einem stabilen und einem hohen *turn over* unterliegenden Auxinefflux-Carrier (s. 1.1.5).

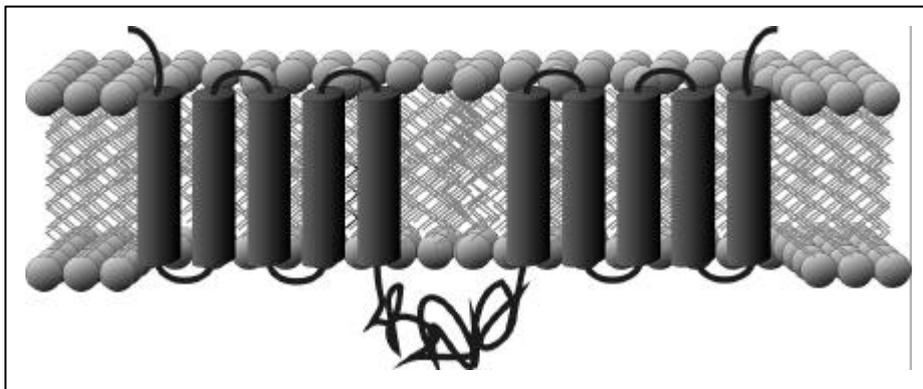


Abb. C: Modellhafte Darstellung der AtPIN1-Topologie (aus Gälweiler *et al.*, 1998).

Ein anderes Mitglied der AtPIN-Familie, **AtPIN2** (allelisch zu AGR1/EIR1/WAV6), ist in den äußeren Zellschichten der Wurzel exprimiert und weist eine basale intrazelluläre Lokalisierung auf (Müller *et al.*, 1998). *Atpin2*-Mutanten zeigen neben einem agravitropen Wurzelwachstum, in der Wurzel einen stark reduzierten basipetalen Auxintransport (von der Wurzelspitze zur Basis) (Chen *et al.*, 1998; Luschnig *et al.*, 1998; Müller *et al.*, 1998; Rashotte *et al.*, 2000). Sowohl diese Beobachtungen als auch die Transportertopologie und die basale zelluläre Lokalisierung in der Richtung des Auxinstroms deuten auf AtPIN2 als eine Porenkomponente des Auxinefflux-Carrier hin. Untersuchungen in Hefe stützen diese Vermutung: Wird AtPIN2 in Hefe exprimiert, so sind die Zellen resistent gegenüber normalerweise toxischem 5-Fluoro-Indol, was durch den Transport der Substanz aus den Zellen heraus erklärt werden kann (Luschnig *et al.*, 1998). Außerdem wurde in Transportuntersuchungen festgestellt, daß AtPIN2 exprimierende Hefe-Zellen schneller radioaktiv markiertes Auxin verlieren als die entsprechenden Kontrollen (Chen *et al.*, 1998). Es liegen allerdings auch Beobachtungen vor, die gegen eine Transporterfunktion von AtPIN2 sprechen. In *A. thaliana*-Doppelmutanten der AtPIN2-Mutantenallele *eir1-1* und *agr1* mit

rcn1, defekt in einer Phosphatase 2A Untereinheit, wurde der basipetale Auxintransport in Wurzeln gemessen: *rcn1* zeigt einen erhöhten, und *eir1-1/agr1* einen reduzierten Transport (Rashotte *et al.*, 2000, 2001). Der basipetale Auxintransport in den Doppelmutanten *eir1-1/agr1 x rcn1* ist nicht reduziert, sondern genauso stark erhöht wie in der *rcn1*-Mutante (Rashotte *et al.*, 2001). Wäre AtPIN2 die katalytische Komponente des Auxinefflux-Carrier, so müßte sein Funktionsausfall limitierend sein, d.h. in Doppelmutanten würde der Auxintransport auf das Niveau von *eir1-1* bzw. *agr1* reduziert sein. Da allerdings die Mutation in *RCN1* dominant gegenüber der Mutation in *AtPIN2* ist, erscheint eine regulatorische Funktion von AtPIN2 im basipetalen Auxintransport als wahrscheinlich.

Arabidopsis Mutanten in *AtPIN3*- und *AtPIN4*-Genen zeigen ebenfalls mit Defekten im Auxintransport bzw. der Auxinhomeostase verbundene, phänotypische Veränderungen. Hypokotyle und Wurzeln von *Atpin3*-Mutanten weisen leichte gravitrope Wachstumsstörungen auf (Friml *et al.*, 2002a). Das Gravitrope Wurzelwachstum wird u.a. in den Columella-Zellen der Wurzelspitze gesteuert (zur Übersicht Friml *et al.*, 2000). In Columella-Zellen von gravitrimulierten Wurzeln ist AtPIN3 lateral lokalisiert, was auf seine Beteiligung am lateralen Auxintransport in Wurzelspitzen hindeutet (Friml *et al.*, 2002a).

Quantitative massenspektroskopische Analysen belegen, daß in Wurzelspitzen von *Atpin4*-Mutanten mehr IAA akkumuliert, und bei Zugabe von exogenem Auxin die Homeostase gestört ist (Friml *et al.*, 2002b).

Zusammen scheinen AtPIN-Proteine die drei Richtungen des Auxintransports in Wurzeln zu regulieren und legen folgendes Modell nahe: Acropetaler Transport: AtPIN1/4; Lateraler Transport: AtPIN3/4; Basipetaler Transport: AtPIN2 (s. Abb. D) (Friml und Palme, 2002).

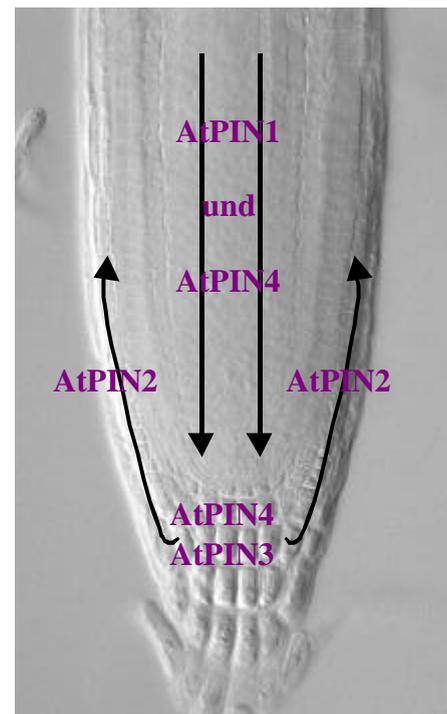


Abb. D: Schematische Darstellung der Lokalisierung von AtPIN1/2/3 und 4 in Wurzelspitzen und der Richtungen des Auxintransports in den verschiedenen Zelltypen.

Die stärksten Hinweise auf AtPIN-Proteine als Komponenten des Auxinefflux-Carrier sind die phänotypischen Änderungen der Infloreszenz und der reduzierte PAT in *pin1*-Mutanten (s. Abb. E). Sie treten allerdings in ähnlicher Weise auch bei anderen Mutanten auf und erlauben somit keinen eindeutigen Rückschluß auf die konkrete Funktion von AtPIN1 im PAT. *A. thaliana*-Mutanten in verschiedenen Genen haben ebenfalls *pin1*-typische nackte Infloreszenzspitzen, zeigen eine verstärkte Vaskularisierung und einen reduzierten polaren Auxintransport in Sproßachsen. Neben der oben aufgeführten *monopteros*-Mutante sind noch *ifl1/revoluta*, *pinoid* und *lop1/trn1*, dessen Genprodukt

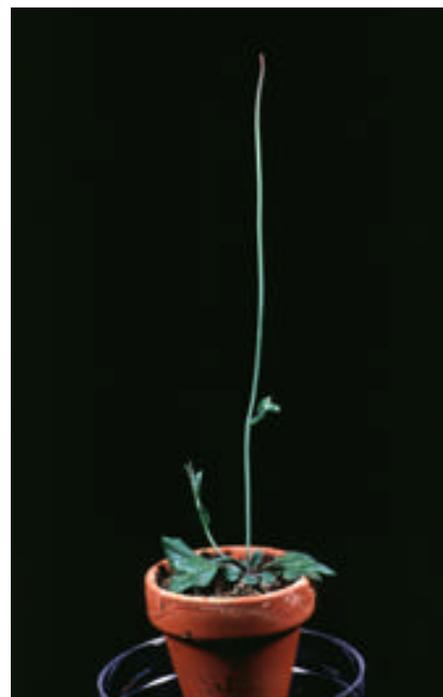


Abb. E: *pin1*-Mutante aus *A. thaliana*

noch nicht identifiziert wurde (Carland und McHale, 1996; Cnops *et al.*, 1996), zu nennen. Bei *ifl1/revoluta*-Mutanten wird in der Infloreszenz wenig bzw. gar kein interfaszikuläres Fasergewebe gebildet. Die Differenzierung des sekundären Xylemgewebes in vaskulären Stängen ist gestört, wobei die *AtPIN1*-Transkription unverändert ist (Zhong *et al.*, 1997; Zhong und Ye, 1999; Ratcliff *et al.*, 2001; Zhong und Ye, 2001). *IFL1* kodiert für ein *Homeodomain-Leucin-Zipper* Protein (HD-ZIP) mit bislang unbekannter Funktion (Zhong und Ye, 1999). HD-ZIP Proteine gehören zu einer Familie von Transkriptionsfaktoren die an verschiedenen pflanzlichen Entwicklungsprozessen, z.B. der Blütenentwicklung, beteiligt sind (Zhong und Ye, 2001). Es ist nicht klar ob *IFL1* direkt die Transkription von Komponenten des PAT kontrolliert, oder ob es nur an der Differenzierung von interfaszikulären Fasern beteiligt ist.

pinoid-Mutanten (*pid*) zeigen ähnlich starke Defekte in der Blütenentwicklung wie *pin1*-Mutanten und auch eine nackte Infloreszenzspitze. (Bennett *et al.*, 1995). *PID* kodiert für eine cytosolische Serin/Threonin-Kinase und wird in den äußersten Zellschichten von Organprimordien, im vaskulären Gewebe von Keimlingen, sowie in sich entwickelnden Blättern und Blüten exprimiert (Christensen *et al.*, 2000; Benjamins *et al.*, 2001). In Xylem-Parenchymzellen von Keimlingen sind *PID* und *AtPIN1* koexprimiert. Unter Berücksichtigung der ähnlichen Phänotypen und des reduzierten Auxintransports in beiden Mutanten deutet dies darauf hin, daß *AtPIN1* und *PID* gemeinsam an der Steuerung des polaren Auxintransports beteiligt sein könnten (Benjamins *et al.*, 2001). Dabei scheint *PID* als

positiver Regulator des PAT zu wirken. In *PID*-überexprimierenden Pflanzen ist das Wurzellängenwachstum reduziert, und das Wurzelmeristem kollabiert nach wenigen Tagen. Wurden die Pflanzen auf Medium mit niedrigen Konzentrationen des Auxintransport-Inhibitors NPA kultiviert, so wurden beide Defekte partiell kompensiert, was auf einen erhöhten PAT in diesen Pflanzen hindeutet (Benamins *et al.*, 2001).

1.3 Zielsetzung

Die Funktion von AtPIN1 ist bislang unbekannt. Hinweise auf seine Funktion wurden bis jetzt nur durch die Analyse von *Atpin1 knock out* Mutanten erbracht (*pin1* genannt). Neben Störungen der Entwicklung des vaskulären Gewebes, des Apikalmeristems und der Apikaldominanz zeigen diese Mutanten einen stark reduzierten polaren Auxintransport (PAT) in der Infloreszenz (Okada *et al.*, 1991; Bennett *et al.*, 1995). AtPIN1 wird daher als wichtige Komponente des Auxinefflux-Carriers (AEC) diskutiert. Diese Annahme stützt sich auf die phänotypischen Veränderungen in *pin1*-Mutanten, auf die Lokalisierung von AtPIN1 am unteren Ende in Xylem-Parenchymzellen der Infloreszenz (Gälweiler *et al.*, 1998) und in Zellen der Stele der Wurzelspitze (Friml *et al.*, 2002b), Gewebe, in denen PAT stattfindet, sowie auf Homologie zu MFS-Transportproteinen (*multi facilitator superfamily*).

Der Phänotyp der *pin1*-Mutante zeigt an, daß AtPIN1 eine wichtige Funktion in der Entwicklung von *Arabidopsis thaliana* besitzt. Allerdings ist er pleiotrop und nicht spezifisch für *pin1*, sondern tritt ähnlich auch bei anderen Mutanten (*pinoid*, *ifl1*, *monopteros*, siehe Einleitung) auf und läßt somit keine direkte Schlußfolgerung auf die Funktion von AtPIN1 zu.

- Zur Funktionsanalyse von AtPIN1 in *A. thaliana* sollten transgene Pflanzen erzeugt werden, die ein *AtPIN1*-cDNA-Konstrukt verstärkt exprimieren. In *AtPIN1*-überexprimierenden Pflanzen sollten phänotypische und auxintransportphysiologische Veränderungen untersucht werden.
- Um Hinweise auf die Bedeutung von AtPIN1 für die Auxinhomöostase zu erhalten, sollte in *AtPIN1*-überexprimierenden Pflanzen und *pin1*-Mutanten die Aktivität des auxinresponsiven Promotorelements *DR5* als Promotor-Reportgen-Fusion untersucht werden.

- Eine mögliche Funktion von AtPIN1 als Auxintransporter sollte in den heterologen Systemen *S. cerevisiae* und *Xenopus* Oozyten analysiert werden. Hierzu sollte die AtPIN1 in diesen Systemen exprimiert werden und Auxintransportassays entwickelt werden.
- Weiterhin sollten Auxintransportassays in *A. thaliana*-Suspensionskulturen etabliert werden, und der Einfluß einer AtPIN1-Überexpression auf den Auxinefflux bestimmt werden.
- Ähnliche Phänotypen von *pin1*- und *pid*-Mutanten deuten einen funktionellen Zusammenhang zwischen den Proteinen an. Es wird vermutet, daß die intrazelluläre polare Lokalisierung von AtPIN-Proteinen wichtig für ihre Funktion ist. In *PID*-überexprimierenden *A. thaliana* und in *pid*-Mutanten sollte deswegen immuncytochemisch die Lokalisierung von AtPIN1, 2 und 4 untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Enzyme

Die verwendeten Enzyme wurden von folgenden Firmen bezogen:

Kikkoman (Tokyo, Japan), *Merck* (Darmstadt), *New England Biolabs* (Schwalbach), *Roche Diagnostics* (Mannheim), *USB* (Cleveland, USA), *Yakkult Honsha* (Tokyo, Japan).

2.1.2 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien entsprachen dem Reinheitsgrad p.a. und wurden von folgenden Firmen bezogen:

Aldrich Chemie (Steinheim), *Amersham Pharmacia Biotech* (Uppsala, Schweden), *J.T. Baker*, (Griesheim), *BDH Biochemicals Ltd.* (Poole, Großbritannien), *Bethesda Research Laboratories* (Neu-Isenburg), *Biomol* (Hamburg), *Bio-Rad Laboratories* (München), *Calbiochem* (Frankfurt) *Difco Laboratories* (Detroit, USA); *Duchefa* (Haarlem, Niederlande), *Fluka* (Neu-Ulm) *Gibco BRL* (Karlsruhe), *Merck* (Darmstadt), *New England Biolabs* (Schwalbach), *Novabiochem* (Bad Soden), *Pierce Chemical Company* (Rockford, USA), *Roche Diagnostics* (Mannheim), *Rotem Ind.* (Beer-Sheva, Israel), *Roth* (Karlsruhe), *Serva* (Heidelberg), *Sigma* (München).

2.1.3 Bakterienstämme und Hefe

Escherichia coli

- DH5 α : F⁻, Φ 80dlacZ Δ M15, Δ (lacZYA-argF), U169, *endA1*, *recA1*, *hsdR17*, (*r_k⁻-m_k⁺*), *deoR*, *thi-1*, *supE44*, λ -, *gyrA96*, *relA1*
- DH10B: F⁻, *mrcA*, D(*mrr.hsdRMS-mcrBC*), F80dlacZDM15, DlacX74, *deoR*, *recA1*, *endA1*, *araD139*, D(*ara*, *leu*)7697, *galU*, *galK*, 1-, *rpsL*, *nupG*.
- JM109: F⁺, *traD36*, *lacI^q* Δ (lacZ), M15, *proA⁺B⁺/e14⁻* (McrA⁻), Δ (lac-proAB), *thi-1*, *gyrA96* (Naf), *endA1*, *hsdR17*, (*r_k⁻-m_k⁺*), *relA1*, *supE44*, *recA1* (Yanish-Perron *et al.*, 1985)

Agrobacterium tumefaciens

- GV3101: C58C1, Rif^R, Gm^R (Koncz und Schell, 1986)

Sacharomyces cerevisiae

- W303 Mata, *ade2*, *his3*, *leu2*, *ura3*, *trp1*, *can1*

2.1.4 Vektoren

Für E.coli

- pBlueskript SK(-)	Amp ^R (Stratagen, La Jolla, USA)
- pET28a:	Amp ^R (Novagen, Madison, USA)
- pRT100:	Amp ^R (Töpfer <i>et al.</i> , 1993)
- pQE31	Amp ^R /Kan ^R (Qiagen, Hilden)

für Pflanzen

-pGTV-KAN-DR5:: <i>GUS</i>	Kan ^R /Amp ^R (Ottenschläger, 2002)
-pS001-VS	Sul ^R /Amp ^R (B. Reiss, unveröffentlicht)
-pTA7002	Hyg ^R /Amp ^R (Aoyama und Chua, 1997)

für Hefe

-pYX112	Amp ^R /URA3 (Ingenius, Inc.)
---------	---

für Xenopus Oozyten

-pGEMHE	Amp ^R (Liman <i>et al.</i> , 1992)
---------	---

2.1.5 Geräte

Ultrafiltrationszelle, Ultrafiltrationsmembranen	<i>Amicon Corporation</i> , Danvers, USA
Spektralphotometer DU-40	<i>Beckman Instruments</i> , München
System Gold HPLC	
Szintillationszähler LS7500	
TRIO-Thermoblock	<i>Biometra</i> , Göttingen
Elektroporator	<i>Bio-Rad</i> , München
GT-1212B Digitalisiertablett	<i>Genius</i> , Cambridge, Großbritannien
Hybridisierungsofen HERAhybrid 6	<i>Heraeus</i> , Düsseldorf
Durst M301	<i>Jobo Fototechnic</i> , Ann Arbor, USA
CLSM, DMIRBE, TCS 4d	
Mikroskop, Aristoplan	
Mikroskop, DMRB	<i>Leica</i> , Wetzlar
Microtom, RM2065	
Vibrotom, VM3035	
CCD Kamera	<i>Marshall Electronics</i> , Cluver City, USA
Phosphorimager Storm 860	<i>Molecular Dynamics</i> , Sunnyvale, USA
SFM 25 Fluoreszenzspektrometer	<i>Kontron AG</i> , Zürich, Schweiz

GeneAmp™ PCR System 9600
Fluorimeter LS-2B
ABI Prism™ 377

Perkin Elmer, Weiterstadt

Stratalinker UV Crosslinker 1800

Stratgene, La Jolla, USA

ThermoQuest LCQ Classic

ThermoQuest, San Jose, USA

2.1.6 Datenverarbeitung

DISKUS

Carl H. Hilgers, Heidelberg

DNASTAR

Lasergene, Madison, USA

GPMAW 3.13

Lighthouse data, Raleigh, USA

ImageQuant 4

Molecular Dynamics, Sunnyvale, USA

Adobe Photoshop 4.01

Adobe Systems, L.A., USA

Origin 4.1

SPSS, Chicago, USA

Multi-ADAPT Software(modifiziert)

Ishikawa und Evans, 1997

2.1.7 Kulturmedien

2.1.7.1 Bakterienmedien

Die angegebenen Mengen wurden in 1 l bidest. H₂O gelöst, für Festmedien wurden 15 g Agar zugefügt, alle Medien wurden 20 Minuten autoklaviert.

LB: 10 g Trypton
 5 g Hefeextrakt
 5 g NaCl
 pH 7,5

TY-Medium: 16 g Trypton
 10 g Hefeextrakt
 5 g NaCl
 pH 7,5

YEB-Medium: 5 g Rinderextrakt
 1 g Hefeextrakt
 5 g Pepton
 5g Saccharose
 2mM MgSO₄
 pH 7,5

Je nach Resistenzgen in den verwendeten Vektoren wurden nach dem Autoklavieren 100 µg/ml Ampicillin bzw. 50 µg/ml Kanamycin hinzugefügt.

2.1.7.2 Hefe

Die angegebenen Mengen wurden in 1 l bidest. H₂O gelöst und 15 min autoklaviert.

YPD-Medium: 10 g Hefeextrakt
 20 g Glucose
 20 g Pepton
 pH 5,8

SD-Medium 6,7 g Hefestickstoffbasis ohne Aminosäuren
 20 g Glucose
 10 ml 100fache DO-Lösung
 pH 5,8

100fach DO (*drop out*) AS (pro l): 2g L-Adenin hemisulfat; 2g L-Histidin-HCL monohydrat; 10g L-Leucin; 2 g L-Tryptophan; 2 g L-Uracil; 3 g L-Isoleucin; 15 g Valin; 2 g L-Argenin; 3 g L-Lysin; 2 g L-Methionin; 5 g L-Phenylalanin; 2 g L-Threonin; 3 g Tyrosin.

Zur Selektion von auxotrophen Hefen wurden dem Medium alle Aminosäuren bis auf den entsprechenden Selektionsmarker zugegeben.

2.1.7.3 Pflanzenmedien

Die angegebenen Mengen wurden in 1 l bidest. H₂O gelöst.

ARA-Festmedium: 2,15 g Murashige und Skoog Basal-salt-mixture (*Sigma*)
 10 g Saccharose
 9 g Agar-Agar
 pH 6,0 mit KOH; 20 Minuten autoklavieren

Je nach Resistenz der ausgelegten Samen wurden nach dem Autoklavieren 15 µg/ml Hygromycin, 10 µg/l Sulfonamid bzw. 50 µg/ml Kanamycin hinzugefügt. ARA Flüssigmedium wurde ohne Agar-Agar angesetzt

2.1.7.4 Suspensionskulturmedien

Die angegebenen Mengen wurden in 1 l bidest. H₂O gelöst.

Festmedium: 4,3 g Murashige und Skoog Basal-salt-mixture (*Sigma*)
 0,1 g myo-Inositol

0,5 g MES
 30 g Saccharose
 pH 5,7 mit KOH; 20 Minuten autoklavieren

Festmedium wurde mit 3g/l Gelrite (*Roth*) angesetzt. Nach dem Autoklavieren wurden B-5 Vitamine (*Ducheve*) hinzugegeben. Je nach Resistenz der ausgelegten Kalli wurden nach dem Autoklavieren 15 µg/ml Hygromycin oder 10 µg/ml Sulfonamid hinzugegeben.

Zellkulturmedium (ZM) enthält außerdem 1mg/l 2,4-D.

Kallusinduktionsmedium (KIM): 0,5 mg/l 2,4-D, 0,5mg/l 9-iPAR und 2mg/l IAA

Regenerationsmedium (REG): 0,1 mg/l 1-NAA und 1 mg/l BAP

Wurzelinduktionsmedium (WIM):

5 g Saccharose
 2,2 g Gelrite
 5 ml Fe-EDTA Lösung
 5,8 ml CaCl₂ Lösung
 2,2 ml KI Lösung
 25 ml Makroelemente
 1 ml Mikroelemente
 10 ml B5-Vitamine
 1 mg IAA (nach 15 minütigem Autoklavieren)
 pH 5,8

Fe-EDTA Lösung: 5,56 g FeSO₄; 4,46 g Na₂EDTA

CaCl₂ Lösung: 75 g CaCl₂

KI Lösung: 375 mg

Makroelemente: 20 g NH₄NO₃; 40 g KNO₃; 7,4 g MgSO₄; 3,4 g KH₂PO₄; 2 g Ca(H₂PO₄)₂

Mikroelemente: 6,2 g H₃BO₃; 16,9 g MnSO₄; 8,6 g ZnSO₄; 0,25 g Na₂MO₄;

0,025 g CuSO₄; 0,025 g CoCl₂

B5-Vitamine: 0,1 g Nikotinsäure; 0,1 g Pyridoxin-HCl; 1 g Thiamin-HCl;

10 g myo-Inositol; 0,1 g Glycin

2.1.7.5 Antibiotika, Hormone, andere Stammlösungen und Antikörper

<u>Antibiotika</u>	<u>Stammlösung</u>	<u>Endkonzentration</u>
Ampicillin	100 mg/ml in H ₂ O	100 mg/l
Kanamycin	50 mg/ml in H ₂ O	50 mg/l
Sulfonamid	10 mg/ml in H ₂ O	10 mg/l
Hygromycin B	50 mg/ml in H ₂ O	15 mg/l
Gentamycin	10 mg/ml in H ₂ O	10 mg/l
Carbenecillin	100 mg/ml in H ₂ O	100 mg/l
Rifampicin	100 mg/ml in DMSO	100 mg/l
<u>Hormone</u>		
IAA	1 mg/ml in Ethanol	variabel
1-NAA	1 mg/ml in Ethanol	variabel
9IP	20 mg/ml in DMSO	variabel
NPA	500 mM in DMSO	variabel
2,4-D	5 mg/ml in Ethanol	variabel

andere Substanzen

Dexamethason	30 mM in Ethanol	variabel
IPTG	0,1 M in H ₂ O	0,2 mM (2 ml/l)
X-Gluc	10 % (w/w) in DMF	0,1 %
Ethidiumbromid	5 mg/ml in TE-Puffer	variabel

Antikörper

	<u>Referenz/Vertreiber</u>	<u>Eingesetzte Verdünnung</u>
polyklonaler anti-AtPIN1 IgG	Gälweiler <i>et al.</i> , 1998	1:2000 / 1:500 / 1:200 / 1:50
polyklonaler anti-AtPIN2 IgG	Müller <i>et al.</i> , 1998	1:600 / 1:50
polyklonaler anti-AtPIN4 IgG	Friml, 2000	1:400
monoklonaler anti-Kaninchen IgG-HRP	<i>Bio Rad</i>	1:1000
monoklonaler anti-Kaninchen IgG-FITC	<i>Sigma</i>	1:200
monoklonaler anti-Kaninchen IgG-Alexa488	<i>Molecular Probes</i>	1:400 / 1:200

Optische Filter

	<u>Charakteristik</u>	<u>Wellenlängen</u>
FITC	Bandpaßfilter	$\lambda = 530 \pm 30$ nm
TRITC	Langpaßfilter	$\lambda \geq 590$ nm

2.1.8 Pflanzen

Wildtypen

Arabidopsis thaliana (L.) Heynh., Ökotyp Columbia

Arabidopsis thaliana (L.) Heynh., Ökotyp Enkheim, *ttg* (Koorneef, 1981)

pin1

Arabidopsis thaliana (L.) Heynh., Ökotyp Enkeim, *ttg, pin1-1*

pinoid

Arabidopsis thaliana (L.) Heynh., Ökotyp Landberg erecta, *pid-2*

Arabidopsis thaliana (L.) Heynh., Ökotyp Columbia, *pid-3*

Arabidopsis thaliana (L.) Heynh., Ökotyp Columbia, *pid::En310*

Arabidopsis thaliana (L.) Heynh., Ökotyp Columbia, *35S::Pid* Linie 10 und 21 (Benjamins *et al.*, 2001).

DR5::Reporter

Arabidopsis thaliana (L.) Heynh., Ökotyp Columbia, *DR5::GUS* (Ottenschläger, 2002)

Arabidopsis thaliana (L.) Heynh., Ökotyp Columbia, *DR5::GFP* (Ottenschläger, 2002)

2.1.9 Suspensionskulturen

Arabidopsis thaliana (L.) Heynh., Ökotyp Columbia (zur Verfügung gestellt von Czaba Koncz)

Arabidopsis thaliana (L.) Heynh., Ökotyp Enkheim, *ttg, pin1-1* (etabliert von T. Eneva)

2.2 Methoden zur Analyse von Nukleinsäuren

2.2.1 DNA-Präparationen

Wenn nicht anders angegeben, wurde in 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäßen gearbeitet. Zentrifugiert wurde in einer Tischzentrifuge von Eppendorf (Typ 5417C) bei einer Höchstgeschwindigkeit von 14000 UPM und RT.

2.2.1.1 Schnellpräparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Die Präparation kleiner Mengen Plasmid-DNA erfolgte in einer modifizierten Form nach Holmes und Quigley (1981). Von einer Bakterienkultur (LB Medium mit den entsprechenden Antibiotika) wurden 1,5 ml 1 Min zentrifugiert. Die Bakterien wurden in 200 µl STEL-Puffer resuspendiert, 45 Sekunden bei 95 °C erhitzt, 15 Min zentrifugiert und der weiße Niederschlag mit einem Zahnstocher entfernt. Die Nukleinsäuren wurden durch Zugabe von 300 µl Isopropanol gefällt und 5 Min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Nukleinsäuren mit 200 µl 70 % Ethanol gewaschen. Nachdem kurzem Trocknen des Niederschlags wurde er in 50 µl Wasser gelöst.

STEL-Puffer: 50 mM Tris/HCl pH 8,0; 8% (w/v) Saccharose; 5% (v/v) Triton X-100; 50 mM EDTA; 0,5 mg/ml Lysozym frisch zugeben

2.2.1.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* über Qiagen-Säulen

Größere und reinere Mengen Plasmid-DNA wurden mit Hilfe der Mini- bzw. Midi-Qiagen-Kits nach den Angaben des Herstellers (*Qiagen*) isoliert.

2.2.1.3 Isolierung von Plasmid-DNA aus Agrobakterien („Alkalische Lyse“)

Mit einer einzelnen Bakterienkolonie werden 5 ml LB-Medium angeimpft und bei 37 °C über Nacht geschüttelt. Von dieser Kultur werden 4 ml eine Minute zentrifugiert. Das Bakterienpellet wird in 150 µl Puffer 1 resuspendiert und 5 Min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 300 µl Puffer 2 und fünfminütiger Inkubation auf Eis wird die Lösung mit 225 µl Puffer 3 versetzt und 10 Min auf Eis inkubiert. Anschließend wird 15 Min zentrifugiert und der Überstand einer Phenol/Chloroform-Extraktion unterzogen. Durch Zugabe von 1 ml Ethanol und 30 minütiger Inkubation bei -70 °C wird die DNA gefällt, zweimal mit 70 % kaltem Ethanol gewaschen, getrocknet und in 30 µl Wasser/RNase A gelöst. Es wird 30 Min bei 37 °C inkubiert. Anschließend kann noch, um die Qualität der DNA zu erhöhen, eine Polyethylenglykol-Fällung durchgeführt werden.

Puffer 1: 50 mM Glucose; 25 mM Tris pH 8; 10 mM EDTA

Puffer 2: 0,2 M NaOH; 1% SDS

Puffer 3: 3 M KAc pH 4,8

2.2.1.4 Isolierung von genomischer DNA aus Pflanzen

2 g tiefgefrorenes Pflanzengewebe werden unter flüssigem Stickstoff zu einem feinen Pulver gemörsert. Das Pulver wird in 25 ml 65 °C warmen 2x CTAB-Puffer gegeben, vorsichtig

gemischt und 40 Min bei gleicher Temperatur inkubiert. Nach dem Abkühlen wird die Lösung mit 1 Volumen Chloroform im Überkopfschüttler für 30 Min extrahiert. Anschließend wird bei 6000 Upm in einer Tischzentrifuge bei 10 °C für 30 Min zentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen und die DNA daraus mit 1 Volumen 2-Propanol über Nacht bei -20 °C gefällt. Es wird für 20 Min bei 5000 Upm und 4 °C in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet in 1 ml Wasser/RNase A bei 42 °C für 1 Stunde gelöst. Es wird 1/10 Volumen 3M (NH₄)₂Ac pH 4,8 hinzugegeben und 20 Min bei 4°C gefällt. Anschließend wird für 30 Min bei 10000 Upm und 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wird mit 70 % kaltem Ethanol gewaschen und angetrocknet. Es wird in 800µl 1M NaCl resuspendiert und mit 1/10 Volumen 3M NaAc pH 5,2 und 1 Volumen 2-Propanol gefällt. Es wird zentrifugiert bei 10000 Upm für 20 Min und das Pellet zweimal mit 70 % kaltem Ethanol gewaschen. Die DNA wird in 700 µl Wasser resuspendiert. Die Güte der DNA wird bestimmt über Gelelektrophorese.

2x CTAB: 2 % CTAB; 100 mM Tris/HCl pH 8,0; 20 mM EDTA pH 8,0; 1,4 M NaCl; 1 % PVPP

2.2.2 Enzymatische Reaktionen mit DNA

2.2.2.1 Verdau von DNA mit Restriktionsenzymen

Der Verdau von DNA erfolgte in den vom Hersteller gelieferten Puffern bei der für das jeweilige Enzym entsprechenden Temperatur. Das Volumen der eingesetzten Nukleasen durfte wegen ihres Glyceringehaltes 1/10 des Gesamtvolumens nicht überschreiten. Bei Restriktionsanalysen der aus Schnellpräparation gewonnenen DNA wurden 3 µl DNA mit 5 U Restriktionsenzym und 100 µg/ml RNase A 45 Min inkubiert und anschließend gelelektrophoretisch aufgetrennt. Für Klonierungsansätze wurden 5 µg DNA mit 4 U Restriktionsenzym 2-3 Stunden bei der für das Enzym optimalen Temperatur inkubiert. Der Verdau von 1-2 µg genomischer *A.thaliana* DNA erfolgte mit 7 U/µgDNA Restriktionsenzym in 400 µl Volumen bei 37° C Übernacht.

2.2.2.2 Dephosphorylierung von Vektor-DNA

Durch Behandeln linearisierter DNA mit alkalischer Phosphatase (Shrimps Alkaline Phosphatase, SAP) wurden selektiv die Phosphatgruppen am 5'-Ende abgespalten. Bei Klonierungen wurde somit eine Religation des Vektors verhindert. Zur Dephosphorylierung der Restriktion wurden 0,2 U SAP/µg DNA zum Ansatz pipettiert und 1 Stunde bei 37 °C inkubiert.

2.2.2.3 Auffüllreaktionen einzelsträngiger DNA-5'-Enden

Mit dieser Methode wurden durch T4-DNA-Polymerase 5'-Überhänge in Gegenwart von Desoxyribonukleotiden aufgefüllt bzw. 3'-Überhänge abgebaut. Dazu wurde nach Beendigung der Restriktion T4-DNA-Polymerase und Enzympuffer, sowie BSA, dNTPs (je 0,25 mM) hinzugegeben und 1 Stunde bei 37 °C inkubiert.

2.2.2.4 Ligation von DNA-Fragmenten

Ligationen wurden mit T4-DNA-Ligase nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Im Falle kohäsiver Enden wurde das zu klonierende Fragment in 2-5fachem Überschuß, im Falle glatter Enden in mindestens 10fachem Überschuß zum Vektor eingesetzt. Die Inkubationszeit betrug bei kohäsiven Enden 2 Stunden bei RT, bei glatten Enden 4 Stunden bei RT.

2.2.2.5 DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung erfolgte nach der Dideoxy-Methode von Sanger *et al.* (1977). Durchgeführt wurden die Sequenzierungen von der ADIS Gruppe des MPI mit dem ABI Prism 377-Sequenzierautomat nach den Angaben des Herstellers.

2.2.3 Gelelektrophoretische Methoden

2.2.3.1 Elektrophoretische Auftrennung von DNA in Agarosegelen

Mittels Agarosegelelektrophorese können Nukleinsäuren für analytische und präparative Zwecke der Größe nach getrennt werden. Je nach Größe der DNA-Fragmente wurden 0,8-2%ige Agarosegele verwendet. Die Agarose wurde in TBE-Puffer aufgekocht und die Lösung in einen Gelträger mit Kamm als Taschenformer gegossen. Das Gel wurde auf dem Gelträger in die mit TBE-Puffer gefüllte horizontale Gelkammer gelegt und die Proben eingefüllt, die mit 1/10 Volumen Probenpuffer versetzt waren. Zur Größenbestimmung der Fragmente wurde ein DNA-Standard, z. B. 1 kB Leiter, aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 25-120 V. Nach der Auftrennung konnte die Position der DNA-Fragmente durch Fluoreszenz des Ethidiumbromid-DNA-Komplexes mittels UV-Licht ($\lambda = 254 \text{ nm}$) sichtbar gemacht werden.

TBE-Puffer: 90 mM Tris 90 mM Borsäure; 2,5 mM EDTA; 0,2 µg/ml; Ethidiumbromid; pH 8,0
Probenpuffer: 15 % (v/v) Ficoll 400; 75 mM EDTA; 0,25 % Bromphenolblau; pH 8,0

2.2.3.2 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Isolierung von DNA-Fragmenten erfolgt mit Hilfe von Gel Extraction Kit (*Qiagen*) nach den Angaben des Herstellers.

2.2.4 Southern-Blot

2.2.4.1 Trennung und Transfer von genomischer *A.thaliana* DNA

400 µl des Restriktionsverdau wurden mit 1/10 Vol. NaAc-Lösung und 1 ml Ethanol versetzt. Die geschnittene DNA wird 0,5 h bei -70° C präzipitiert und 0,5 h bei 4° C zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 70 %igem Ethanol gewaschen und in 40 µl Wasser gelöst, versetzt mit 4 µl Probenpuffer und in einem 1 %igem Agarosegel 24h bei 25 V aufgetrennt.

Transfer und Immobilisierung von aufgetrennter DNA auf Membranen wurde nach einem, optimierten Protokoll für abwärts gerichtete, alkalische Southern-Blots durchgeführt (Koestier *et al.*, 1993).

Um kleinere und leichter transferierbare DNA-Bruchstücke zu erhalten wurden die Gele 20 Min in Depurinierungslösung inkubiert. Anschließend wurde kurz in H₂O gewaschen und zur Trennung der DNA-Stränge (Denaturierung) einige 15 Min in 0,4 M NaOH inkubiert. Der Blot wurde wie von Koestier und Mitarbeitern (1993) beschrieben aufgebaut. Die Übertragung der DNA auf die Hybond N⁺-Nylonmembran erfolgte mit 0,4 M NaOH als Transferlösung und wurde ÜN durchgeführt. Nach Abbau des Blots wurde die Nylonmembran 2mal 5 Min in 2x SSC gewaschen und neutralisiert. Durch Bestrahlung mit dem UV-Crosslinker (*Stratagene*) wurde die DNA irreversibel auf der Nylonmembran fixiert.

Depurinierungslösung: 0,25 M HCl
20x SSC: 3 M NaCl; 0,3 M Natriumcitrat pH 7,0
NaAc-Lösung: 3M NaAc pH 5,2

2.2.4.2 Radioaktive Markierung von DNA

Radioaktive DNA-Sonden wurden mit dem „rediprime DNA labeling system“ (*Amersham Pharmacia Biotech*) hergestellt. Die DNA (2,5-25 ng) wurde auf ein Volumen von 45 µl verdünnt, zur Denaturierung 3 Min auf 95 °C erhitzt, auf Eis schockgekühlt und zum Reaktionsansatz gegeben. Ferner wurden 5 µl α³²P-dCTP (50 µCi) hinzugefügt und 30 Min bei 37 °C inkubiert. Die Trennung markierter DNA von den freien Nukleotiden wurde mit dem „PCR Purification Kit“ (*Qiagen*) nach Angaben des Herstellers vorgenommen und die DNA in 200 µl TE-Puffer eluiert. Zur Analyse der Sonde wurde die Radioaktivität einer 2 µl Probe mit einem Szintillationszähler gemessen.

2.2.4.3 Nachweis der filtergebundenen DNA

Die folgenden Reaktionsschritte wurden in einer Glasröhre (Typ GL 45, *Amersham International*) im Hybridisierungs-Ofen HERAhybrid 6 (*Heraeus*) vorgenommen. Um unspezifischen Bindungsstellen der Nylonmembran abzusättigen, wurde die Membran mindestens 4 Stunden bei 66 °C in 20 ml Vorhybridisierungslösung inkubiert. Anschließend wurde die Lösung abgegossen und die denaturierte radioaktive Sonde in Hybridisierungslösung in einer Konzentration von 2 x 10⁶ cpm/ml zugefügt. Die Hybridisierung erfolgte ÜN bei 65 °C. Danach wurde die Membran zweimal 30 Min mit 2 x SSC; 0,1 % SDS, 20 Min mit 1 x SSC; 0,1 % SDS und 10 Min mit 0,2 x SSC; 0,1 % SDS bei 66 °C von unspezifisch gebundener DNA-Sonde befreit. Die Detektion der Signale wurde mit einer Verstärkerschicht (Phosphor Screen GP, SO-230, *Kodak*) in einer Filmkassette über einen Zeitraum von 1 Tage vorgenommen. Die Auswertung erfolgte mittels Phosphorimager (*Image Quant*). Anschließend wurde die Membran bis zu 5 Tage bei -70° C gegen Film exponiert (XAR-5, *Kodak*).

Vorhybridisierungslösung (1l): 300 ml 20xSSC; 30 g SDS; 200 mg PVPP; 200mg Ficoll 400 und 500 µg/ml frisch denaturierte Heringssperma-DNA

Hybridisierungslösung (1l): 150 ml 20xSSC; 10 g SDS; 200 mg PVPP, 200 mg Ficoll 400 und 500 µg/ml frisch denaturierte Heringssperma-DNA

2.2.5 Klonierung von AtPIN1 für die Expression in *Saccharomyces cerevisiae* und *Xenopus* Oozyten

- (a) *Hefe*: Die AtPIN1-cDNA wurde aus pUC120 mit EcoRI/XhoI ausgeschnitten und isoliert und in den ebenfalls EcoRI/XhoI-geschnittenen Vektor pYX112 ligiert. Dort erfolgt die Expression unter der Kontrolle des Triose-Phosphat Isomerase Promotors. Anschließend wurde *E. coli* transformiert, auf Antibiotikaresistenz selektiert und von einer ÜN-Kultur Plasmid-DNA isoliert.
- (b) *Oozyten*: Die AtPIN1-cDNA wurde aus pUC120 mit EcoRI/XbaI ausgeschnitten und isoliert und in den gleichfalls EcoRI/XbaI-geschnittenen Vektor pGEMHE ligiert. Anschließend wurde *E. coli* transformiert, auf Antibiotikaresistenz selektiert und von einer ÜN-Kultur Plasmid-DNA isoliert. Die AtPIN1-cRNA wurde *in vitro* mittels T7-Polymymerase synthetisiert (Qiagen-Kit, nach Angaben des Herstellers) und in *Oozyten* injiziert.

2.2.6 Transformationsmethoden

2.2.6.1 Präparation elektrokompenter *Escherichia coli* Zellen

Mit 5 ml einer *E. coli* DH5 α Übernachtskultur (LB-Medium) wurden 500 ml LB-Medium inokuliert und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,45-0,5 bei 37 °C inkubiert. Die Bakteriensuspension wurde auf 4 °C abgekühlt und 15 Min bei 6000 UPM (GSA-Rotor) und 4 °C zentrifugiert. Um die Bakterien von Medium und Salzen zu befreien, wurden die Bakterien dreimal zentrifugiert und wie folgt resuspendiert: 1) 500 ml H₂O, 2) 250 ml H₂O, 3) 15,5 ml 10 % v/v Glycerin. Alle Lösungen wurden vorher auf 4 °C gekühlt. Schließlich wurden die Bakterien in 1 ml 10 % (v/v) Glycerin in Wasser aufgenommen, zu jeweils 30 μ l aliquotiert, in flüssigem Stickstoff gefroren und bei -70 °C gelagert.

2.2.6.2 Herstellung elektrokompenter *Agrobacterium tumefaciens* Zellen

16 ml einer Agrobakterien Übernachtskultur wurden in 400 ml YEB-Medium verdünnt und für 3 h bei 27 °C geschüttelt. Es wurde anschließend 10 Min bei 4 °C inkubiert und die Bakterien wie folgt abzentrifugiert und resuspendiert: a) 200 ml 1 mM HEPES pH 7,5; b) 100 ml 1 mM HEPES pH 7,5; c) 10 ml 1mM Hepes pH 7,5 mit 10 % Glycerin; d) 0,8 ml 1 mM Hepes pH 7,5 mit 10 % Glycerin. Alle Schritte wurden bei 4 °C durchgeführt. Anschließend wurden die Bakterien aliquotiert und bei -70 °C gelagert.

2.2.6.3 Herstellung kompetenter *Saccharomyces cerevisiae* Zellen

1 ml einer Hefe-Übernachtskultur in YPD-Medium (Sambrook *et al.*, 1989) wurde in 300 ml YPD-Medium verdünnt und bis zu einer OD₆₀₀ von ca. 0,5 bei 30 °C anwachsen gelassen. Die Kultur wurde auf 600 ml Volumen verdünnt und weitere 4 h bei 30 °C unter schütteln inkubiert. Die Kultur wurde viermal bei 4000 Upm abzentrifugiert und wie folgt resuspendiert: 1+2) 500 ml Wasser; 3) 50 ml Wasser; 4) Hefepuffer. Abschließend erfolgte eine 30 min Inkubation bei 30 °C. Die Hefen wurde bei -70 °C gelagert.

Hefepuffer: 1,5 ml LiAc pH 7,5; 1,5 ml TE; 10 ml Wasser
TE: 10 mM Tris, 1 mM EDTA pH 8,0

2.2.6.4 Bakterientransformation

Die elektrokompenten Zellen wurden auf Eis aufgetaut, mit der zu transformierenden DNA gemischt und anschließend in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette (*Bio-Rad*) gegeben. Der Elektroporator wurde auf eine Kapazität von 25 μ F und auf einen Widerstand von 200 Ω eingestellt. Die Transformation erfolgte mit einem Spannungspuls von 2,5 kV mit einer Halbwertszeit von 4-4,7 ms. Danach wurden die Zellen in 500 μ l LB-Medium resuspendiert und 45 Min bei 37 °C inkubiert. Die Selektion erfolgte durch Ausstreichen von Aliquots auf Festmedium mit entsprechenden Antibiotika.

2.2.6.5 Hefetransformation

15 μ g denaturiertes Heringssperma-DNA und 5 μ g Plasmid-DNA wurden in 130 μ l 10 Fach TE, 130 μ l 1 M LiAc und 1 ml 50 %iges PEG 3350 vorgelegt und 200 μ l kompetente Hefen zugegeben. Nach 30 min bei 30 °C erfolgte Inkubation bei 42 °C für 15 min. Die Hefen wurden bei 6000 Upm für 5 min zentrifugiert, das Pellet in 200 μ l TE resuspendiert und auf Selektionsmedium ausgestrichen und bei 30 °C inkubiert.

2.2.7 Pflanzentransformation

2.2.7.1 Anzucht von *A. thaliana*

Es wurden für jedes Konstrukt ca. 50 Pflanzen verwendet die unter Kurztagbedingungen (8 h Photoperiode) einen Monat kultiviert wurden (5 Pflanzen pro Topf ϕ 10 cm). Dann wurden sie auf Langtagbedingungen (16 h Photoperiode) gesetzt. Zur Induktion der Seitensproßbildung wurde der Haupttrieb abgeschnitten. Die Transformation erfolgte sobald die ersten Schoten gebildet waren.

2.2.7.2 Transformation mittels Agrobakterien

5 ml YEB-Medium mit entsprechenden Antibiotika wird mit einer Agrobakterienkolonie angeimpft und über Nacht bei 28 °C geschüttelt. Diese Kultur wird mit 250 ml YEB-Medium, verdünnt und bei 27 °C bis zu einer OD₆₀₀ von ca. 1,0 geschüttelt. Es wird mit Leitungswasser auf 500ml aufgefüllt und 2,5 g Saccharose und das Detergenz Silvett L-77 (0,5 ml/l) hinzugegeben. Diese Bakteriensuspension wird in ein ausreichend breites Becherglas gefüllt und die ganzen Pflanzen „kopfüber“ 2 min unter leichtem Rühren inkubiert. Danach werden Plastiktüten geeigneter Größe mit abgeschnittenen Ecken über die Töpfe gezogen. Nach 2-4 Tagen werden die Tüten entfernt und die Pflanzen im Gewächshaus bis zur Samenreife belassen.

2.3 Methoden zur Proteinanalyse

2.3.1 Präparation von Proteinen aus *A. thaliana*

Das Pflanzenmaterial wurde unter flüssigem Stickstoff gemörsert, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und in 1 ml Puffer A suspendiert. Nach 15minütiger Zentrifugation bei 13000 UPM (4 °C) wurde der Überstand abgenommen und die Mikrosomen bei 100000g sedimentiert (1h, 4 °C). Der Überstand wurde als lösliche Fraktion bezeichnet und vor der Elektrophorese in der Regel einer TCA-Fällung unterzogen. Die mikrosomalen Proteine wurden in Puffer B mit Hilfe eines Glasstabes extrahiert und bei -20 °C gelagert.

Puffer A: 100 mM Tris/Citronensäure, pH 8,0; 250 mM Saccharose, 1 mM EDTA; 0,1 mM MgCl₂; 3,5 mg/l Trasylo^l, 100 µg/l Leupeptin
 Puffer B: 50 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ pH 7,8; 0,5 M NaCl; 2 M Harnstoff

2.3.2 Präparation von Proteinen aus *S. cerevisiae*

50 ml einer Hefekultur wurden bis zu einer OD₆₀₀ von 1,0 bei 30 °C wachsen gelassen, bei 3000 g für 10 min bei 4 °C pelletiert und in 900 µl EB-Puffer resuspendiert. Es wurden 20 µl PMSF (12 mM) und 200 µl Glasperlen (*Sigma*) hinzugegeben und die Zellen durch 10 min vortexen mit Kühlintervallen aufgeschlossen. Der Zellbruch wurde in einem 10 minütigen Zentrifugationsschritt bei 4 °C abgetrennt. Die mikrosomalen Proteine wurden durch anschließende Zentrifugation bei 100000 g für 1 h bei 4 °C erhalten. Das Pellet wurde in 50 µl EB mit 20 % Glycerol gelöst.

EB: 10 mM Tris pH 7,5; 0,1 mM DTT; 1 mM EDTA pH 8,0

2.3.3 Präparation von Proteinen aus *Xenopus* Oozyten

15-20 Oozyten wurden mit einer Pistille in 1 ml HB-Puffer auf Eis homogenisiert. Bruchstücke wurden durch zweimaliges zentrifugieren bei 2500 g für 10 min bei 4 °C entfernt. Die mikrosomalen Proteine wurden durch Zentrifugation bei 100000 g für 1 h bei 4 °C erhalten. Das Pellet wurde in 50 µl HB-Puffer resuspendiert.

HB: 20 mM Tris pH 7,4; 5 mM EDTA, 5 mM EGTA, 100 mM NaCl und Complete-Proteaseinhibitor (*Boehringer*)

2.3.4 Methoden zur Konzentrationsbestimmung

2.3.4.1 Bestimmung der Proteinkonzentration mit Bichinonsäure (Smith *et al.*, 1985)

Für Proteinbestimmungen nach der Bichinonsäure-Methode wurde das BCA Protein Assay Reagent (*Pierce*) nach Angaben des Herstellers verwendet.

2.3.5 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) wurde unter denaturierenden Bedingungen (0,1 % (w/v) SDS) in Gegenwart von 0,8 % (v/v) Mercaptoethanol durchgeführt. Das verwendete diskontinuierliche Gelsystem nach Laemmli (1970) bestand aus einem Sammelgel (pH 6,8) mit einer Acrylamidkonzentration von 4 % (v/v) und einem Trenngel (pH 8,8) mit 12 % (v/v) Acrylamid. Zur Herstellung des Trenngels wurden alle Komponenten vor der Zugabe von TEMED und APS gemischt und entgast. Die Lösung wurde zwischen zwei abgedichtete Glasplatten gegossen und vorsichtig mit Wasser überschichtet. Nach erfolgter Polymerisation wurde das Trenngel mit der Sammelgellösung überschichtet, in die sofort ein Kamm zur Ausbildung der Probenaschen gesteckt wurde. Die Proteinlösung, die 30 bis 100 µg Protein enthielt, wurde mit ¼ Volumen 5x Probenpuffer versetzt und 20 Min auf 42 °C erhitzt. Die Elektrophorese erfolgte bei RT in einer vertikalen Elektrophoreseapparatur mit einer Stromstärke von zunächst 10 mA. Nachdem die Lauffront, markiert durch Bromphenolblau, das Trenngel erreicht hatte, wurde die Stromstärke auf 20 mA erhöht.

Sammelgel:	0,125 M Tris/HCl pH 6,8; 3,75 % (v/v) Acrylamid; 0,11 % (v/v) N,N'-Methylenbisacrylamid; 0,1 % (w/v) SDS; 0,2 % (v/v) TEMED; 0,04 % (w/v) APS
Trenngel:	0,375 M Tris/HCl pH 8,8; 12 % (v/v) Acrylamid; 0,23 % (v/v) N,N'-Methylenbisacrylamid; 5 % (v/v) Glycerin; 5 % (w/v) SDS; 0,3 % (v/v) TEMED; 0,1 % (w/v) APS
Elektrophoresepuffer:	25 mM Tris pH 8,3; 0,2 M Glycin; 0,1 % (w/v) SDS
	5 x Probenpuffer: 0,5 M Tris/HCl pH 6,8; 40 % (v/v) Glycerin; 4 % (w/v) SDS; 4 % (v/v) β-Mercaptoethanol; 0,01 % (w/v) Bromphenolblau

Nach der Elektrophorese wurde das Gel entweder einer Coomassiefärbung unterzogen oder zur Immundetektion (Western-Blot) der Proteine verwendet.

2.3.6 Coomassie-Färbung (Neuhoff *et al.*, 1985)

Zur Färbung wurde das Gel 10 bis 15 Min in 65 °C heiße Färbelösung gelegt. Anschließend wurde der Farbstoff mit Entfärbelösung bei 65 °C solange ausgewaschen, bis der Hintergrund entfärbt war. Das Gel wurde getrocknet, indem es zwischen zwei Lagen Zellophanfolie auf einen Geltrocknungsrahmen gespannt wurde.

Färbelösung:	7 % (v/v) Essigsäure; 40 % (v/v) Methanol; 0,2 % (w/v) Coomassie-Brillant-Blau G250 in Wasser
Entfärbelösung:	7 % (v/v) Essigsäure; 40 % (v/v) Methanol

2.3.7 Transfer von Proteinen („Western-Blot“)

Bei dieser Methode wurden die durch SDS-PAGE getrennten Proteine aus dem Gel auf eine Polyvinylidendifluoridmembran (PVDF-Membran) übertragen. Die gebundenen Polypeptide können mit Antikörpern spezifisch detektiert werden (Towbin *et al.*, 1979).

Die PVDF-Membran (Immobilon P, Millipore) wurde für 10 Sekunden in Methanol getaucht und anschließend jeweils 15 Min mit Wasser bzw. Anodenpuffer 2 gewaschen. Das Gel wurde etwa 5 Min in Anodenpuffer 2 inkubiert. Die Graphitelektroden wurden mit Wasser befeuchtet und der Transferstapel wie folgt aufgebaut: Sechs analog der PVDF-Membran

(Immobilon P, *Millipore*) zugeschnittene Filterpapiere (Whatman 3MM) wurden in Anodenpuffer 1 getränkt und übereinander auf die Anode gelegt. Darüber wurden 3 Lagen in Anodenpuffer 2 getränktes Filterpapier, die vorbereitete PVDF-Membran, das Polyacrylamidgel und 9 Lagen in Kathodenpuffer getränktes Filterpapier geschichtet. Auf den Stapel wurde die Kathode aufgelegt. Der Transfer erfolgte eine Stunde bei 0,8 mA/cm² Membranfläche.

Anodenpuffer 1: 300 mM Tris/HCl pH 10,4; 20 % (v/v) Methanol
 Anodenpuffer 2: 25 mM Tris/HCl pH 10,4; 25 % (v/v) Methanol
 Kathodenpuffer: 25 mM Tris/HCl pH 9,4; 40 mM 6-Aminocaprinsäure; 20 % (v/v) Methanol;
 0,01 % (w/w) SDS

2.3.8 Immundetektion von Proteinen (modifiziert nach Blake *et al.*, 1984)

Nach Beendigung des Transfers wurde die PVDF-Membran mit Ponceau S-Lösung gefärbt. Dies diente einerseits dazu, den Proteintransfer zu überprüfen und ermöglichte andererseits, die Banden des Proteinstandards zu markieren. Um unspezifische Bindungsstellen auf der PVDF-Membran abzusättigen, wurde eine Stunde in Blockpuffer inkubiert. Der Primärantikörper wurde in einer Verdünnung von 1:2000 in Blockpuffer zur Membran gegeben und diese über Nacht bei 4°C inkubiert. Überschüssiger Antikörper wurde durch fünfmaliges Waschen (je 5-10 Min) mit PBST entfernt. Die Inkubation mit dem Sekundärantikörper (anti-Kaninchen IgG-Rettich-Peroxidase Konjugat aus Ziege) erfolgte in einer Verdünnung von 1:10000 in Blockpuffer. Nach einer Stunde wurde die Membran fünfmal je 5-10 Min mit TBSN und einmal mit TBS gewaschen. Die Detektion erfolgte mit Hilfe des Super Signal Substrate Kits (*Pierce*) nach den Angaben des Herstellers.

Ponceau S-Lösung: 0,2 % (v/v) Ponceau S in 3 % (w/v) Trichloressigsäure
 TBS: 20 mM Tris pH 8,0; 120 mM NaCl
 TBSN: TBS mit 0,1 % (w/w) NP-40
 Blockpuffer: 3,5 % (w/v) Magermilchpulver in TBS

2.3.9 Reinigung des AtPIN1-Antikörpers

2.3.9.1 Expression und Reinigung des Antigens

Ein 744 bp *AtPIN1*cDNA Fragment was für ein 248 Aminosäuren großes Protein kodiert lag bereits im Vektor pQE-31 in *E.coli* vor (Gälweiler *et al.*, 1998). Es wurde 1 l LB-Medium von einer ÜN-Vorkultur angimpft, bis zu einer OD₆₀₀ von 1,0 wachsen gelassen und die Protein-Expression mit 2 mM IPTG induziert. Nach 5 h wurde die Kultur aufgearbeitet und das Proteinextrakt auf eine 5 ml Ni²⁺-NTA Säule gegeben. Die Elution erfolgte über schrittweise Erniedrigung des pH-Wertes nach Angaben des Herstellers (*Qiagen*, The Expressionist). Die Aufreinigung wurde mittels SDS-Page Gelelektrophorese und anschließender Comassiefärbung überprüft.

2.3.9.2 Affinitätsreinigung des AtPIN1-Serums

Ca. 100 µg heterolog exprimiertes und gereinigtes AtPIN1 Proteinfragment wurde auf einem 10%igen Polyacrylamidgel Gel aufgetrennt und auf PVDF-Membran mittels Western Blot transferiert. Nach Ponceau-Färbung konnte der Membranstreifen, der das AtPIN1-Proteinfragment gebunden hatte, ausgeschnitten werden. Der Membranstreifen wird in TBS entfärbt und für 2 Stunden in Puffer 1 vorinkubiert. Damit erfolgt die Absättigung unspezifischer Bindungsstellen. 2,5 ml Immunsersums (Gälweiler *et al.*, 1998) werden mit 4 Volumina Puffer 1 verdünnt und mit dem Membranstreifen bei 4 °C ÜN unter Schütteln inkubiert. Es wird 4 x 5 min in TBS bei 4 °C gewaschen. Gebundene, spezifische AK werden mit 2 x 1 ml Puffer 2 eluiert. Dies geschieht jeweils für 1,5 min bei 4 °C. Der pH der gesammelten Fraktionen wird unmittelbar nach der Elution mit 100 µl Tris/HCl (pH 8) neutralisiert. Um die Antikörperlösung zu stabilisieren, erfolgt eine Zugabe von BSA bis zu einer Endkonzentration von 0,5 %.

TBS: 8 g / 1 NaCl; 0,2 g / 1 KCl; 3 g / 1 Tris / HCl, pH 7,2
 Puffer 1: 1 % BSA in TBS
 Puffer 2: 0,1 M Glycin; 0,5 M NaCl; 0,05 % Tween 20, pH 2,6

2.4 Immuncytochemische Methoden

2.4.1 Detektion von Proteinen auf Längsschnitten von Sproßachsen

Das Pflanzengewebe wurde 10 Min unter Vakuum in MTSB + 4% Formaldehyd inkubiert und anschließend und anschließend ÜN bei 4° C fixiert. Anschließend wurde 20 Min in PBS und MTSB gewaschen. Die Dehydratisierung erfolgte über eine Ethanolserie (30, 50, 70, 90 und 97 % (v/v) Ethanol in Wasser) für jeweils 30 Min auf Eis. Zur vollständigen Entfärbung des Gewebes wurden die Proben ÜN in 97 % Ethanol bei 4° C belassen. Das Ethanol wurde bei 37 °C in jeweils 1 stündigen Schritten gegen Wachs ausgetauscht (Wachs:Ethanol – 1:2, 1:1 und 2:1 (v/v)). Schließlich wurde das Gewebe weitere zwei Stunden, über Nacht und am folgenden Tag nochmals zwei Stunden in 100 % Wachs inkubiert, in Formen transferiert und ausgehärtet. Das eingebettete Pflanzengewebe wurde mit Wachs auf einem Holzblock fixiert und auf 16 °C gekühlt. Mit Hilfe eines Mikrotoms (*Leitz*) wurden 8 bis 12 µm dicke Schnitte angefertigt, welche auf Poly-L-Lysin-beschichtete Objektträger übertragen wurden. Um eine regelmäßige Anordnung der Schnitte auf dem Objektträger zu gewährleisten, wurden diese mit mehreren Wassertropfen benetzt, auf denen sich die Wachsschnitte ausstreckten. Die Präparate wurde bei RT mehrere Stunden oder über Nacht getrocknet. Zur Rehydrierung wurden die Objektträger in folgende Lösungen getaucht: 97 % Ethanol (dreimal 10 Min), 90 % und 50 % Ethanol in Wasser (je 10 Min) und schließlich 10 Min in PBS. Es folgte eine 30minütige Inkubation in MTSB. Die Inkubation mit dem Primärantikörper (1:50er Verdünnung in 3% BSA in MTSB) erfolgte 1 Stunden in einer feuchten Kammer. Nach Waschen mit MTSB für 10 Min wurde der Sekundärantikörper (1:300er Verdünnung mit 3% Milchpulver in MTSB) appliziert und die Präparate 1,5 Stunden in einer feuchten Kammer inkubiert. Es schloß sich ein zwanzigminütiger Waschschrift mit PBS an. Die markierten Schnitte wurden zur mikroskopischen Auswertung unter Slow-Fade Antifade (*Molecular Probes*) mit einem Deckglas eingeschlossen und mit Nagellack versiegelt. Die Analyse erfolgte im Fluoreszenzmikroskop (*Leica*).

MTSB: 50 mM PIPES-KOH; 5 mM MgSO₄, 5 mM EGTA; pH 6,9
 PBS: 7 mM Na₂HPO₄/1,5 mM KH₂PO₄ pH 7,2; 2,7 mM KCl; 137 mM NaCl
 Wachs: 10 % (w/v) 1-Hexadecanol in PEG 960

2.4.2 Detektion von Proteinen in intakten Wurzelspitzen

Es wurden 3-6 Tage alte *A. thaliana* Keimlinge verwendet. Sie wurden 1 h in MTSB + 4 % Formaldehyd unter Vakuum fixiert und anschließend in Säulen des In-situ Pro Roboters (*Abimed*) überführt. Die komplette weitere Prozedur wurde mit dem Roboter durchgeführt. Die Keimlinge wurden mit MTSB/0,1 % (w/w) T-100 gewaschen. Die Zellwände wurden anschließend mit Driselase 30 Min anverdaut. Hiernach wurde mehrmals mit MTSB/0,1 % (w/w) T-100 gewaschen und das Gewebe für 40 Min permeabilisiert. Nach weiteren Waschschritten wurde mit 3 % BSA in MTSB für 1 h geblockt und 3 h mit Primärantikörpern im selben Puffer inkubiert. Achtmal wurde gewaschen und 4 h mit Sekundärantikörpern inkubiert. Hiernach wurde wieder mehrmals mit MTSB/0,1 % (w/w) T-100 und anschließend mit Wasser gewaschen. Die Keimlinge wurden auf Objektträgern in Slow Fade Antifade (*Molecular Probes*) eingebettet. Die Untersuchung erfolgte mittels Konfokaler Laser Scanning Mikroskopie (*Leica*).

Driselasepuffer: 2 % (w/w) Driselase in MTSB
 Permeabilisierungspuffer: 10 % (v/v) DMSO; 3 % (v/v) NP-40 in MTSB

2.4.3 Detektion von Proteinen auf Schnitten von *Xenopus* Oozyten

Die Oozyten wurden 3 h in Ringers-Puffer mit 4 % Paraformaldehyd und 0,1 % Glutaraldehyd bei RT fixiert. Danach wurden sie in 3,5 % Agarose eingebettet. Mit einem Vibratom (*Leica*) wurden 100-150 μM starke Schnitte angefertigt. Die Scheiben wurden in Ringers-Puffer mit 2 % Paraformaldehyd und 0,05 % Glutaraldehyd für 15 min postfixiert. Unspezifische Bindungsstellen wurden mit 2 % BSA in Ringers-Puffer abgesättigt. Im selben Puffer wurde der Primärantikörper ÜN bei 4 °C inkubiert. Es wurde 3mal mit Ringers-Puffer gewaschen und 3 h mit Sekundärantikörper bei RT inkubiert. Anschließend wurde erneut 3 mal gewaschen und die Schnitte auf Objektträger überführt und in Slow Fade Antifade eingebettet (*Molecular Probes*). Die Untersuchung erfolgte mittels Fluoreszenzmikroskopie.

Ringers-Puffer: 120 mM NaCl; 2 mM KCl, 1,8 mM CaCl_2 ; 5 mM HEPES pH 7,2

2.5 GUS Untersuchungen

Das Pflanzenmaterial wird in GUS-Reaktionslösung 10 Min einem Wasserstrahlpumpen-vakuum ausgesetzt und mehrere Stunden bei 37 °C inkubiert. Um die Blaufärbung sichtbar zu machen, wird das Chlorophyll der Pflanzen mit 70 % Ethanol ausgewaschen. Zur Analyse wird das Gewebe auf Objektträger transferiert und mit 50 % Glycerin benetzt. Das Präparat wird mit Deckglas und Nagellack versiegelt und mikroskopisch ausgewertet.

GUS-Reaktionslösung: 50 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$; pH 7; 0,05 % (w/w) Triton X-100;
 0,1 % (w/w) X-Gluc; je 2,5 mM $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$

2.6 Auxintransportstudien

2.6.1 Polarer Auxintransport in Stengelsegmenten von *A. thaliana*

(Okada *et al.*, 1991)

Samen wurden auf Erde ausgelegt und 7 d unter Kurztagbedingungen (8 von 24 h Licht) keimen lassen. Anschließend wurden jeweils 54 Keimlinge in Schalen mit Erde pikiert und weitere 7 d auf Kurztag belassen. Hiernach wurden sie in Langtaggewächshäuser (16 h von 24h Licht) überführt. Nach insgesamt 28-40 Tagen wurden die Versuche durchgeführt. 2,5 cm lange Stengelstücke wurden direkt oberhalb der Rosette abgeschnitten und umgekehrt („physiologische Orientierung“) in 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäße mit 30 μ l MS-Puffer gestellt. Als Kontrolle für gerichteten basipetalen Auxintransport wurden Stengelstücke in normaler Orientierung („antiphysiologische Orientierung“) inkubiert. Für den Inhibitor des polaren Auxintransports NPA, wurden Verdünnungsreihen in Ethanol gemacht. Die Stocklösung war 0,5 M in DMSO. Die Endkonzentration an DMSO bzw. Ethanol in MS-Puffer betrug 0,01 % bzw. 0,15 % in allen Proben. Stengelstücke wurden je nach Versuch 2 bis 18 h inkubiert. Anschließend wurden ein 5 mm großes Stück vom oberen Ende abgeschnitten und 2 h in 0,5 ml Ethanol extrahiert. Die Szintillationsmessung erfolgte mit 4,5 ml Rotiszint SZ-22 (*Roth*) im einem Beckmann LS-6500 Gerät. Es wurden cpm (Zerfälle in der Minute) gemessen.

MS-Puffer: 2,15 g/l Murashige und Skoog Basal-salt-mixture; 0,25 g/l MES mit KOH auf pH 5,5 eingestellt; 1,45 μ M IAA; 4,8 nCi/30 μ l [3 H]IAA(*Amersham*); Aktivität: 1 μ Ci/ μ l

2.6.2 Auxintransportmessungen in Suspensionskultur von *A. thaliana*

(modifiziert nach Delbarre *et al.*, 1996)

Präparation der Zellen

Es wurden *A.thaliana* Suspensionskulturen 6 bis 9 Tage nach Subkultivierung verwendet. 7-8 Erlenmeyerkolben mit je 60 ml Zellsuspension wurden zusammengegeben und aufgeteilt in 2 1l Erlenmeyerkolben. Zur Induktion der AtPIN1-Überexpression in ColpTA::AtPIN1 bzw. als Kontrolle auf Wildtyp-Suspensionskultur, wurde Dexamethasone auf 1 μ M hinzugegeben. In den anderen Kolben wurde das entsprechende Volumen Lösungsmittel hinzugegeben. Es wurde ÜN induziert und anschließend das Medium durch Filtration über eine Fritte entfernt. Der Zelloberstand wurde in 100 ml MSS-Puffer aufgenommen und 1 h unter Schütteln gewaschen. Danach ließ man die Suspension in einem Meßzylinder absitzen und der Überstand wurde abdekantiert. Dies wurde noch einmal wiederholt. Hiernach wurde mit MSS-Puffer bis zu einer Zelldichte von ca. 0,18g FW /ml aufgefüllt und 1,5 h unter schütteln äquilibriert.

Durchführung

2 ml MSS wurden mit 11,4 nM [3 H]1-NAA (*Rotem*) inklusive der je nach Versuch verwendeten Inhibitoren des Auxintransport bzw. einem Überschuß an unmarkiertem 1-NAA in doppelter Endkonzentration vorgelegt. 2 ml Suspension wurden hinzugegeben und unter schütteln 30 Sekunden inkubiert. Die kurze Inkubationszeit wurde gewählt um Metabolisierung des [3 H]1-NAA zu verhindern (Delbarre *et al.*, 1996), so daß ausschließlich freies, d.h. transportables [3 H]1-NAA bestimmt wurde. Anschließend wurde der Überstand über Glasfaserfilter (*Whatman*) abgesaugt und 1 h mit 0,5 ml Ethanol extrahiert. Es wurden

2.7.2 Segregationsanalysen

Definition der Generationen:

- T0: Transformierte Pflanzen
- T1: Antibiotikaresistente Pflanzen
- T2: Segregierende Linien in homo- und heterozygoten Pflanzen
- T3: Aufspaltende Nachkommen der T2-Generation, Unterscheidung zwischen homo- und heterozygoten Pflanzen

Die Samen der T0-Generation wurden sterilisiert und je ca. 0,15 ml Samen wurden auf Petrischalen (ϕ 15 cm) mit ARA Festmedium gegeben. Neben dem entsprechenden Antibiotikum zur Selektion resistenter Keimlinge enthielt das Medium außerdem noch Ticacillin/Clavuran (je 150 mg/l) zur Inhibierung von Agrobakterien. Nach ca. 14 Tagen wurden resistente Keimling in Erde überführt und bis zur Samenreife gebracht. Die Samen der T1 Generation wurden sterilisiert und jeweils 50-100 auf Platten ausgelegt. Von Linien die ungefähr 3:1 segregierten wurden jeweils etwa 12 T2-Pflanzen ins Gewächshaus gebracht. T3 Samenmaterial wurde erneut auf Segregation hin überprüft. Homozygote Pflanzen wurden für fast alle in dieser Arbeit durchgeführten Versuche verwendet.

Verwendete Antibiotika: Hygromycin B (15 mg/l); Gentamycin (50 mg/l); Sulfonamid (10 mg/l)

2.7.3 Kreuzung von *A. thaliana*

Es wurden ausschließlich Pflanzen des Ökotyps Columbia(0) untereinander gekreuzt. Die homozygoten Pflanzen wurden bis zur Blütenreife kultiviert. Zur Kreuzung wurden die Kelch-, Blüten- und Staubblätter der Reporterlinien entfernt und der freigelegte Stempel mit den reifen Staubblättern der anderen Linie mehrmals bestrichen. Die gekreuzten Blütenstände wurden gekennzeichnet und die Pflanzen bis zur Samenreife kultiviert. Die geernteten Samen (F1-Generation) wurden wie unter 2.7.1 beschrieben sterilisiert und auf ARA Festmedium in Petrischalen ausgelegt und vertikal bis zu 9 Tagen wachsen lassen. Trugen die Keimlinge die Merkmale der Elternpflanzen, so wurden sie für Versuche eingesetzt.

2.7.4 Herstellung von Wurzelkulturen

Die Anzucht von *A. thaliana* Wurzelkulturen erfolgte in 250 ml Erlenmeyerkolben mit 40 ml ARA-Flüssigmedium und ca. 15, zwei Wochen alten, auf ARA-Festmedium angezogenen Keimlingen. Die Kolben wurden in einer Kulturkammer (22 °C, 16 h Photoperiode und 75 % Luftfeuchtigkeit) bei 80 UPM für 2 Wochen geschüttelt.

2.8 *A. thaliana* –Suspensionskultur-Methoden

2.8.1 Herstellung von Suspensionskulturen (Methode nach T. Eneva, unveröffentlicht)

Samen wurden sterilisiert und auf ARA Festmedium ausgelegt. Nach 2 Wochen wurden jeweils 15 Keimlinge in 40 ml ARA Flüssigmedium überführt und 2 Wochen geschüttelt (s. 2.6.3). Die Keimlinge wurden in ca. 5 mm Große Stücke zerschnitten und jeweils 1-2 g in Kolben mit 50 ml Zellkulturmedium (ZM, 2.1.7.3) überführt und 1 Woche geschüttelt (150 UPM, 22 °C, in Dunkelheit). ZM Medium enthält das synthetische Auxin 2,4-D. Dies bewirkt, insbesondere an Schnittstellen, Induktion von Kalluswachstum. Ab einer gewissen Größe trennen sich die Kalli von den Gewebestücken und wachsen autonom weiter.

Danach ließ man die Suspension 0,5 h absitzen und wechselte 25 ml ZM. Nach einer weiteren Woche wurden durch filtrieren über ein 1000 µm Sieb Gewebebruchstücke entfernt. Den Durchlauf ließ man absitzen und der Überstand wurde abgezogen und durch frisches ZM ersetzt.

Danach wurde noch zweimal in 4 wöchigen Abständen gesiebt (500 µm und 400 µm). Pflanzliche Zellkulturen sind nicht vergleichbar mit tierischen- bzw. Insekten-Zellkulturen. Sie sind weniger homogen. Neben Einzelzellen liegen Kalli in Größen von 10-20 bis zu mehreren Hundert Zellen pro Kallus vor. Nahm der Anteil der großen Kalli zu, so wurde erneut über ein 400 µm Sieb filtriert. Nach einem Jahr trat keine deutliche Zunahme der mittleren Kallusgröße mehr auf.

2.8.2 Umsetzen von Suspensionskulturen

Zellkulturen mit Kalli größer 1000 µm

Man läßt die Kalli 0,5 h absetzen und zieht das gesamte Medium mit 25 ml Einwegpipetten ab. 2-3 g werden in einen 250 ml Kolben transferiert und mit 50 ml Zellkulturmedium überschichtet. Der Kolben wurde unter Schütteln (150 UPM, 22 °C, in Dunkelheit) 7-8 d belassen. In dieser Zeit betrug der Massezuwachs zwischen 200 und 300 %.

Zellkulturen mit Kallusgrößen zwischen 400 und 1000 µm

Man läßt die Kalli 0,5 h absetzen und zieht 30 ml Medium mit 25 ml Einwegpipetten ab. Es wird mit 30 ml Zellkulturmedium (ZM) aufgefüllt und 15 ml werden in einen 250 ml Kolben mit 45 ml ZM überführt. Der Kolben wurde unter Schütteln (150 UPM, 22 °C, in Dunkelheit) 8-10 d belassen. Wachstumskurve siehe 3.6.2.

2.8.3 Bestimmung der Wachstumscharakteristik

Nach dem Umsetzen wurden mit abgeschnittenen Pipettenspitzen jeweils 2 ml Suspensionskultur entnommen, die Flüssigkeit über Glasfaserfilter abgesaugt und das Frischgewicht bestimmt. Dies wurde alle 2 Tage durchgeführt.

2.8.4 Transformation von Suspensionskulturen

Stabile Transformation von *A. thaliana*-Suspensionskulturen wurde erreicht durch Kokultivierung mit Agrobakterien. 2 ml Agrobakterien ÜN-Kulturen, die das entsprechende Konstrukt tragen wurden abzentrifugiert und in 1 ml Zellkulturmedium aufgenommen. Sie wurden zu 2 Tage alten Suspensionkulturen hinzugegeben. Nach 2 Tagen wurde Ticarcilin/Clavuran (*Ducheve*) auf je 150 mg/l hinzugegeben. Diese beiden Antibiotika inhibieren das Wachstum der Agrobakterien, so daß diese nicht die Suspensionskultur „überwachsen“ können. Nach weiteren 5 Tagen wurden die Suspensionskulturen auf festem Kallusinduktionsmedium (KIM, 2.1.7.3) mit entsprechenden Antibiotika zur Selektion transgener Kalli ausplattiert (0,5g pro Petrischale mit ϕ 9cm) und in eine Klimakammer überführt (22 °C, 16 h Photoperiode und 75 % Luftfeuchtigkeit). KIM enthält mehr Auxin als Cytokinin. Dies führt zur Stimmulierung der Zellteilung und verhindert Regeneration.

2.8.5 Regeneration von Pflanzen aus Suspensionskultur

Ein Umkehrung des Auxin/Cytokinin Verhältnisses zu Gunsten des Cytokinins bewirkt Regeneration von Pflanzen mit einhergehender Zelldifferenzierung. Resistente, deutlich gewachsene Kalli wurden zerteilt und in Plexiglas-Dosen (ϕ : 7 cm, Höhe: 9 cm) auf Regenerationsmedium überführt. Nach 3-4 Wochen ist bei einigen Kalli die Regeneration schon weit voran geschritten. Die Kalli sind grün, Sproße, sowie Blätter sind deutlich zu erkennen. Zur weiteren Vermehrung werden die regenerierenden Kalli nochmals geteilt und auf frisches KIM gesetzt.

2.8.6 Induktion von Wurzeln und Vermehrung

Durch einen Überschuß an Cytokinin läßt sich nur in Ausnahmefällen Wurzelwachstum induzieren. *In vitro* kultivierte Regeneranten bilden meistens nur sehr wenige Samen. Deswegen wurden 2-4 cm große Pflanzen, die Sproße und Rosettenblätter besaßen auf Wurzelinduktionsmedium (WIM) transferiert. Neben Zucker und Salzen (s. 2.7.3) enthält WIM zusätzlich noch 1 mg/l IAA. IAA induziert die Entwicklung von Wurzeln am basalen Ende des Sproßes. Nach 2-3 Wochen ist ein dichtes Wurzelwerk entstanden. Die Pflanzen wurden in Erde umgesetzt und im Gewächshaus bis zur Samenreife belassen.

2.9 Phänotypische Untersuchungen

2.9.1 Färbung von Zellwänden der Wurzel

- a) 4-8 d alte, vertikal auf ARA-Festmedium gewachsene Keimlinge (Photoperiode 16 h, 23 °C) wurden verwendet. Sie wurden auf Objektträger transferiert, mit einer 0,3 mM Propidiumiodid Lösung überschichtet und mit einem Deckglas belegt. Die Zellstruktur wurde mittels konfokaler Laserscanning Mikroskopie (*Leica*) untersucht. Es wurde ein Filter für die Detektion des Fluorophors TRITC verwendet.

- b) Die Keimlinge wurden vertikal auf Objektträgern überschichtet mit ARA-Festmedium 8 d wachsen gelassen. Es wurde ein Tropfen 0,3 mM Propidiumiodid-Lösung hinzugegeben und mit einem Deckglas bedeckt. Rest siehe a)

2.9.2 Untersuchung der gravitropen Wurzelwachstums von *A. thalaina*-Keimlingen

Es wurden 4 Tage alte, vertikal auf ARA-Festmedium angezogene Keimlinge verwendet (Photoperiode 16 h, 23 °C). Die Gravi-Stimulation erfolgte durch drehen der Petrischalen um 90°. Mit einer CCD-Kamera (*Marshall Electronics*) wurde alle 15 Min Bilder aufgenommen. Es wurde der Winkel der Wurzelspitze zum Schwerkraftvektor gemessen. Die Messungen wurden mittels modifiziertem Multi-ADAPT Programm ausgewertet (Ishikawa und Evans, 1997). Zudem wurde die Krümmung von Abschnitten der Wurzel gemessen. Die Wurzelspitze wurde eingeteilt in 300 µm große Segmente. Die zeitliche Änderung des Winkels der Tangenten, angelegt an den Außenseiten der Segmente, nach Änderung des Schwerkraftvektors, wurde errechnet.

2.9.3 Analyse der Seitenwurzelentwicklung

Samen wurden unter sterilen Bedingungen auf Petrischalen mit ARA-Festmedium ausgelegt und 2-4 Tage im Dunkeln bei 4 °C belassen. Dann wurden sie für 9 Tage in der Klimakammer (Photoperiode 16 h, 23 °C) inkubiert. Anschließend wurden die Keimlinge auf Objektträger transferiert, mit einem Deckgals versehen und mikroskopisch wurde die Anzahl der Seitenwurzeln ausgezählt.

3 Ergebnisse

Zur Charakterisierung des AtPIN1-Proteins wurden verschiedene Ansätze verfolgt: Es wurde untersucht, welche morphogenetischen Veränderungen in *A. thaliana*-Pflanzen durch konstitutive AtPIN1-Überexpression bewirkt werden und welche Auswirkungen auf den Auxintransport erfolgen (3.1). Weiterhin wurde AtPIN1 in Pflanzen unter der Kontrolle eines Glucocorticoid-induzierbaren Promotor exprimiert und die phänotypischen Veränderungen analysiert (3.2). Sowohl in heterologen Expressionssystemen (3.3) als auch in *A. thaliana*-Suspensionskulturen (3.4) wurde AtPIN1 exprimiert und der Auxinefflux untersucht. Desweiteren wurden mögliche funktionelle Beziehungen zwischen AtPIN-Proteinen und PINOID beschrieben (3.5).

3.1 Konstitutive Expression von AtPIN1 im homologen System

Eine Erhöhung der natürlichen AtPIN1-Expression in *A. thaliana* könnte deutliche phänotypische Änderungen zur Folge haben und damit Hinweise auf die AtPIN1-Funktion ergeben. Die *AtPIN1*-cDNA wurde unter der Kontrolle des konstitutiven *CaMV35S*-Promotors in zwei verschiedenen Linien von *A. thaliana* exprimiert: einerseits im Ökotyp Columbia (Col-0), andererseits in der *pin1*-Mutante im Ökotyp Enkheim (Enkttg). Die *pin1-1*-Mutation bedingt eine vollständige Reduktion im AtPIN1-Transkript- und Proteinspiegel (Gälweiler, 1998).

3.1.1 Herstellung des 35S::AtPIN1-Konstrukts

Die *AtPIN1*-cDNA und der *CaMV35S*-Promotor lag bereits in dem Vektor pRT100 vor (Gälweiler, 1998). Das *CaMV*-Terminationssignal (*pA*) wurde als BamHI/HindIII-Fragment aus dem Plasmid pCATGFP (Guido Jach, unveröffentlicht) isoliert und in den HindIII-geschnittenen binären Vektor pSOO1 kloniert (Bernd Reiss, unveröffentlicht). Dieser wurde weiter mit BamHI geschnitten und das ebenfalls mit BamHI geschnittene 35S::AtPIN1-Fragment aus pRT100 eingefügt. Agrobakterien wurden mit diesem Vektor transformiert und auf Resistenz selektiert.

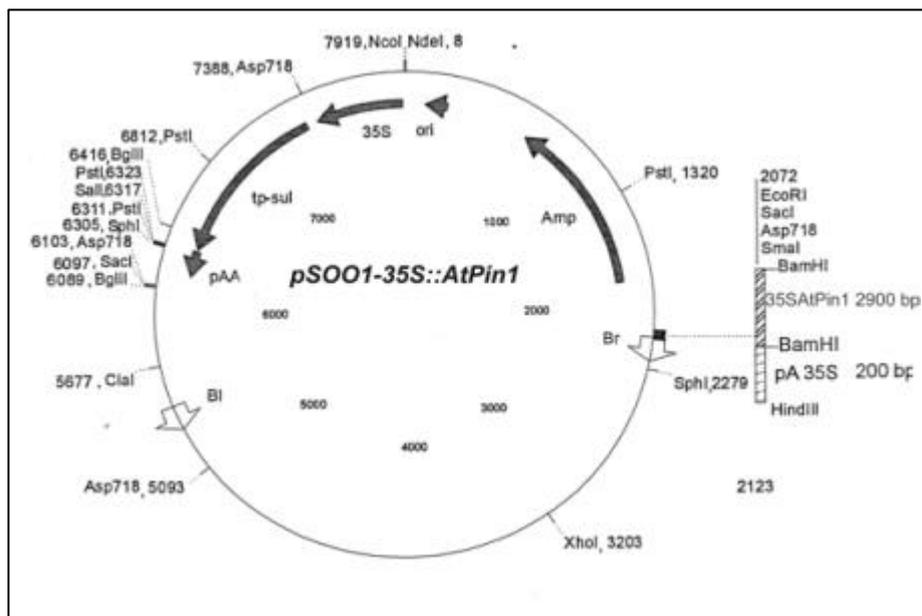


Abb. 1: Binärer Pflanzenvektor pSO01-35S::AtPIN1. Nach Klonierung des *CaMV*-Terminators wurde die 35S::AtPIN1-Kassette in pSO01 eingefügt.

3.1.2 Transformation einer *pin1-1*-Suspensionskultur

In einem ersten Experiment sollte untersucht werden, ob die phänotypischen Änderungen der *pin1*-Mutante durch Komplementation mit dem 35S::AtPIN1-Konstrukt aufgehoben werden können. Da *pin1*-Mutanten steril sind, sollte eine *pin1*-Suspensionskultur transformiert und daraus anschließend Pflanzen regeneriert werden.

Die *pin1*-Suspensionskultur wurde mit Agrobakterien, die das pSO01-35S::AtPIN1-Konstrukt trugen, transformiert und auf Sulfonamid-resistente Kalli selektiert. Nach Vermehrung des Kallusgewebes (s. 2.8.4) konnten 7 resistente Kalli (K1 bis K7) generiert werden.

3.1.3 Regeneration von Pflanzen

Zur Regeneration von Pflanzen wurden die resistenten Kalli auf Nährmedium mit einem Auxin/Cytokinin-Verhältnis $\ll 1$ ausgelegt (s. 2.8.5). Nach ca. 7 Wochen zeigten alle Kalli Chloroplasten-Bildung, teilweise Rosettenblätter, kleine Infloreszenzen und Knospen, vergleichbar den regenerierten Pflanzen aus der *Enkttg*-Suspensionskultur. Eine regenerierte

Pflanze wies *pin*-förmige Infloreszenzen auf, vergleichbar mit den aus der *pin1*-Suspensionskultur regenerierten Pflanzen (s. Tab. 1 und Abb. 2).

Regeneranten aus Kallus-Nr.	Erscheinungsbild
K1	Wildtyp-ähnlich
K2	Wildtyp-ähnlich
K3	Wildtyp-ähnlich
K4	Wildtyp-ähnlich
K5	Blätter, keine Sprosse
K6	Blätter und Sprosse, die <i>pin</i> -förmig enden (<i>pin1</i>)
K7	Blätter, Sprosse, Knospen. Blüten mit mehr als 4 Blütenblätter

Tab. 1: Tabellarische Übersicht der Regeneranten aus *pin1*-Suspensionskultur, transformiert mit dem *35S::AtPIN1*-Konstrukt.

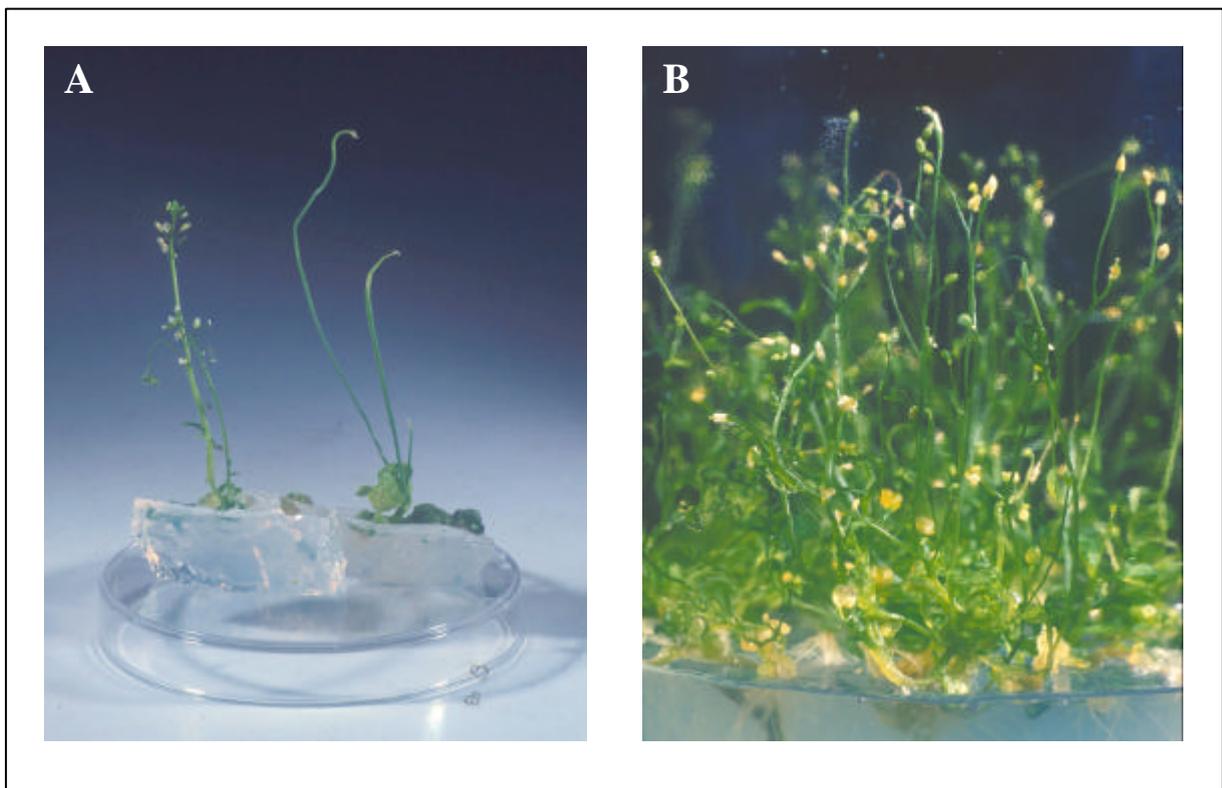


Abb. 2: *In vitro* regenerierte Pflanzen aus verschiedenen Suspensionskulturen. Enkheim-Wildtyp und *pin1*-Mutante (A). *Enk(p1)35S::AtPIN1*-Linie 2 (B).

Die Wurzelbildung wurde durch auxinhaltiges Medium stimuliert und die Pflanzen nach ca. 2 Wochen im Gewächshaus weiter kultiviert. Regenerierte Pflanzen der Kalli K1 bis K4 zeigten ein Wildtyp-ähnliches Erscheinungsbild (s. Abb. 3), so daß von einer Komplementation der *pin1*-Mutante durch das *35S::AtPIN1*-Konstrukt ausgegangen werden kann. Die Pflanzen zeigten keine oder nur kleine Rosettenblätter; was bei der Regeneration aus Suspensionskultur nicht ungewöhnlich ist. Die Regeneranten aus Kallus K7 wiesen einen *pin1*-artigen Phänotyp auf (nicht gezeigt).

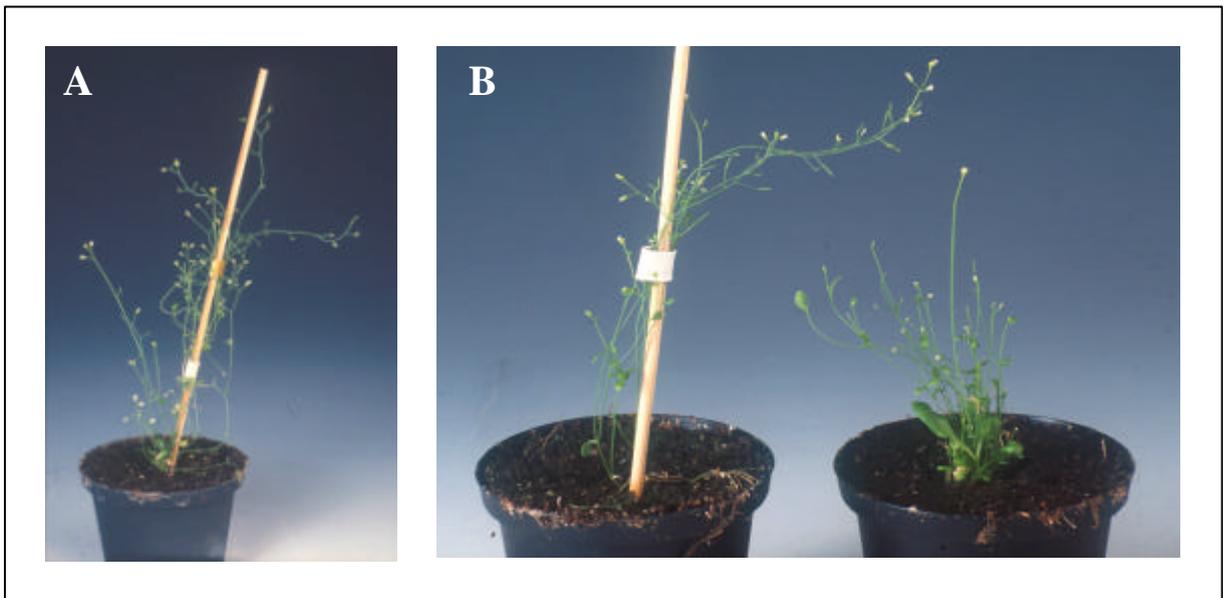


Abb. 3: In das Gewächshaus überführte Regeneranten (T1-Generation) aus *pin1-1*-Suspensionskultur transformiert mit *35S::AtPIN1*-cDNA. Pflanze der Linie 3 (A). Pflanze der Linie 4 und aus *pin1-1*-Suspensionskultur regenerierte *pin1*-Mutante (B).

3.1.4 Selektion und Charakterisierung homozygoter *Enk(p1)35S::AtPIN1*-Pflanzen

Aus den Kalli K1 bis K4 wurden jeweils 3 bis 4 Pflanzen (T1-Generation) bis zur Samenreife gebracht. Pro Pflanze wurden 10 bis 40 Samen gewonnen. Die T2-Generation spaltete auf in Pflanzen mit einem *pin1*- und einem Wildtyp-Phänotyp (s. Tab. 2 und Abb. 4), wobei T2-Pflanzen der Linie 4 buschiger waren und kleinere Schoten zeigten (s. Abb. 5).

Regeneranten aus Kallus-Nr.	Anzahl der Pflanzen mit Wildtyp-Phänotyp	Pflanzen mit <i>pin1</i> -Phänotyp
K1	8	4
K2	10	2
K3	7	3
K4	6	1

Tab. 2: Phänotypische Segregation der T2-Generation von regenerierten Pflanzen aus *pin1-1*-Suspensionskultur transformiert mit *35S::AtPIN1*-cDNA.

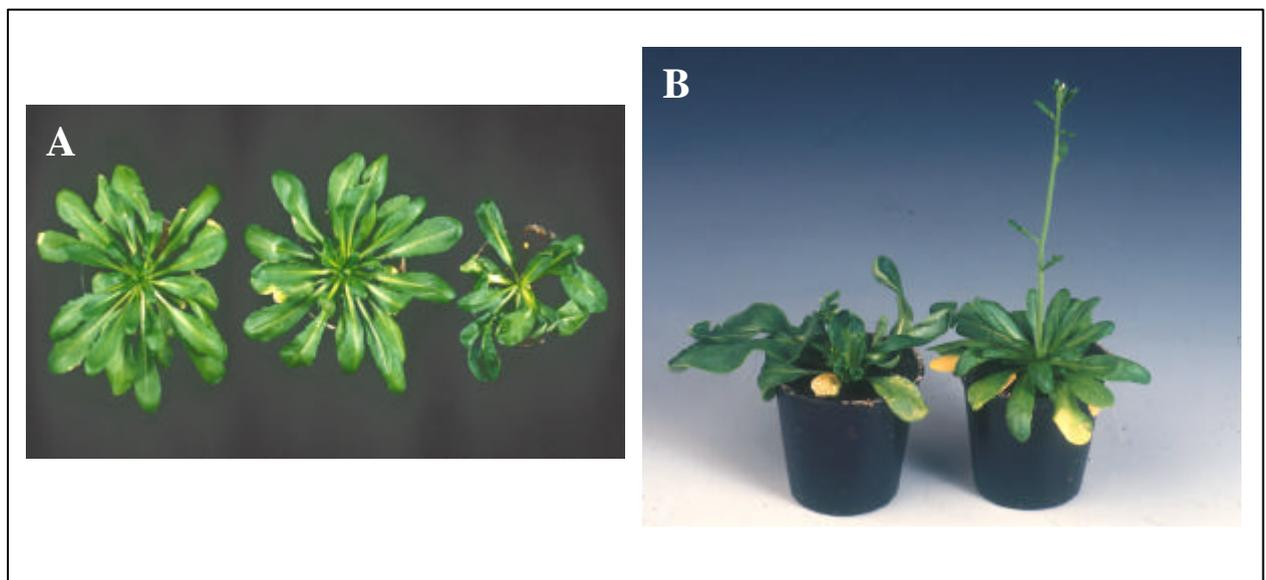


Abb. 4: Phänotypische Segregation von *Enk(p1)35S::AtPIN1*-Pflanzen der T2-Generation, angezogen unter Kurztag-Bedingungen (Photoperiode: 8 h/d). **(A):** 6 Wochen alte Pflanzen. Von links nach rechts: Enkheim-Wildtyp / Linie 1 mit Wildtyp-Phänotyp / Linie 1 mit *pin1*-Phänotyp. **(B):** 7 Wochen alte Pflanzen der Linie 2 mit *pin1*- und Wildtyp-Phänotyp.



Abb. 5: 9 Wochen alte *Enk(p1)35S::AtPIN1*-Pflanzen der T2-Generation aus heterozygoten Populationen der Linien 1, 3 und 4. Von links nach rechts: Enkheim-Wildtyp / Linie 1 mit *pin1*-Phänotyp / Linie 1 mit Wildtyp-Phänotyp / Linie 3 mit Wildtyp-Phänotyp / Linie 4 mit geringen Abweichungen zum Wildtyp-Phänotyp.

Zur Identifizierung homozygoter Pflanzen wurde die Aufspaltung der Sulfonamid-Resistenz von je 10 Nachkommen der T2-Generation untersucht. Dazu wurden jeweils etwa 50 Keimlinge auf antibiotikahaltigem Medium angezogen. Nachkommen der Kalli K1, K2 und K3 segregierten nicht (homozygot für die T-DNA-Insertion), oder zeigten annähernde 3:1 Segregation (heterozygot für die Insertion). Nachkommenpflanzen des Kallus K4 segregierten höher (ca. 14:1) und wurden nicht weiter untersucht.

Sowohl in homo- als auch in heterozygoten *Enk(p1)35S::AtPIN1*-Pflanzen ist der *pin1*-Phänotyp aufgehoben. Die *AtPIN1*-cDNA ist demnach funktionell aktiv und kann zur Analyse der AtPIN1-Proteinfunktion in *A. thaliana* verwendet werden.

3.1.5 *In planta* Transformation und Selektion transgener Col35S::*AtPIN1*-Pflanzen

Nachdem die Funktionalität des 35S::*AtPIN1*-cDNA-Konstrukts gezeigt worden war, wurden *A. thaliana*-Pflanzen des Ökotyps Columbia (Col-0) transformiert (s. 2.2.6) und zur Samenreife gebracht. Die Samen von je 4 bis 5 Pflanzen wurden vereinigt, oberflächensterilisiert und auf Sulfonamid-Resistenz selektiert. 4 Pools der T1-Generation (insgesamt 125 Pflanzen) wurden im Gewächshaus zur Samenreife gebracht (im weiteren als Col35S::*AtPIN1* bezeichnet). 26 dieser Pflanzen zeigten *pin1*-Phänotyp, möglicherweise verursacht durch Gen-*silencing* von endogenem *AtPIN1*.

3.1.6 Phänotypische Charakterisierung der Enk(p1)35S::*AtPIN1*- und Col35S::*AtPIN1*-Pflanzen

Die Expression von *AtPIN1* unter der Kontrolle des *CaMV35S*-Promotors sollte bei den generierten Pflanzenlinien in den beiden Ökotypen Columbia und Enkheim untersucht werden. Dabei sollte vor allem analysiert werden, wie die *AtPIN1*-Überexpression

- den polaren Auxintransport verändert und damit
- die Entwicklung der Pflanzen beeinträchtigt.

*Enk(p1)35S::*AtPIN1*-Pflanzen*

Während in oberirdischen Pflanzenteilen keine auffälligen Veränderungen beobachtet wurden (s. Abb. 6), zeigten die Wurzeln der drei Enk(p1)35S::*AtPIN1*-Linien ein verändertes gravitropes Wachstum: Die Wurzeln von Keimlingen, angezogen auf vertikal gestellten Agarplatten, wuchsen nicht entlang des Schwerkraftvektors nach unten, sondern rollten sich ein und zeigten kein orientiertes Wachstum (s. Abb. 6).

Dies kann nicht auf eine unzureichende Komplementation zurückzuführen sein, weil *pin1*-Mutanten keinen entsprechenden Phänotyp der Wurzel aufweisen (Gälweiler, 1998). Daher wird vermutet, daß die phänotypischen Änderungen des Wurzelwachstums der Enk(p1)35S::*AtPIN1*-Linien durch die ectopisch Expression von *AtPIN1* verursacht wurden.

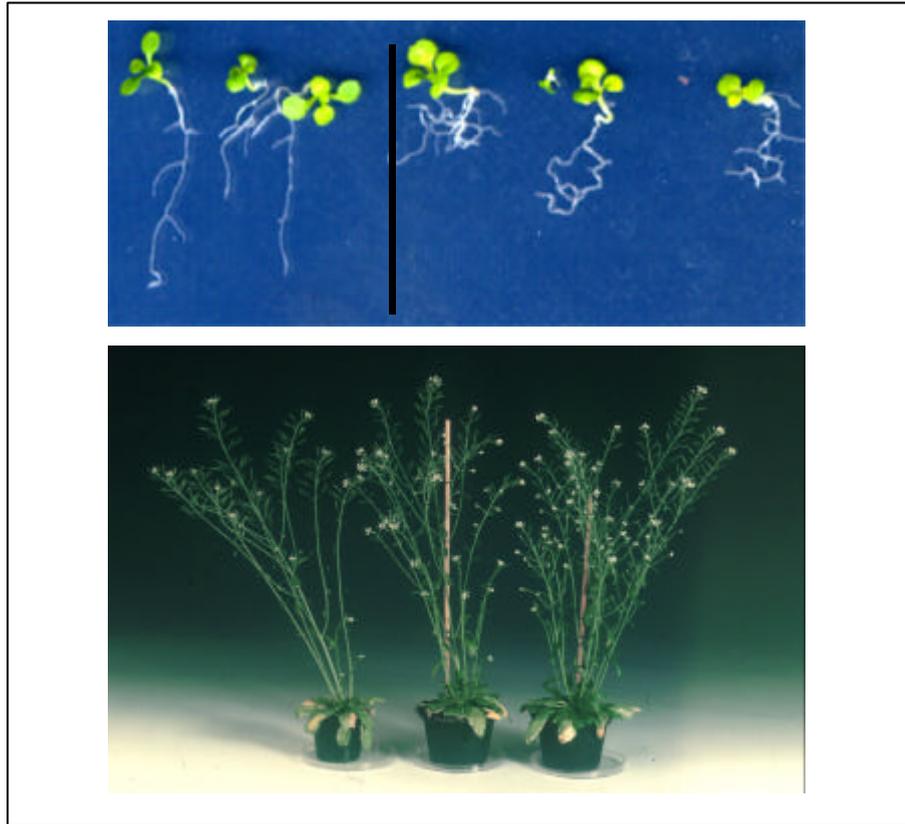


Abb. 6: Phänotypische Untersuchung von *Enk(p1)35S::AtPIN1*. **Oben:** 10 d alte Enk Wildtyp-/ *Enk(p1)35S::AtPIN1*-Pflanzen. **Unten:** Enk Wildtyp- und *Enk(p1)35S::AtPIN1*-Pflanzen der Linien 2 und 3 am Ende der Wachstumsperiode.

Col35S::AtPIN1-Pflanzen

24 der verbliebenen 99 T2-Linien der *Col35S::AtPIN1*-Pflanzen (s. 3.1.5) wurden auf veränderte Keimung und Defekte in den ersten 2 Wochen der Entwicklung untersucht. Dabei wurden 4 Linien identifiziert, deren Keimlinge ein stark gestörtes gravitropes Wurzelwachstum aufwiesen, ähnlich *Enk(p1)35S::AtPIN1*-Pflanzen (s. Tab. 4). Diese Populationen wurden auf Sulfonamid-Resistenz selektiert. Linien, die annähernd 3:1 segregierten, wurden vermehrt. Durch erneute Segregationsanalyse von Pflanzen der T3-Generation konnten die homozygoten Insertionslinien identifiziert werden.

Um die Stabilität des Wurzelphänotyps zu bestätigen, wurden Pflanzen der T3- und T4-Generationen untersucht: Alle Keimlinge der Linien 6_1, 9_9 und 9_11 zeigten ein gestörtes gravitropes Wachstum. Bei den Keimlingen der Linie 7_1 konnten keine Änderungen festgestellt werden (s. Abb. 7).

Ausprägung des Phänotyps in Wurzeln	Anzahl der Linien
stark	4
schwach/mittel	9
Wildtyp-ähnlich	11

Tab. 4: Analyse des Wurzelwachstums von 24 Linien, 14 d alte Col35S::*AtPIN1*-Pflanzen der T2-Generation.

Für die weiteren Untersuchungen wurden, je nach Ausprägung des Wurzelphänotyps, homozygote Pflanzen der zwei starken Linien 6_1 und 9_11, der schwächeren Linie 9_9 und der Wildtyp-ähnlichen Linie 7_1 verwendet.

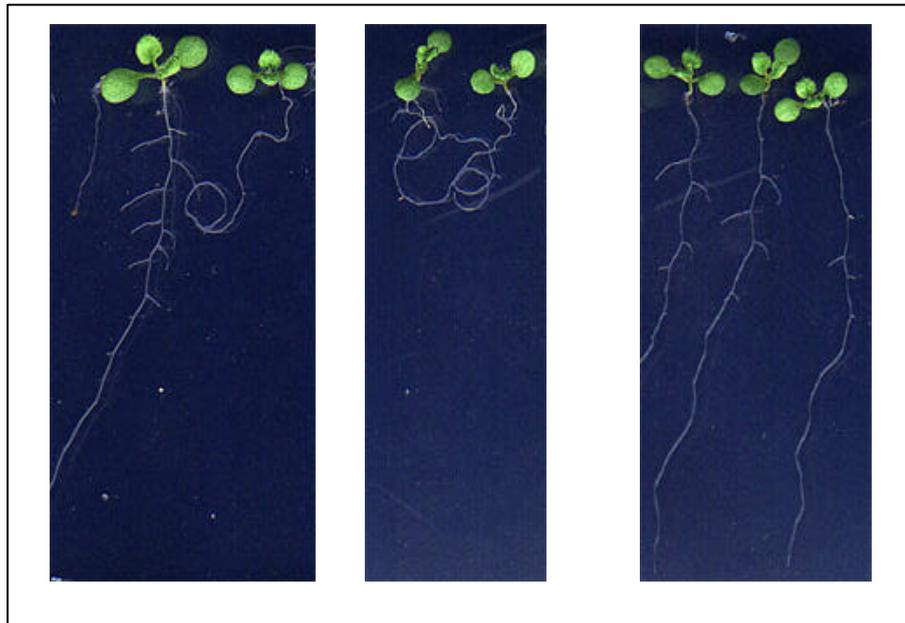


Abb. 7: Phänotypische Änderungen bei 9 Tage alten, vertikal gewachsenen Keimlingen der T3-Generation verschiedener Col35S::*AtPIN1*-Linien. **Links:** Columbia Wildtyp / Col35S::*AtPIN1* 6_1. **Mitte:** Col35S::*AtPIN1* 9_11. **Rechts:** Col35S::*AtPIN1* 7_1.

In den Linien 6_1, 9_11 und 9_9 wurde bei einigen Pflanzen ähnliche Defekte wie bei *pin1*-Mutanten beobachtet. Die Veränderungen traten frühestens ab der 5. Woche auf und betrafen nicht die gesamte Pflanze, sondern nur einzelne Blätter bzw. Seitentriebe und deren Blüten. Die Blätter waren teilweise fasziert, wiesen verdickte Blattadern auf, die Hauptinfloreszenzen zeigten, bei wiltypartigem Wachstum, *pin1*-förmige Enden (s. Abb. 8). Innerhalb der untersuchten Linien war der Anteil der betroffenen Pflanzen variabel. Diese vereinzelt auftretenden phänotypischen Veränderungen deuten jedoch nicht auf Effekte durch ectopisch exprimiertes AtPIN1 hin, da *Enk(p1)35S::AtPIN1*-Pflanzen keinen derartigen Phänotyp zeigen. Eine mögliche Erklärung könnte sein, daß hier die Translation sowohl der exogenen-, als auch der endogenen *AtPIN1*-mRNA durch PTGS (*post transcriptional gene silencing*) unterbunden wurde. PTGS kann in der späteren Pflanzenentwicklung auftreten, ist positiv abhängig von der Transkriptmenge und muß nicht die ganze Pflanze bzw. alle Pflanzen einer Population betreffen (zur Übersicht Vaucheret *et al.*, 1998).



Abb.8: 10 Wochen alte *Col35S::AtPIN1*-Pflanzen der Linien 6_1 und 9_11. Columbia-Wildtyp / *Col35S::AtPIN1* 6_1 / *Col35S::AtPIN1* 9_11 (A). *Col35S::AtPIN1* 9_11 mit phänotypischem *pin1*-Anteil (nackte Infloreszenzspitze, s. Pfeile) (B).

Die Integration einer T-DNA in ein Gen kann zu *loss of function*-Mutationen führen. Diese sind meist rezessiv, d. h. heterozygote Pflanzen zeigen keine Defekte. Demgegenüber sind die inserierten Gene, bzw. cDNA unter Kontrolle des *CaMV35S*-Promotors meist dominant, d. h. heterozygote Pflanzen weisen den durch das Transgen hervorgerufenen Phänotyp auf.

Um relativ sicher ausschließen zu können, daß das gestörte Wurzelwachstum bei *35S::AtPIN1*-Pflanzen nicht durch einen Gen-*knock out* verursacht wurde, wurden homozygote Pflanzen der Linien 6_1, 7_1, 9_9 und 9_11 gegen Col-0 Wildtyp-Pflanzen gekreuzt. Die heterozygoten Nachkommen zeigten, mit Ausnahme von Keimlingen der Linie 7_1, alle ein gestörtes Wurzelwachstum (s. Abb. 9). Daher kann angenommen werden, daß der Phänotyp auf ectopische *AtPIN1*-Expression zurückzuführen ist.

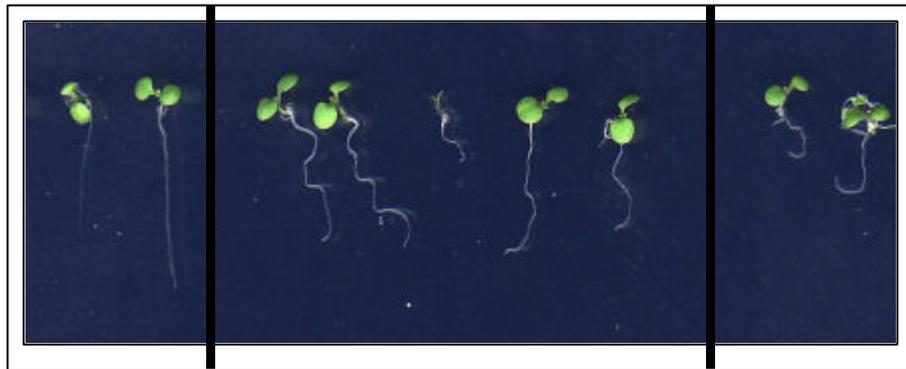


Abb. 9. 7 d alte Keimlinge der Kreuzung (F1-Generation) Columbia-Wildtyp (weiblich) mit Col35S::*AtPIN1* 6_1 (männlich). **Links** Columbia-Wildtyp. **Mitte** Columbia-Wildtyp x Col35S::*AtPIN1* 6_1. **Rechts** Col35S::*AtPIN1* 6_1.

3.1.7 Southern-Blot-Analysen der *Enk(p1)35S::AtPIN1*- und *Col35S::AtPIN1*-Pflanzen

Da die *Enk(p1)35S::AtPIN1*-Pflanzen aus einer Suspensionskultur regeneriert wurden und ein transgener Kallus zu zwei oder mehr genetisch identischen, regenerierten Pflanzen führen könnte, sollte durch Southern-Blot-Analyse die Unabhängigkeit der Insertionsereignisse überprüft werden. Weiterhin wurde die T-DNA-Kopienzahl der 4 verwendeten, homozygoten *Col35S::AtPIN1*-Linien (6_1, 7_1, 9_9 und 9_11) ermittelt.

Die genomische DNA wurde mit den Restriktionsenzymen *DraI* und *SspI* verdaut. Zur Detektion des *AtPIN1*-spezifischen Signals wurde die elektrophoretisch aufgetrennte, filtergebundene DNA mit einem 497 bp Fragment der *AtPIN1*-cDNA (bp 699-1002) hybridisiert (Gälweiler *et al.*, 1998). Das *AtPIN1*-Gen konnte nach *DraI*-Verdau bei einer Größe von etwa 2,7 kb und nach *SspI*-Verdau bei einer Größe von etwa 3,5 kb in allen untersuchten Pflanzenlinien detektiert werden (s. Abb. 10).

In den *Enk(p1)35S::AtPIN1*-Linien 2 und 3 konnte zusätzlich zum Signal des endogenen *AtPIN1* jeweils eine Bande detektiert werden, die mit der *35S::AtPIN1*-Insertion korreliert (s. Abb. 10): in der Linie 2 bei etwa 3,4 kb (*DraI*) und 3,7 kb (*SspI*), in der Linie 3 bei etwa 3,4 kb (*DraI*) und 7 kb (*SspI*).

In den *Col35S::AtPIN1*-Linien 6_1, 7_1 und 9_11 konnten zusätzlich zum Signal des endogenen *AtPIN1* jeweils zwei zusätzliche Banden detektiert werden, die mit der *35S::AtPIN1*-Insertion korrelierten (s. Abb. 10). In der Linie 6_11 bei etwa 3,4 kb/3,5 kb (*DraI*) und 5,5 kb/6 kb (*SspI*), in der Linie 7_1 bei etwa 2,8 kb/3,2 kb (*DraI*) und 5 kb/8 kb (*SspI*) und in der Linie 9_11 bei etwa 2,3 kb/3,2 kb (*DraI*). Dies läßt darauf schließen, daß die Linien 6_1, 7_1 und 9_11 jeweils mindestens zwei T-DNA-Insertionen aufweisen, die in unterschiedlichen genetischen Loci vorliegen. In Linie 9_9 wurde eine zusätzliche Bande detektiert (s. Abb. 10): 3,2 kb (*DraI*) und 5 kb (*SspI*). Es kann davon ausgegangen werden, daß es sich um eine Einzelkopienlinie handelt.

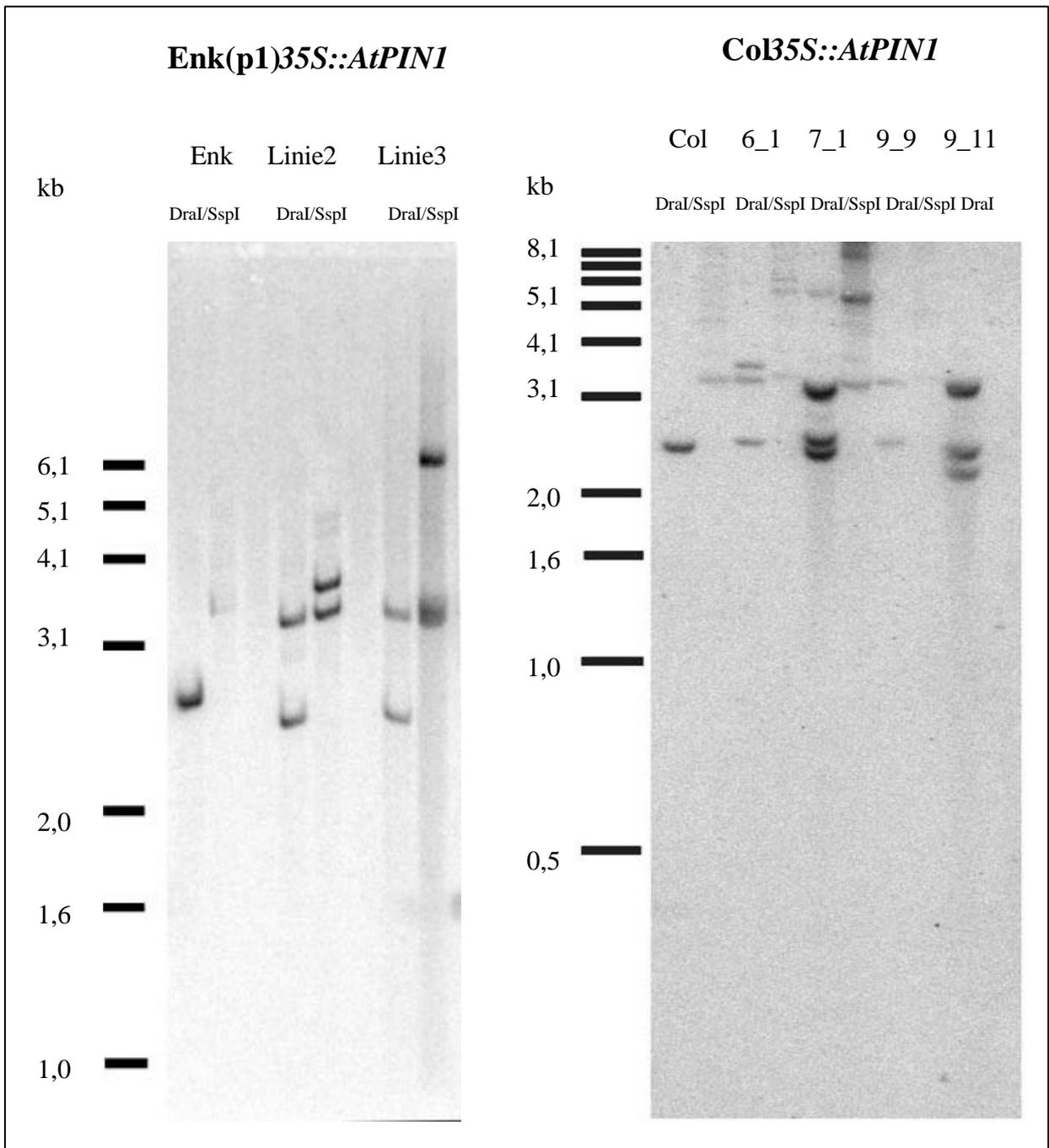


Abb. 10: Southern-Blot-Analyse der homozygoten *35S::AtPIN1*-Pflanzen sowie Enkheim (Enk) und Columbia (Col) Kontrollen. Je 1 µg genomischer DNA wurde mit den angegebenen Enzymen verdaut, in einem 1 %igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nylonmembran transferiert. Die Hybridisierung erfolgte mit einem 497 bp *AtPIN1*-cDNA-Fragment.

3.1.8 Zeitliche Auflösung des gravitropen Wurzelwachstums

Zur genaueren Charakterisierung der gravitropen Defekte durch ectopische AtPIN1-Expression wurde bei verschiedenen Pflanzenlinien der zeitliche Verlauf der Neuorientierung der Wurzelspitze nach Änderung des Schwerkraftvektors untersucht. 4 d alte Keimlinge von einer *Enk(p1)35S::AtPIN1*-Linie (2) und 2 *Col35S::AtPIN1*-Linien mit stark agravitropen Wurzelwachstum (6_1 und 9_11) wurden auf vertikal ausgerichteten Agar-Platte durch eine 90°-Drehung gravistimuliert und der Verlauf des Wurzelwachstums aufgezeichnet (s. 2.9.1).

Die Wildtyp-Kontrollen in den verschiedenen Ökotypen reagierten nach 1 h mit um 14° bzw. 24° gekrümmten Wurzelspitzen deutlich auf die Änderung des Schwerkraftvektors, nach etwa 6 h war die Neuorientierung annähernd abgeschlossen (s. Abb. 11). Die Keimlinge der *Enk(p1)35S::AtPIN1*-Linie zeigten eine deutliche Verzögerung des Wurzelwachstums auf den Gravistimulus und nach 6 h keine Parallelität zum Schwerkraftvektor (s. Abb. 11). Die Wurzelspitzen von Pflanzen der *Col35S::AtPIN1*-Linien 6_1 und 9_11 zeigten nach 6 h keine signifikante Änderung der Orientierung (s. Abb. 11).

Durch ectopische AtPIN1-Expression ist die Änderung des Wurzelwachstums durch gravitrope Stimuli drastisch verlangsamt, nicht aber vollständig aufgehoben (vgl. dazu auch Abb. 7).

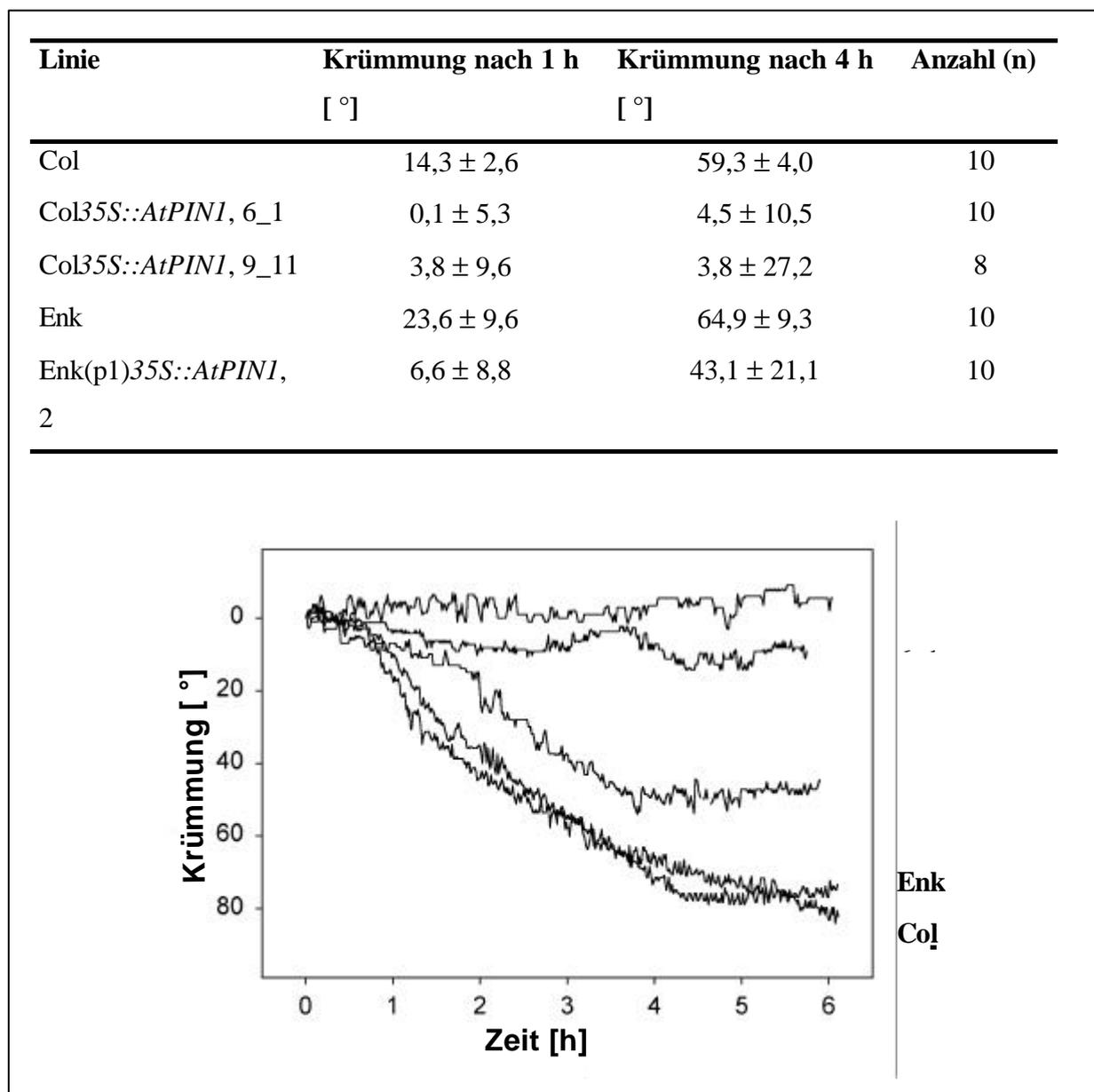


Abb. 11: Zeitliche Auflösung der Wurzelspitzenkrümmung verschiedener Pflanzenlinien nach 90°-Drehung der Agar-Platte. **Oben:** Tabellarische Übersicht über die mittlere Krümmung der Wurzelspitzen nach 1 h und nach 4 h. **Unten:** Graphische Darstellung der Wurzelspitzenkrümmung von Keimlingen der einzelnen Linien. Aufgetragen ist der Winkel zwischen Wurzelspitze und der Horizontalen gegen die Zeit.

3.1.9 Western-Blot-Analyse

Phänotypische Änderungen durch ectopische AtPIN1-Expression wurden vor allem in Wurzeln gefunden und waren in unterschiedlichen Linien verschieden stark ausgeprägt. Um zu klären, ob die AtPIN1-Proteinmenge mit der Stärke der Störung des gravitropen Wurzelwachstums korreliert, wurde die Expression in mikrosomalen Proteinfractionen aus 4 Wochen alten Wurzelkulturen durch Westernblot-Analyse untersucht.

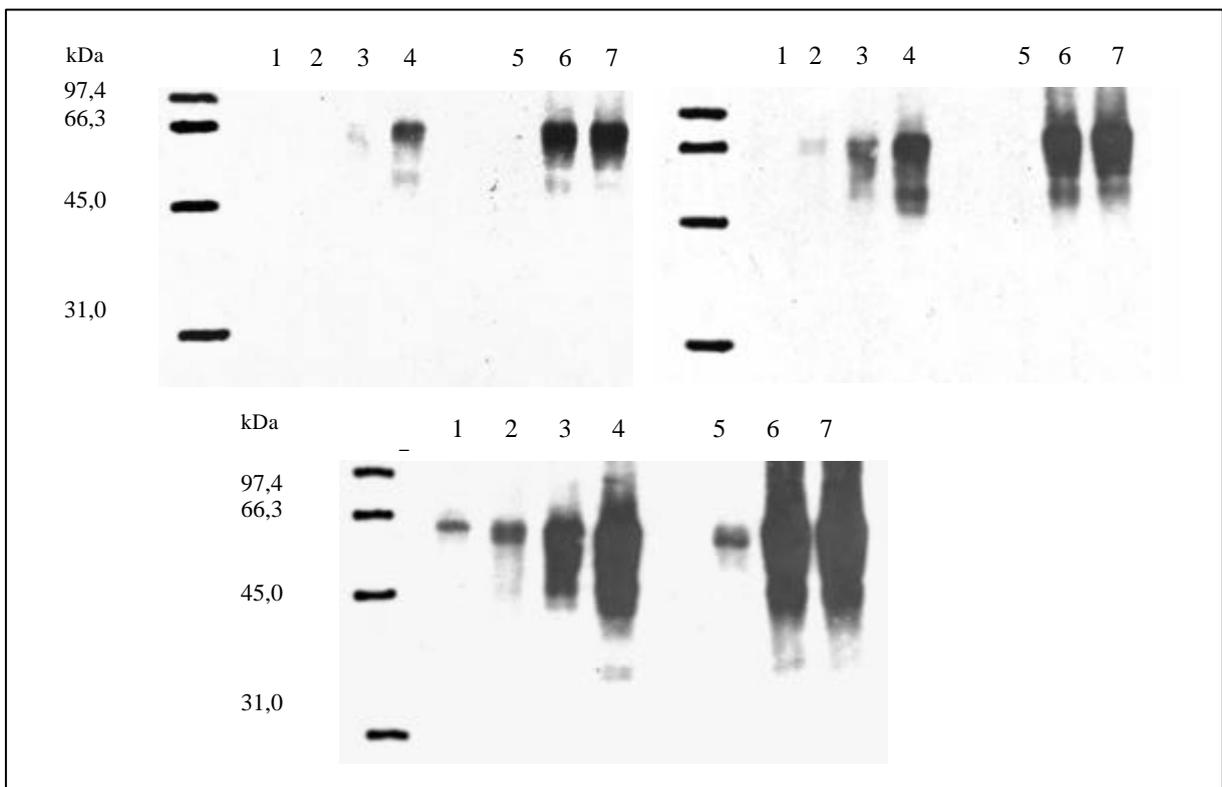


Abb. 12: Western-Blot-Analyse von Enk(p1)35S::AtPIN1- und Col35S::AtPIN1-Linien. Jeweils 20 µg mikrosomaler Proteine aus Wurzeln wurden aufgetragen. Die Proteine wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und auf PVDF-Membran transferiert. Es wurde polyklonaler, affinitätsgereinigter anti-AtPIN1-Antikörper verwendet. Die Detektion erfolgte durch Chemiluminiszenz über einen Peroxidase-gekoppelten sekundären Antikörper. Abgebildet sind 3 verschiedene Expositionszzeiten des Blots gegen Film (30 Sekunden, 5 Min und 45 Min). Aufgetragen sind: Col (1), Col35S::AtPIN1 7_1 (2), Col35S::AtPIN1 6_1 (3), Col35S::AtPIN1 9_11 (4), Enk (5), Enk(p1)35S::AtPIN1-Linie 2 (6), Enk(p1)35S::AtPIN1-Linie 3 (7).

Das Hauptsignal konnte bei einer apparenten molekularen Masse von ca. 66 kDa detektiert werden, was gut mit dem errechneten Molekulargewicht für AtPIN1 von 67 kDa korreliert (Gälweiler *et al.*, 1998). Bei längerer Expositionszeit wurde eine weitere Bande bei ca. 45 kDa detektiert, die wahrscheinlich ein AtPIN1-Degradationsprodukt darstellt. Nach längerer Expositionszeit konnte das AtPIN1-spezifische Signal in Col35S::AtPIN1 7_1 und den

Columbia- und Enkheim-Wildtypen detektiert werden, wobei die AtPIN1-Expression in Col35S::*AtPIN1* 7_1 nur geringfügig stärker ist als in der Columbia-Wildtyp-Kontrolle (s. Abb. 12).

Ein Vergleich der Columbia-Linien zeigt, daß die Störung des Wurzelwachstums mit der Menge an AtPIN1 zu korrelieren scheint: Eine geringfügig erhöhte AtPIN1-Expression in Linie 7_1 führt zu keinen deutlichen Veränderungen, während stark erhöhte Expression in der Linie 9_11 in stark gestörtem gravitropen Wurzelwachstum resultiert (vgl. Abb. 7 und 11 mit Abb. 12). Für Enk(p1)35S::*AtPIN1* trifft dies nicht zu: In Wurzeln der Linie 2 und 3 ist die AtPIN1-Expression stark erhöht, der Gravitropismusdefekt in Linie 2 ist dagegen schwächer als in den Col35S*AtPIN1*-Linien 6_1 und 9_11 (s. Abb. 11).

3.1.10 Lokalisierung von ectopisch exprimiertem AtPIN1 in Wurzelspitzen

In den vorangegangenen Abschnitten wurde gezeigt, daß die ectopische AtPIN1-Expression zu deutlichen phänotypischen Änderungen des Wurzelwachstums führt. Daher sollte durch immunocytochemische *whole mount*-Analysen untersucht werden, ob die gewebespezifische und intrazelluläre AtPIN1-Lokalisierung in Wurzelspitzen von Enk(p1)35S::*AtPIN1*- und Col35S::*AtPIN1*-Keimlingen verändert ist.

In Wurzelspitzen von Wildtyp-Keimlingen ist AtPIN1 in den Zellen der Stele, des Perizykel und der Endodermis vornehmlich am apikalen Ende lokalisiert, wobei ein schwächeres Signal im lateralen Plasmalemma gefunden wurde (s. Abb. 13 C/D).

In Wurzelspitzen von Enk(p1)35S::*AtPIN1*- und Col35S::*AtPIN1*-Pflanzen wurde in den genannten Zellen dieselbe AtPIN1-Lokalisierung gefunden. Zusätzlich konnte AtPIN1-Fluoreszenz in der Wurzelhaube, der Epidermis und in Rindenzellen detektiert werden. In diesen Zelltypen wurden die Signale vornehmlich am apikalen (unteren) Ende der Zellen detektiert, wobei es bis zu 1/3 der Zelllänge an den Längsseiten lokalisiert sein konnte. Es wurde nicht am basalen Zellende detektiert (s. Abb. 13 A/B).

Die starke AtPIN1-Überexpression (vgl. Abb. 12) hat offensichtlich keinen Einfluß auf die intrazelluläre Lokalisierung: Das Protein wurde vor allem im basalen Bereich der Plasmamembran detektiert, auch in Zellen, die kein endogenes AtPIN1-Protein aufweisen.

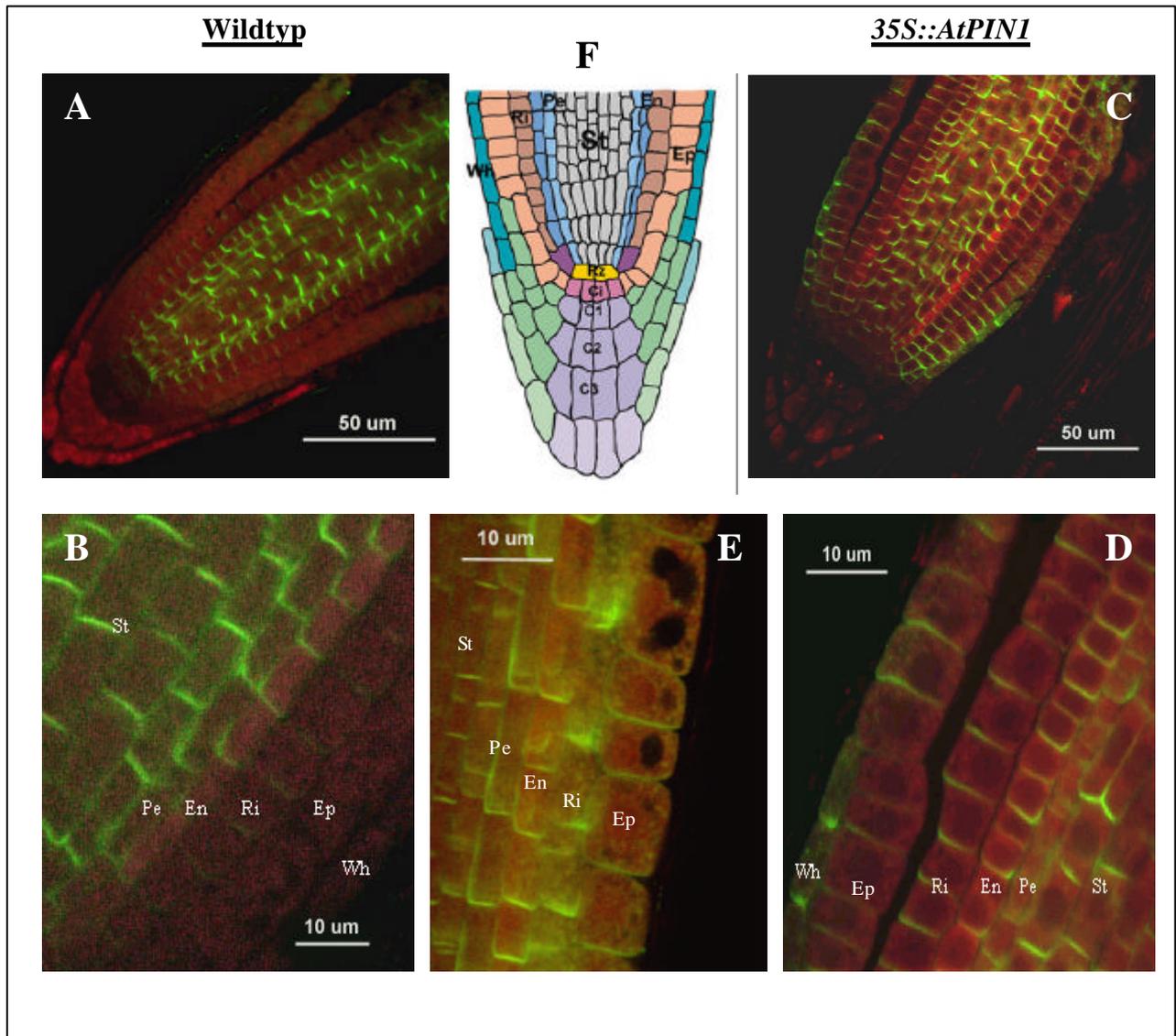


Abb. 13: AtPIN1-Lokalisierung in Wurzelspitzen von 4 Tage alten Pflanzen mit polyklonalem affinitätsgereinigtem anti-AtPIN1-Antikörper. Die Detektion erfolgte mit FITC-gekoppelten Sekundärantikörpern mittels konfokaler Laserscanning-Mikroskopie. AtPIN1 in Columbia-Wildtyp (**A**), darunter ist ein vergrößerter Ausschnitt (**B**) abgebildet. AtPIN1 in Col35S::AtPIN1-Linie 6_1 (**C**), darunter ist ein vergrößerter Ausschnitt (**D**) abgebildet. AtPIN1 in Col35S::AtPIN1-Linie 6_6 (**E**). Der rötliche Hintergrund wurde mit einem TRITC-Filter aufgenommen, das grüne AtPIN1 Signal mit einem FITC-Filter. Anschließend wurden die Bilder überlagert. (**F**) Schematische Darstellung der *A. thaliana*-Wurzelspitze mit Kennzeichnung der verschiedenen Zelltypen. St: Stele; Pe: Perizykel; En: Endodermis; Ri: Rindenzellen; Ep: Epidermis; Wh: Wurzelhaube; Rz: Ruhendes Zentrum; Ci: Columella-Initialen; C1-3: Columella Zellschichten 1 bis 3.

3.1.11 AtPIN2-Lokalisierung in Wurzelspitzen von Enk(p1)35S::AtPIN1- und Col35S::AtPIN1-Pflanzen

Die Homologie der Mitglieder der *AtPIN*-Genfamilie untereinander ist sehr hoch, so daß nicht ausgeschlossen werden kann, daß die Überexpression von *AtPIN1* zu einem Gen-*silencing* anderer *AtPIN*-Gene geführt haben könnte. Von den 4 bislang charakterisierten Mutanten führen nur Mutationen im *AtPIN2*-Gen zu stark gravitrop gestörtem Wurzelwachstum (Müller *et al.*, 1998). Daher sollte in Wurzelspitzen von Enk(p1)35S::*AtPIN1*- und Col35S::*AtPIN1*-Keimlingen immunocytochemisch die Expression und Lokalisierung von *AtPIN2* untersucht werden (Antikörper s. 2.1.7.4).

In Wildtyp-Kontrollen wurden neben der bereits beschriebenen *AtPIN2*-Expression in Rindenzellen und Epidermiszellen (Müller *et al.*, 1998) zum ersten Mal auch Signale in den weiter oben gelegenen Zellen der Wurzelhaube am basalen (oberen) Zellende detektiert. In Promotor-GUS-Analysen wurde in diesen Zellen *AtPIN2*-Promotor-Aktivität nachgewiesen (A. Müller, persönliche Mitteilung). In Epidermis-Zellen ist *AtPIN2* ebenfalls basal lokalisiert, während es in Zellen der Rinde am entgegengesetzten, apikalen (unteren) Ende lokalisiert (s. Abb. 14). In Wurzelspitzen von Enk(p1)- und Col35S::*AtPIN1*-Pflanzen wurde *AtPIN2* in den gleichen Zelltypen und mit gleicher intrazellulärer Verteilung detektiert (s. Abb. 15). Die beobachtete Signalstärke war vergleichbar mit der in Wildtyp-Keimlingen.

Das gravitrop gestörte Wurzelwachstum in *AtPIN1*-überexprimierenden Pflanzen kann also nicht durch Gen-*silencing* oder eine Mislokalisierung von *AtPIN2* erklärt werden.

Faßt man 3.1.10 und 3.1.11 zusammen, so ist festzustellen, daß ectopisch exprimiertes *AtPIN1* in Wurzelspitzen immer am apikalen Zellende lokalisiert ist, wohingegen *AtPIN2*, je nach Zelltyp, sowohl basal als auch apikal vorliegt.

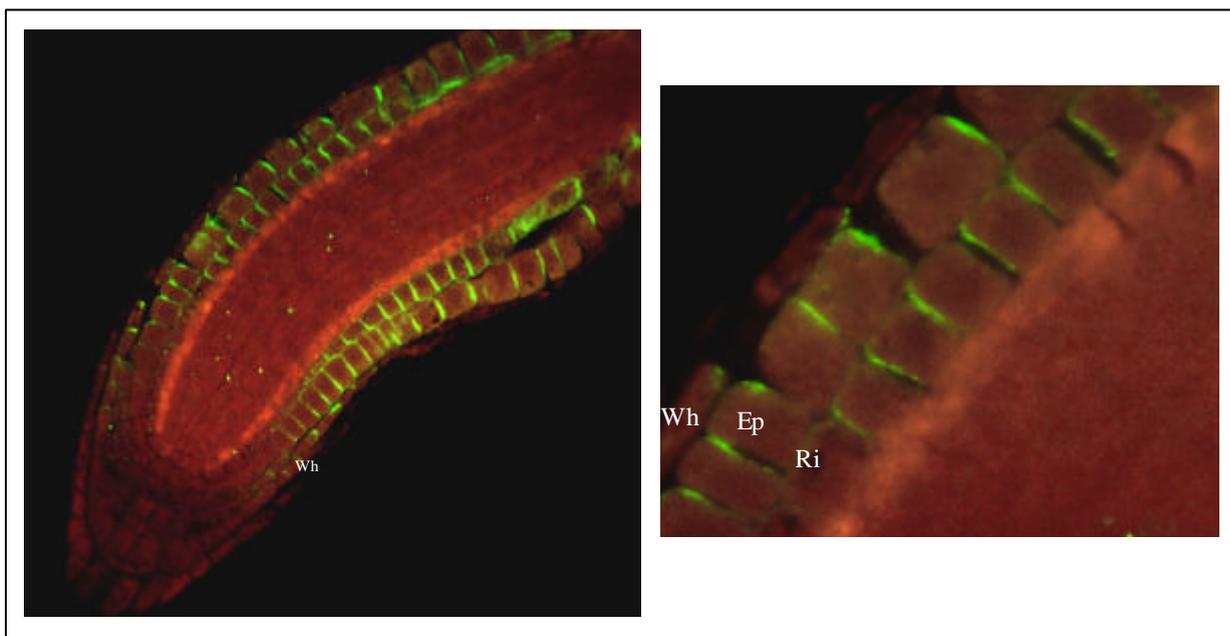


Abb. 14: AtPIN2-Lokalisierung in Wurzelspitzen von 5 d alten Columbia-Keimlingen. Als Erstantikörper wurde ein polyklonaler, affinitätsgereinigter anti-AtPIN2-Antikörper verwendet. Die Detektion erfolgte mit FITC-gekoppelten Sekundärantikörpern und mittels konfokaler Laserscanning-Mikroskopie. **Links:** Wurzelspitze. **Rechts:** Vergrößerter Ausschnitt. Bezeichnung der Zelltypen s. Abb. 13.

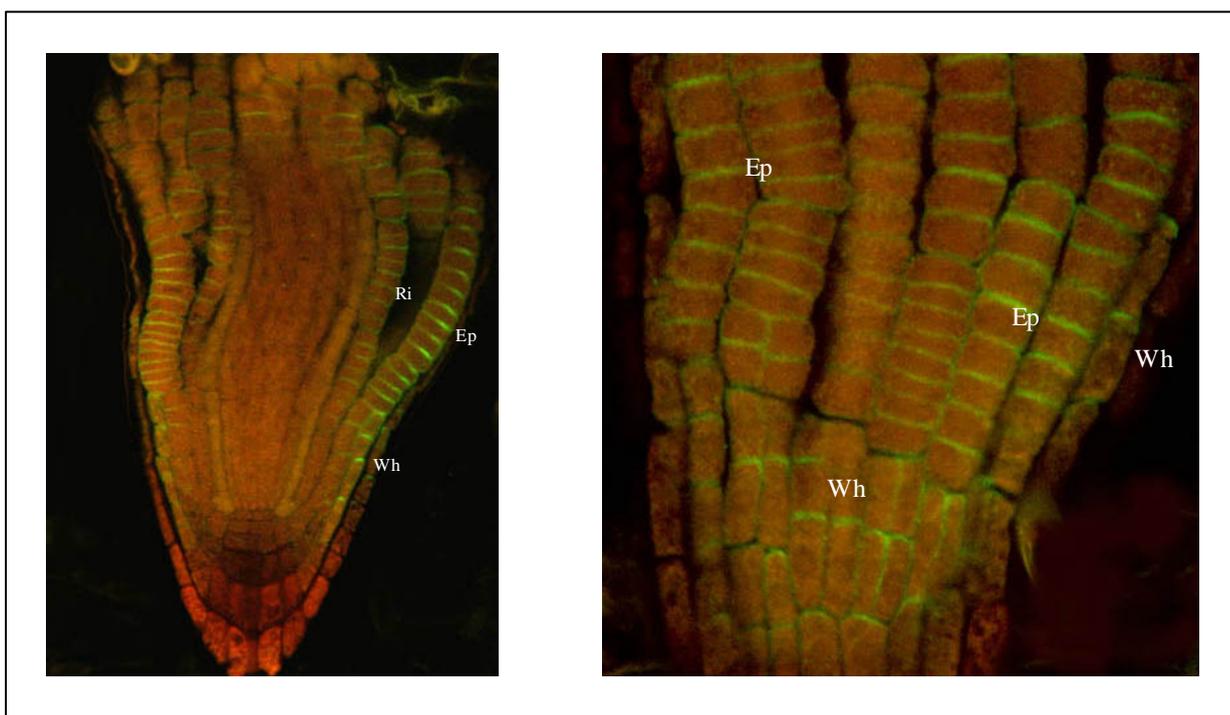


Abb. 15: AtPIN2-Lokalisierung in Wurzelspitzen von 5 Tage alten Col35S::AtPIN1 9_11-Keimlingen. mit polyklonalem affinitätsgereinigtem anti-AtPIN2 Antikörper. Die Detektion erfolgte mit FITC-gekoppelten Sekundärantikörpern und mittels konfokaler Laserscanning-Mikroskopie. **Links:** Optischer Schnitt durch die Mitte der Wurzelspitze. **Rechts:** Vergrößerte Ansicht. Der optischer Schnitt erfolgte in Höhe der Epidermis.

3.1.12 Auxinverteilung in Wurzelspitzen von *Enk(p1)35S::AtPIN1* und *Col35S::AtPIN1*-Pflanzen und *pin1-1*-Mutante

Die Detektion von freiem Auxin auf zellulärer Ebene ist bisher nicht möglich. Durch Aktivitätsmessungen des synthetischen, auxininduzierbaren Promotorelements (*DR5*) kann die Auxinmenge indirekt detektiert werden. Dieses Promotorelement besteht aus 7 hintereinander angeordneten Nukleotidsequenzen (TGTCTC) aus dem Promotor des auxininduzierbaren *GH3*-Gens aus Sojabohne, fusioniert an den *CaMV35S*-Minimalpromotor und das β -Glucuronidase Reportergen (*GUS*) (Ulmasov *et al.*, 1997a). Massenspektroskopische Untersuchungen haben gezeigt, daß die Expressionsstärke und das lokale Maximum der *DR5::GUS*-Aktivität mit der tatsächlichen Verteilung von freiem Auxin in der Wurzelspitze korrelieren (Casimiro *et al.*, 2001; Bhalerao *et al.*, 2002; Friml *et al.*, 2002b; Ottenschläger, 2002).

Einbringung des *DR5::GUS*-Reportergen-Konstrukts in *Enk(p1)*- und *Col35S::AtPIN1*-Pflanzen sowie in die *pin1-1*-Mutante

3 *Col35S::AtPIN1*-Linien (2 starke Überexpressionslinien 6_1 und 9_11 und eine schwache Linie 7_1) wurden mit einer *ColDR5::GUS*-Linie (Ottenschläger, 2002) gekreuzt. Als Kontrollen dienten Kreuzungen von Columbia-Wildtyp- mit *ColDR5::GUS*-Pflanzen. Die Untersuchungen wurden mit den F1-Pflanzen durchgeführt.

Im Ökotyp Enkheim lagen keine *DR5::GUS*-Pflanzen vor. Kreuzungen zwischen verschiedenen *A. thaliana*-Ökotypen sind aufgrund des Heterosiseffekts zu vermeiden (Griffing und Scholl, 1991). Deswegen wurden 2 *Enk(p1)35S::AtPIN1*-Linien (2 und 3) mit dem binären Vektor *pGTVKAN-DR5::GUS* durch Agrobakterien transformiert und deren Nachkommen auf Kanamycinresistenz selektiert und vermehrt (im folgenden *Enk(p1)35S::AtPIN1/DR5::GUS*). Als Kontrollen wurden Pflanzen transformiert, die für die *pin1*-Mutation heterozygot waren. Resistente *DR5::GUS*-Pflanzen mit einem Wildtyp-Erscheinungsbild wurden vermehrt. Zur Identifizierung von heterozygoten Linien wurde die Segregation in *pin1*- und Wildtyp-Phänotypen untersucht. Nicht-segregierende Populationen wurden als Wildtyp-Kontrollen verwendet (im folgenden *EnkDR5::GUS*). Segregierende Populationen wurden verwendet, um *DR5::GUS*-Pflanzen zu generieren, die für das *pin1-1*-Allel homozygot waren (im folgenden *pinDR5::GUS*). *GUS*-Analysen wurden auf Pflanzen der T2-Generation mit je 4 *Enk(p1)35S::AtPIN1/DR5::GUS*-Linien sowie 3 heterozygoten *pinDR5::GUS*- und 3 *EnkDR5::GUS*-Linien durchgeführt.

Qualitative Analyse der DR5::*GUS*-Expression

Der qualitative Nachweis der GUS-Aktivität erfolgte durch Umsetzen des Substrats X-Gluc zu dem blauen Indigo-Farbstoff. Die Sensitivität dieser enzymatischen Reaktion kann durch die Verlängerung der Inkubationszeit erhöht werden. Die GUS-Aktivität wurde in 5 bis 7 Tage alten Keimlingen nach 3 bzw. 7 h Inkubationszeit untersucht.

*Col35S::*AtPIN1/DR5-GUS**

Nach 3 Stunden Inkubationszeit konnte in *ColDR5::*GUS**-Kontrollen eine GUS-Aktivität im Ruhenden Zentrum, den Columella-Initialen und den jeweils 2 mittleren Zellen der drei Columella-Zellreihen detektiert werden. Im Vergleich dazu war bei 2 *Col35S::*AtPIN1/DR5::*GUS**-Linien (6_1 und 9_11) eine zusätzliche schwache Färbung in den äußeren Columella-Zellen sichtbar. Nach 7 Stunden Reaktionszeit war deutlich zu erkennen, daß die GUS-Färbung sich über alle Columella Zellen erstreckte, während in den *ColDR5::*GUS**-Kontrollen die detektierte *DR5*-Aktivität auf die beiden mittleren Zellen beschränkt blieb. Zudem ist das Signal in Columella-Initialen und in der ersten Columella-Zellreihe erhöht. Eine zusätzliche Färbung war außerdem in den angrenzenden Zellen festzustellen und erstreckte sich bis in die Wurzelhaube hinein (s. Abb. 16). Nach weiterer Verlängerung der Reaktionszeit konnte eine Färbung in der Wurzelhaube, allerdings nur auf einer Seite, detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Die schwach *AtPIN1*-überexprimierende Linie 7_1, wies keine Veränderungen auf (Daten nicht gezeigt).*

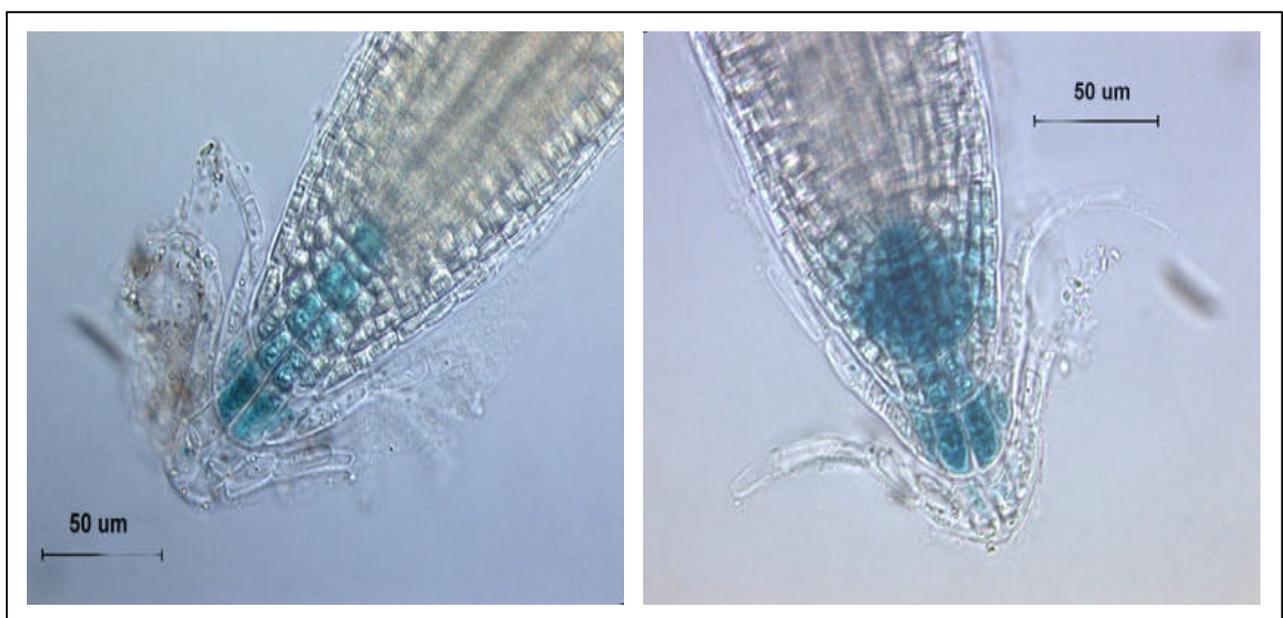


Abb. 16: X-Gluc gefärbte Wurzelspitzen verschiedener *DR5::*GUS**-Keimlinge. **Links:** *ColDR5::*GUS** **Rechts:** *Col35S::*AtPIN1/DR5::*GUS**-Linie 9_11. Die Keimlinge waren 5 d alt, die Inkubationszeit mit X-Gluc betrug 7 h.*

Enk(p1)35S::AtPIN1/DR5::GUS, pinDR5::GUS und EnkDR5::GUS

In Wurzelspitzen von *Enk(p1)35S::AtPIN1/DR5::GUS*-Keimlingen wurde im Vergleich zu *EnkDR5::GUS*-Pflanzen eine verstärkte GUS-Färbung festgestellt. Nach 7 Stunden Reaktionszeit wurde in *Enk(p1)35S::AtPIN1/DR5::GUS*-Keimlingen eine starke GUS-Aktivität in der Wurzelhaube detektiert, vergleichbar der in *Col35S::AtPIN1/DR5::GUS*-Keimlingen. Die Färbung war auch hier asymmetrisch verteilt, d. h. vornehmlich an einer Seite der Wurzel. Diese Färbung konnte bis in die Elongationszone der Wurzel detektiert werden.

Unterschiede in der GUS-Verteilung und -Intensität zwischen *EnkDR5::GUS*- und *pinDR5::GUS*-Keimlingen waren nicht feststellbar (s. Abb 17).

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß eine Ausschaltung der *AtPIN1*-Funktion nicht die korrekte Lokalisierung und Stärke des Auxinmaximums in *A. thaliana*-Wurzelspitzen beeinflusst. Dem gegenüber führt die Überexpression von *AtPIN1* zu einer Verbreiterung und Verstärkung des Auxinmaximums in Columella- und angrenzenden Zellen sowie zu einer verstärkten Auxinakkumulation in Zellen der Wurzelhaube.

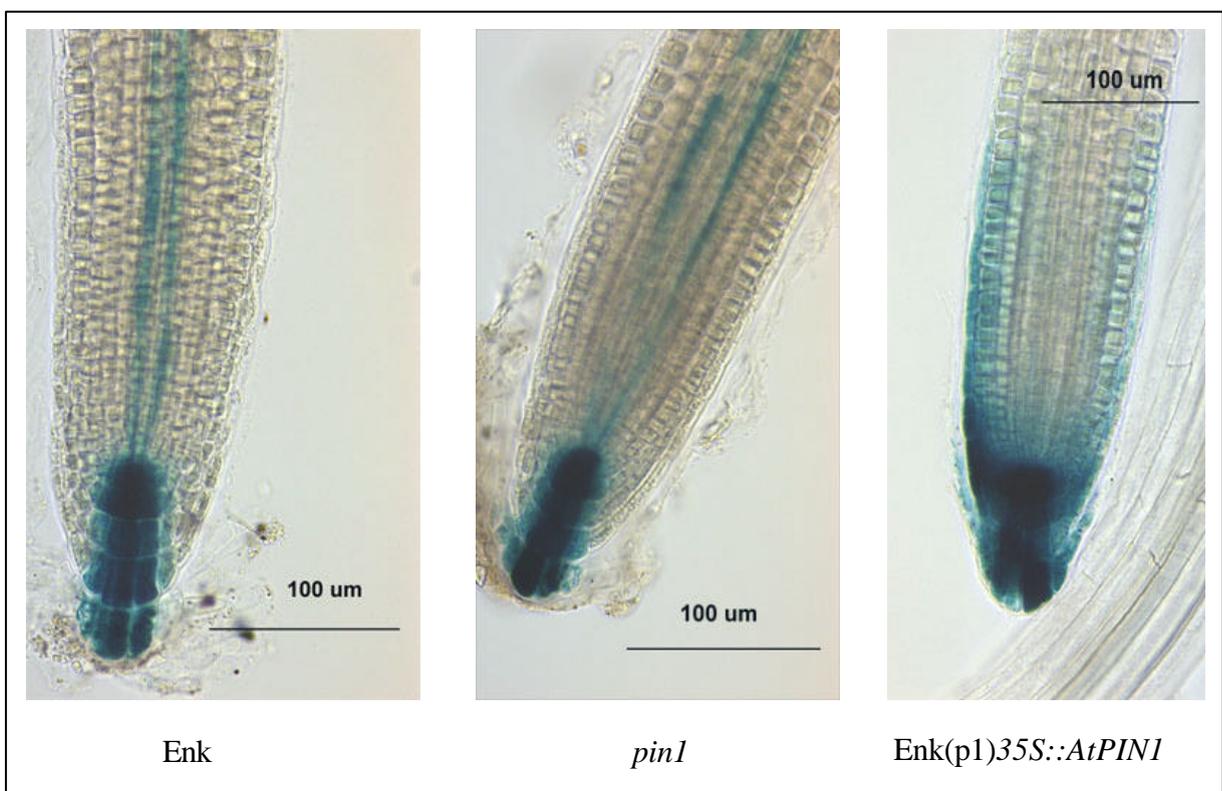


Abb. 17: X-Gluc gefärbte Wurzelspitzen verschiedener *DR5::GUS*-Keimlinge. **Links:** *EnkDR5::GUS* **Mitte:** *pinDR5::GUS* **Rechts:** *Enk(p1)35S::AtPIN1/DR5::GUS*. Die Keimlinge waren 5 d alt, die X-Gluc-Inkubationszeit betrug 7 h.

In vivo Untersuchung der Auxinverteilung in Wurzelspitzen von Col35S::AtPIN1-Pflanzen

In den durchgeführten GUS-Färbungen an AtPIN1-überexprimierenden Keimlingen konnte eine ungleich verteilte DR5-Aktivität in der Wurzelhaube beobachtet werden. Die Beteiligung von radial-asymmetrischen Auxingradienten am gravitropen Wurzelwachstum konnte bereits gezeigt werden (Sabatini *et al.*, 1999; Rashotte *et al.*, 2001; Ottenschläger, 2002). Da die GUS-Färbung in Lösung durchgeführt wird und somit die Information über die Orientierung zum Schwerkraftvektor verloren geht, ist die DR5-Aktivität in der Wurzelhaube von DR5::GUS-Pflanzen bezüglich der Wurzelkrümmung nicht zweifelsfrei zu bestimmen.

Deshalb wurden Col35S::AtPIN1- mit ColDR5::GFP-Pflanzen (Ottenschläger, 2002) gekreuzt. In diesen Pflanzen wird GFP (*green fluorescent protein*) anstatt GUS unter der Kontrolle des DR5-Promotorelements exprimiert. Mittels konfokaler Laserscanning-Mikroskopie ist die DR5-Aktivität als GFP-Fluoreszenz *in vivo* detektierbar.

Es wurden direkte Kreuzungsnachkommen (F1-Generation) analysiert. Die GFP-Fluoreszenz wurde in 5 d alten Keimlingen untersucht, die auf vertikal ausgerichteten Objektträgern, überschichtet mit Nährmedium, angezogen wurden. Kreuzungsnachkommen der stark AtPIN1-überexprimierenden Pflanzenlinien 6_1 und 9_11 zeigten ein gravitrop gestörtes Wurzelwachstum. In Zellen der Wurzelhaube konnte eine starke GFP-Fluoreszenz an der Krümmungsinenseite von Wurzelspitzen bis in die Zellstreckungszone detektiert werden, nicht jedoch an der Außenseite (s. Abb. 18). Die Kreuzungsnachkommen der schwach AtPIN1-überexprimierenden Linie 7_1 zeigten im Vergleich zum Wildtyp keine Veränderungen (Daten nicht gezeigt). Die GFP-Lokalisierung entspricht der gewebespezifischen GUS-Färbung (vgl. Abb. 17).

Diese Beobachtungen zeigen, daß AtPIN1-Überexpression zu einer asymmetrischen Auxinverteilung führt, wobei eine verstärkte DR5-Aktivität an der Krümmungsinenseite gezeigt werden konnte.

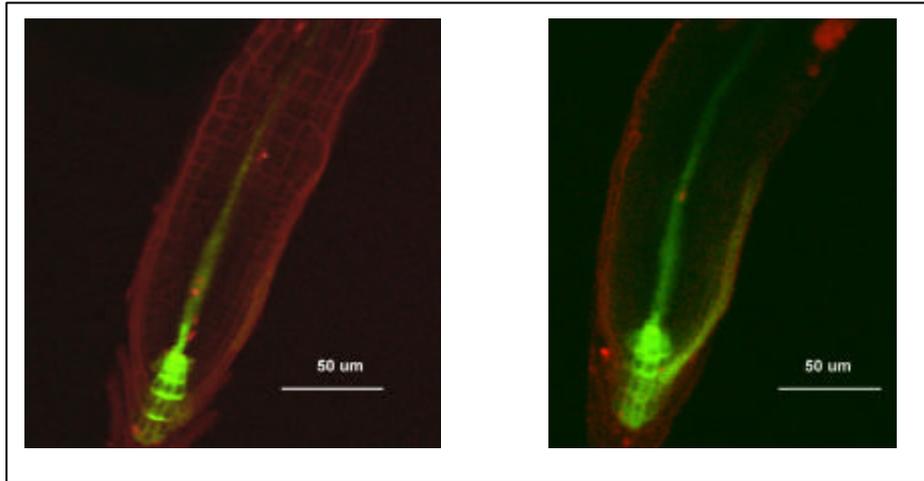


Abb. 18: GFP-Fluoreszenz in Wurzelspitzen von 5 d alten, vertikal gewachsenen *DR5::GFP*-Keimlingen. **Links:** *ColDR5::GFP*. **Rechts:** *Col35S::AtPIN1/DR5::GFP*. Die Aufnahmen wurden mittels konfokaler Laserscanning-Mikroskopie angefertigt. Das GFP-Signal erscheint grün. Der rötliche Hintergrund wurde durch Färbung der Zellwände mit Propidiumiodid erzeugt. Die Bilder wurden mit FITC bzw. TRITC Filtern aufgenommen und überlagert.

3.1.13 Untersuchung der Seitenwurzelentwicklung in der *pin1-1*-Mutante und in *Enk(p1)*- und *Col35S::AtPIN1*-Pflanzen

Die oben dargestellten Ergebnisse (3.1.12) zeigen eine erhöhte Auxinkonzentration in Wurzelspitzen von *Col35S::AtPIN1*- und *Enk(p1)35S::AtPIN1*-Keimlingen. Aus der Literatur ist bekannt, daß exogen zugegebenes Auxin die Seitenwurzelinduktion stimuliert (Muday und Hayworth, 1994) und Mutanten mit erhöhtem Auxinspiegel mehr Seitenwurzeln ausbilden (Barlier *et al.*, 2000). Dagegen führt die Inhibierung des polaren Auxintransports (PAT) durch NPA zu einer Reduktion der Seitenwurzelanzahl (Reed *et al.*, 1998; Casimiro *et al.*, 2001). Deshalb wurde die Anzahl der Seitenwurzeln in *AtPIN1*-überexprimierenden Keimlingen untersucht.

Es wurden 9 d alte, vertikal auf Nährmedium gewachsene Keimlinge analysiert. Dazu wurde die Seitenwurzeldichte bestimmt, d.h. die Gesamtzahl von Seitenwurzeln und Seitenwurzelprimordien (SWP) bezogen auf die jeweilige Wurzellänge. Diese Relation wurde verwendet, weil die Gesamtwurzellänge stark variieren kann, die Primordien aber in weitgehend konstanten Abständen voneinander initiiert werden.

Sowohl Columbia- und Enkheim-Wildtypkeimlinge, als auch *pin1-1*-Mutanten wiesen etwa 3,9 SWP je cm Wurzellänge auf (s. Abb. 19). Dies bedeutet, daß der Ausfall der *AtPIN1*-Funktion keinen Einfluß auf die Häufigkeit der Bildung von Seitenwurzeln hat.

Die schwach AtPIN1-überexprimierende Linie 7_1 zeigte keine Veränderungen (3,9 SWP/cm). Keimlinge der stärker AtPIN1-überexprimierenden Linien 9_11 (5,8 SWP/cm) und 6_1 (6,3 SWP/cm) zeigten eine, im Vergleich zum Wildtyp um 53% bzw. 67% erhöhte Seitenwurzeldichte. Ebenso zeigten die *Enk(p1)35S::AtPIN1*-Keimlinge der Linien 2 (6,1 SWP/cm) und 3 (5,5 SWP/cm) mit 54% bzw. 40% ebenfalls deutlich mehr SWP je cm Wurzellänge (s. Abb. 19).

Um festzustellen, ob ein veränderter polarer Auxintransport die erhöhte Seitenwurzeldichte bewirkt haben könnte, wurden 9 Tage alte Keimlinge, die auf Nährmedium mit 0,5 μ M NPA angezogen worden sind, untersucht. Bei dieser Konzentration des PAT-Inhibitors zeigten alle überexprimierenden Linien eine dem Wildtyp vergleichbare Seitenwurzeldichte (s. Abb. 19). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß eine AtPIN1-Überexpression in Wurzeln zu einem erhöhten polaren Auxintransport führt. Dies bedingt einen erhöhten Auxinspiegel, der wiederum eine verstärkte Induktion von Seitenwurzelpremordien nach sich zieht.

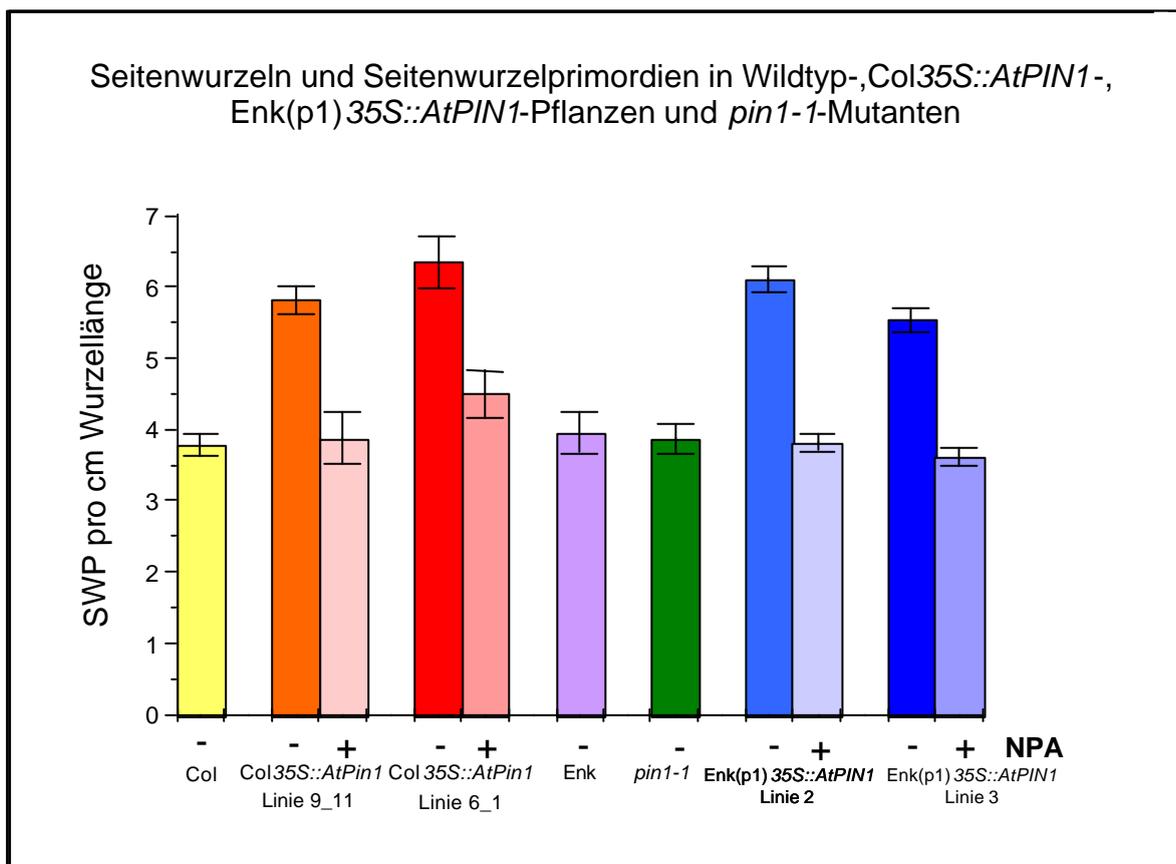


Abb. 19: Graphische Übersicht der Seitenwurzeldichte, d. h. Seitenwurzelpremordien und Seitenwurzeln pro cm Hauptwurzel von 9 Tage alten Keimlingen. Es wurden 11-13 Pflanzen je Linie ausgewertet. Unter den Meßbalken ist angegeben, ob dem Medium 0,5 μ M NPA zugesetzt wurde (+) oder nicht (-).

3.1.14 Untersuchung des polaren Auxintransports in Sproßachsen von *Enk(p1)35S::AtPIN1*-Pflanzen

pin1-Mutanten zeigen im Sproß einen deutlich reduzierten polaren Auxintransport (Okada *et al.*, 1991). Daher war die Frage zu klären, ob durch *AtPIN1*-Überexpression der PAT verändert wird.

Hierfür wurde der Auxintransport in Sproßachsen von *Enk(p1)35S::AtPIN1*-Pflanzen gemessen. Von 28 bis 44 Tage alten Pflanzen wurden 2,5 cm lange Stengelsegmente direkt über der Rosette abgeschnitten und in umgekehrter Orientierung, d. h. mit dem apikalen Ende des Segmentes in Lösungen mit Tritium-markiertem IAA getaucht. Dies entspricht der physiologischen Orientierung des PAT vom Apex zu Basis. Nach Versuchsende wurde die [³H]IAA-Akkumulation in den oberen (physiologisch betrachtet basalen) 5 mm des Stengelsegments mittels Szintillationsmessung ermittelt (s. 2.6.1). Zur Bestimmung der IAA-Diffusion wurden Stengelsegmente in physiologischer Orientierung, d. h. mit dem basalen Ende in der Lösung, untersucht. Durch Diffusion konnte nach 16stündiger Inkubation eine Aktivität von 12 cpm gemessen werden - ein Wert, der im Vergleich zu ca. 1100 cpm durch Transport bewirkt - vernachlässigbar gering ist.

Es konnte kein Unterschied zwischen den beiden *Enk(p1)35S::AtPIN1*-Linien und *Enk*heim Wildtyp in der Menge von polar transportiertem [³H]IAA festgestellt werden (s. Abb. 20). Gegenüber *pin1*-Mutanten haben *Enk(p1)35S::AtPIN1*- und *Enk*heim-Pflanzen einen etwa 2,5-fach erhöhten Auxintransport (s. Abb. 20). Damit konnte gezeigt werden, daß in den *Enk(p1)35S::AtPIN1*-Pflanzen der Auxintransportdefekt der *pin1-1*-Mutation vollständig komplementiert wurde. Dies korreliert gut mit dem Wildtyp-Erscheinungsbild der *Enk(p1)35S::AtPIN1*-Linien in den oberirdischen Geweben.

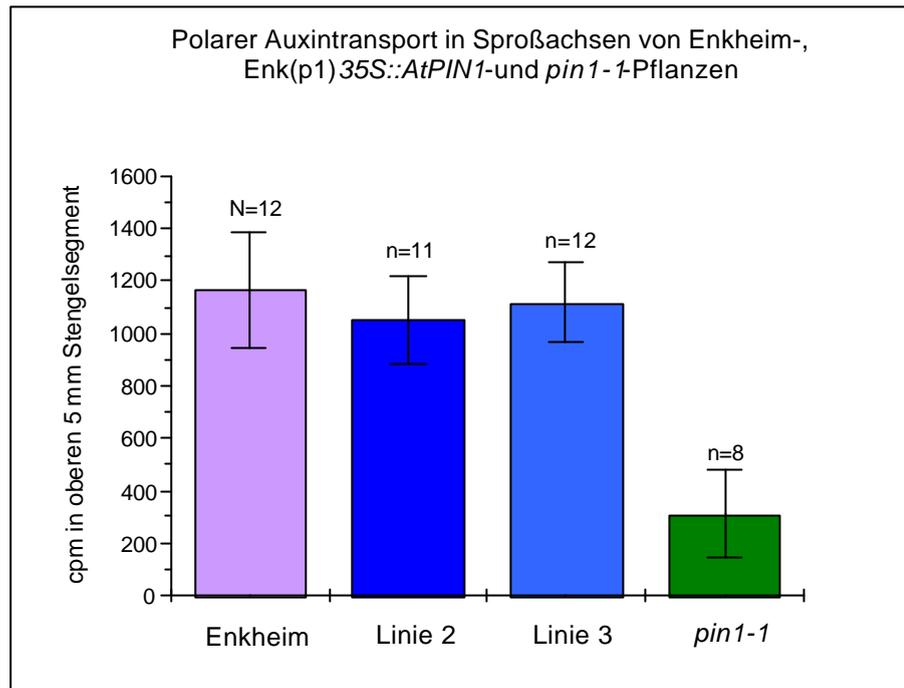


Abb. 20: Polarer Auxintransport in Stengelsegmenten von Enkheim-, Enk(p1)35S::AtPIN1- und *pin1-1*-Pflanzen. Die Versuchsdauer betrug 16 h. Neben 1,45 μM IAA enthielt die Lösung 7,6 nM [^3H]IAA. Dargestellt sind die Meßwerte von zwei unabhängigen Versuchen. Über den Balken ist die Anzahl der Stengel angegeben. Diffusionsanteil: $11,7 \pm 1,1$ cpm (n=4). Hintergrundstrahlung: $6,5 \pm 1,5$ cpm (n=3).

Der PAT in Sproßachsen erfolgt mit einer Geschwindigkeit von ca. 5 bis 20 mm pro h (Lomax *et al.*, 1995). Bei einer Versuchsdauer von 16 h ist damit Sättigung erreicht, und es kann nur die Akkumulation von transportiertem [^3H]IAA bestimmt werden. Geringe Geschwindigkeitsdifferenzen im PAT zwischen den Linien hätten somit nicht festgestellt werden können. Es zeigte sich jedoch, daß bereits nach 2 h eine Aktivität von ca. 40 cpm meßbar war, sowohl in Enk(p1)35S::AtPIN1- als auch in Enkheim-Stengelsegmenten. In *pin1-1*-Mutanten wurde dem gegenüber kein PAT festgestellt (Daten nicht gezeigt).

In einem nächsten Schritt wurde untersucht, ob die ectopische AtPIN1-Expression die Regulation des PAT beeinflusst. Hierfür wurde die Sensitivität des PAT gegenüber dem Transportinhibitor NPA in Sproßachsen von Enk(p1)35S::AtPIN1-Pflanzen gemessen.

Eine Konzentration von 5 μM NPA führte zu einer Reduzierung des PAT in beiden Enk(p1)35S::AtPIN1-Linien um 78% (Linie 3), bzw. 80% (Linie 2). Wildtyp-Pflanzen zeigten eine stärkere Inhibierung um 90%. Der PAT in Enk(p1)35S::AtPIN1-Stengelsegmenten war gegenüber einer Inhibierung bei dieser NPA-Konzentrationen also weniger sensitiv (s. Abb.

21). Eine weitere Erhöhung der NPA-Konzentration führt zu einer deutlichen Abnahme des PAT in allen untersuchten Pflanzenlinien. Bei einer Konzentration von 50 μM konnten vergleichbar niedrige [^3H]IAA-Aktivitäten in *Enk(p1)35S::AtPIN1*- und *Enkheim*-Stengelsegmenten gemessen werden (s. Abb. 21). In Sproßachsen von *pin1*-Mutanten führte bereits eine Konzentration von 5 μM NPA zu einer kompletten Inhibierung des PAT (Daten nicht gezeigt).

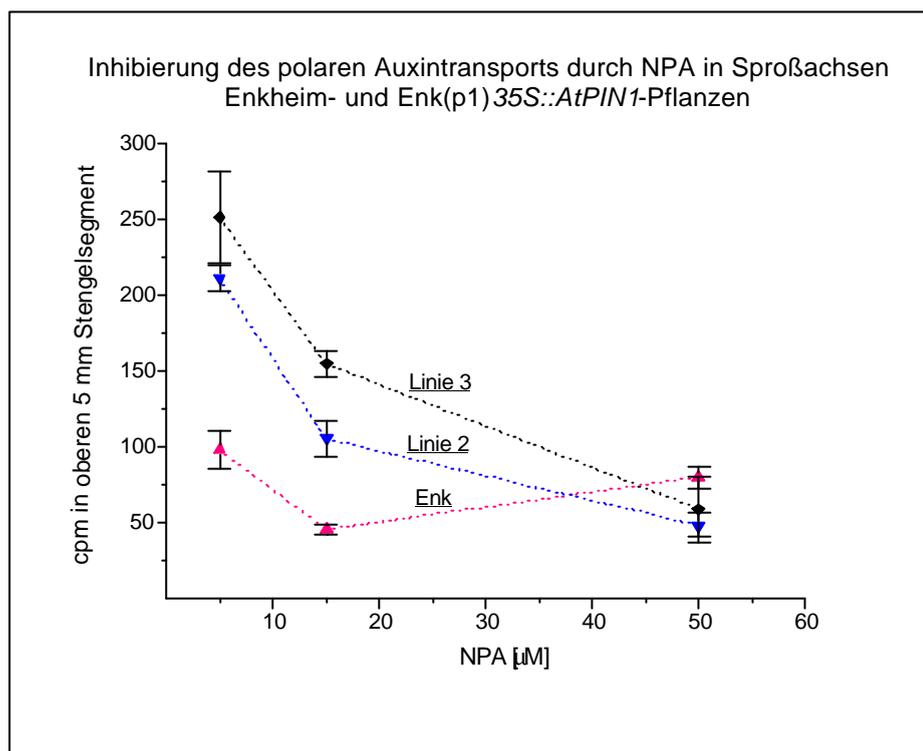


Abb. 21: Graphische Darstellung der Inhibierung des PAT durch NPA in Stengelsegmenten von *Enk(p1)35S::AtPIN1*- und *Enkheim*-Pflanzen. Aufgetragen ist die Aktivität von [^3H]IAA in Stengelsegmenten gegen die Konzentration von NPA. Ein Datenpunkt repräsentiert 6 bis 8 Stengelsegmente.

Col35S::AtPIN1-Pflanzen konnten nicht betrachtet werden, da in dem für die Untersuchung relevanten Alter in allen, stark *AtPIN1*-überexprimierenden Linien *pin1*-artige, phänotypische Veränderungen, die auf Kosuppression hindeuten, auftraten.

Zusammenfassend ist festzustellen, daß NPA den PAT in einer konzentrationsabhängigen Weise reduziert. Die *AtPIN1*-Überexpression führt zu einer verringerten Sensitivität des PAT gegenüber dem Inhibitor NPA.

3.1.15 Lokalisierung von AtPIN1 in Sproßachsen von *Enk(p1)35S::AtPIN1*-Pflanzen

Da eine veränderte Regulation des PAT in AtPIN1-überexprimierenden Pflanzen festgestellt werden konnte (s. 3.1.14), wurde die Expression und Lokalisierung von AtPIN1 in Sproßachsen untersucht.

Die Stengelsegmente wurden zunächst von den für die PAT-Messungen verwendeten Pflanzen isoliert und fixiert. Anschließend wurden 8 bis 12 μm starke Längsschnitte angefertigt und mit einem polyklonalen anti-AtPIN1-Antikörper (s. 2.4.1) inkubiert. In Präparaten von Enkheim-Wildtyp-Pflanzen wurden ausschließlich Signale am basalen Ende von Xylem-Parenchym-Zellen und Zellen des Cambiums detektiert (s. Abb. 22). In *Enk(p1)35S::AtPIN1*-Pflanzen wurden zusätzliche AtPIN1-spezifische Signale in allen untersuchten Zellen detektiert, wobei AtPIN1 stets am basalen Ende der Zellen lokalisierte (s. Abb. 23).

Damit konnte nachgewiesen werden, daß die ectopische Expression von AtPIN1 in Sproßachsen und die Änderungen des PAT in *Enk(p1)35S::AtPIN1*-Pflanzen (s. 3.1.14) korrelieren. Darüber hinaus ist AtPIN1 sowohl in Wurzelspitzen (s. 3.1.11) als auch in Sproßachsen am unteren Zellende lokalisiert, auch in den Zellen, in denen kein endogenes Protein exprimiert wird. Daher liegt die Vermutung nahe, daß die AtPIN1-Lokalisierung unabhängig vom Zelltyp ist und durch Protein intrinsische Faktoren bestimmt wird.

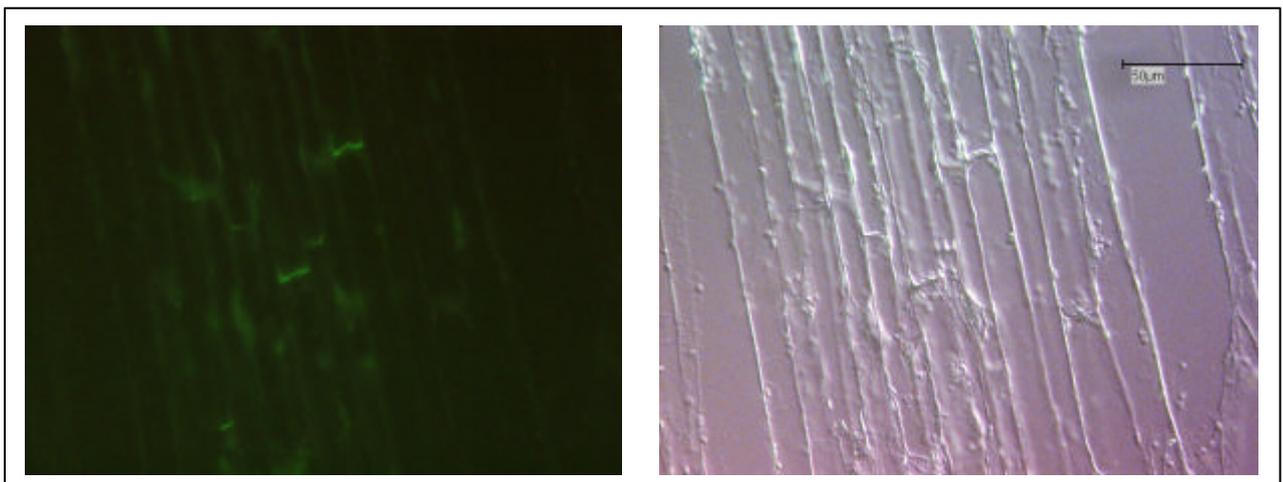


Abb. 22: Lokalisierung von AtPIN1 in Sproßachsen von *A. thaliana* Ökotyp-Enkheim durch mikroskopische Aufnahmen immunocytochemisch markierter Stengellängsschnitte. Verwendet wurde ein polyklonaler, affinitätsgereinigter anti-AtPIN1-Antikörper. Zur Detektion wurde ein Alexa488-markierter-Sekundärantikörper eingesetzt. Links: Fluoreszenzaufnahme. Rechts: Hellfeldaufnahme.

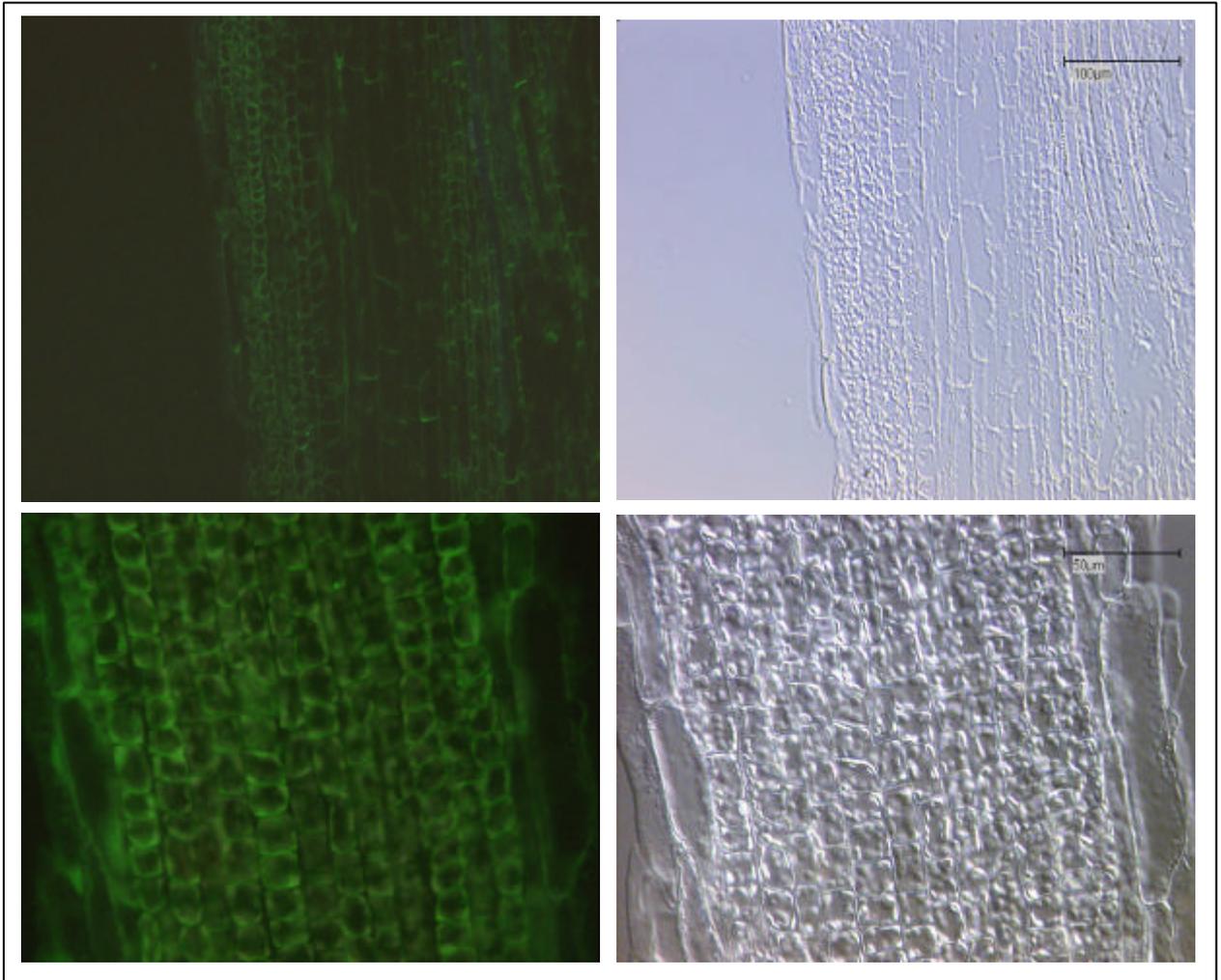


Abb. 23: Lokalisierung von AtPIN1 in *A. thaliana* Enk(p1)35S::AtPIN1-Sproßachsen. Mikroskopische Aufnahmen immunocytochemisch markierter Stengelängsschnitte. **Oben:** Schnitt durch die Mitte. **Unten:** Schnitt in Höhe der Rinde: Zu sehen sind vornehmlich Rindenzellen. Jeweils rechts sind die entsprechenden Hellfeldaufnahmen abgebildet.

3.1.16 Phänotypische Analyse von etiolierten Keimlingen

Die Flavonoid-Biosynthese wird durch Lichteinwirkung aktiviert; Flavonoide können, wie auch NPA, den PAT inhibieren (Jacobs und Rubbery, 1988). Die Wirkung dieser möglicherweise veränderten Regulation des Auxintransports wurde in *AtPIN1*-überexprimierenden, etiolierten Keimlingen untersucht.

Unter Lichtausschluß angezogene, 5 d alte Keimlinge der *Col35S::AtPIN1*-Linien (9_11 und 6_1) zeigten schraubenförmig gewachsene Hypokotyle, wobei die Basis im Vergleich zum Apex stärker gewunden war (s. Abb. 24). Im Vergleich zu Columbia- und Enkheim-Kontrollkeimlingen wurden bei Keimlingen der *Enk(p1)35S::AtPIN1*-Linien (2 und 3) geringere und in Keimlingen der schwach *AtPIN1*-überexprimierenden Linie 7_1 keine phänotypischen Änderungen beobachtet (s. Abb. 24).



Abb. 24: Keimungsphänotypen etioliert angezogener *Col35S::AtPIN1*-Pflanzen. Die Keimlinge wuchsen 5 Tage vertikal auf ARA-Festmedium. **Links:** *Col35S::AtPIN1*-Linie 6_1. **Mitte:** *Col35S::AtPIN1*-Linie 9_11 / Columbia-Wildtyp. **Rechts:** Columbia-Columbia-Wildtyp.

Etiolierte, 3 Tage alte Keimlinge wurden durch Rotation um 90° gravistimuliert und die Krümmung der Hypokotyle nach einem weiteren Tag gemessen. Es konnten keine signifikanten Abweichungen der *AtPIN1*-überexprimierenden Pflanzenlinien von den Wildtyp-Kontrollen festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Dies könnte auf einen Unterschied in der Graviperzeption zwischen Hypokotyl und Wurzel hindeuten, da die Wurzeln von *AtPIN1*-überexprimierenden Pflanzen - im Gegensatz zu den Hypokotylen - einen deutlich agravitropen Wuchs zeigen.

3.2 Induzierbare AtPIN1-Expression im homologen System

Die Analyse von pflanzlichen Proteinen im homologen System mittels konstitutiver Überexpression erweist sich mitunter als problematisch, da das eingeführte Gen über den gesamten Lebenszyklus der Pflanze aktiv ist. Demgegenüber bietet ein induzierbares System den Vorteil, die Expression des Transgens auf bestimmte Zeitpunkte oder auch Organe zu beschränken, so daß phänotypische Änderungen im Vergleich zu nicht-induzierten Pflanzen spezifischer untersucht werden können.

Es wurde ein durch Glucocorticoide induzierbares Expressionssystem verwendet (Aoyama und Chua, 1997). Es besteht aus dem chimären, konstitutiv exprimiertem Aktivatorgen GVG; das eine Fusion aus der Hormon-Bindungsdomäne (HBD) des Glucocorticoidrezeptors der Ratte, dem Transkriptionsfaktor GAL4 aus Hefe sowie dem Transaktivator VP16 aus *Herpes simplex* darstellt. Das zu exprimierende Gen steht unter der Kontrolle der GAL4-Bindungsdomäne, fusioniert an den *CaMV35S*-Minimalpromotor. Im inaktiven Zustand liegt GVG im Cytoplasma vor. Die Bindung der Chaperone HSP90 und HSP70 an die HBD verhindert die komplette Faltung des Proteins. Bei Glucocorticoid-Bindung (hier verwendet: Dexamethason) dissoziieren HSP90/70 vom Komplex während GVG durch die nukleäre Erkennungssequenz der HBD in den Zellkern transloziert wird, wo es an die GAL4-Bindungsdomäne bindet und die Transkription des Gens initiiert.

3.2.1 Herstellung des *pTA::AtPIN1*-Konstrukts

Die *AtPIN1*-cDNA wurde aus dem Plasmid pBlueskript II SK(-) durch EcoRI/KpnI-Verdau isoliert und in den Vektor pUC120 ligiert. Dieses Konstrukt wurde zunächst EcoRI und anschließend – nach Auffüllen der überhängenden Enden durch T4-DNA-Polymerase - mit XbaI verdaut. Der binäre Pflanzenvektor pTA7002 (Aoyama und Chua, 1997) wurde mit XhoI verdaut, die überhängenden Enden wurden durch T4-DNA-Polymerase aufgefüllt, SpeI geschnitten und mit dem *AtPIN1*-Fragment ligiert. Mit diesem pTA7002-*AtPIN1*-Konstrukt wurden Agrobakterien transformiert und selektiert.

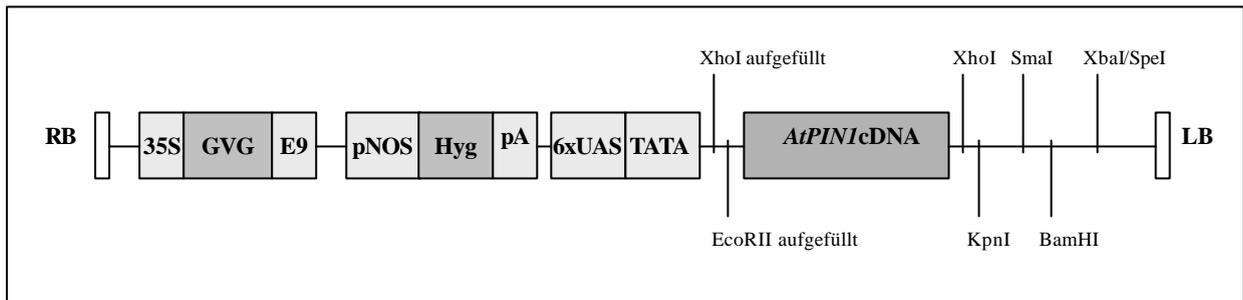


Abb. 25: Schematische Darstellung des pTA7002-*AtPINI*-Konstrukts. Eingezeichnet sind neben dem chimären Aktivatorgen (GVG), das Hygromycinphosphotransferase-Gen (Hyg) und der 6-fachen GAL4-Bindungsdomäne (6xUAS) fusioniert mit dem *CaMV35S*-Minimalpromotor (TATA), die nach Integration ins pflanzliche Genom flankierenden Bereiche RB (*right border*) und LB (*left border*).

3.2.2 Transformation und Selektion von ColpTA::*AtPINI*-Pflanzen

A. thaliana-Pflanzen des Ökotyps Columbia wurden mit dem Vektorkonstrukt pTA7002-*AtPINI* durch Agrobakterien transformiert und zur Samenreife gebracht. 17 Keimlinge der T1-Generation wurden auf Hygromycin-Resistenz selektiert und zur Samenreife gebracht (im weiteren als ColpTA::*AtPINI* bezeichnet).

Da durch unterschiedliche Insertionsorte der T-DNA die *AtPINI*-cDNA verschieden stark exprimiert wird, wurde auf eine starke phänotypische Änderung durch Dexamethason-Induktion selektiert. Hierzu wurden die Samen der T2-Generation auf Medium mit und ohne 1 μ M Dexamethason ausgelegt. Bei den Linien 1, 8 und 17 konnten deutliche Unterschiede zwischen induzierter und nicht-induzierter *AtPINI*-Expression beobachtet werden: Es trat eine verzögerte Keimung auf, die Pflanzen blieben kleiner, blichen aus und zeigten hohe Lethalität (s. auch 3.2.4). Kontroll-Keimlinge, die auf Medium ohne Dexamethason angezogen wurden, zeigten keine Veränderungen und Wildtyp-Keimlinge waren in ihrem Habitus durch Dexamethason nicht beeinträchtigt. Somit scheinen die beobachteten Defekte auf einer induzierten Expression zu beruhen und nicht auf toxischen Dexamethason-Wirkungen oder durch einen Gen-*knock out*.

Zur Isolierung homozygoter Pflanzen wurden die 3 Linien auf Hygromycin-Resistenz untersucht: Die Linien 1 und 8 segregierten annähernd im Verhältnis 3:1, und Linie 17 segregierte 14:1, was auf mehr als eine unabhängig segregierende T-DNA Insertion schließen läßt. Jeweils 12 resistente T2-Pflanzen pro Linie wurden vermehrt und deren Nachkommen (T3-Generation) erneut auf Hygromycin-Resistenz untersucht. Die Nachkommen der Linien 1 und 8 segregierten entweder im Verhältnis 3:1 oder waren vollständig resistent, während die Nachkommen der Linie 17 in einem höheren Verhältnis segregierten. Für die weiteren

Analysen wurden die homozygoten Nachkommen der Linien 1 und 8 sowie die Hygromycin-resistenten Nachkommen der Linie 17 verwendet.

3.2.3 Western-Blot-Analysen

Zur Untersuchung der induzierbaren AtPIN1-Überexpression wurden Blätter von 8 Wochen alten Pflanzen für 24 h in flüssigem ARA-Medium mit bzw. ohne 1 μ M Dexamethason inkubiert. Als weitere Kontrolle wurden frisch geerntete Blätter von Wildtyp-Pflanzen verwendet. Die mikrosomale Proteinfraction wurde mittels Western-Blot-Analysen untersucht. In allen 3 Linien sind bei Dexamethason-Behandlung deutliche, AtPIN1-spezifische Signale zu detektieren. Neben der Hauptbande bei einem apparenten Molekulargewicht von ca. 66 kDa konnte ein weiteres Signal bei ca. 45 kDa detektiert werden, das wahrscheinlich ein Abbauprodukt von AtPIN1 darstellt. Es können keine Unterschiede in der induzierten AtPIN1-Menge festgestellt werden. In mikrosomalen Fraktionen nicht-induzierter Blätter, sowie bei Blättern von Wildtyp-Pflanzen, konnte auch nach verlängerter Expositionszeit des Blots keine AtPIN1-Expression nachgewiesen werden (s. Abb. 26).

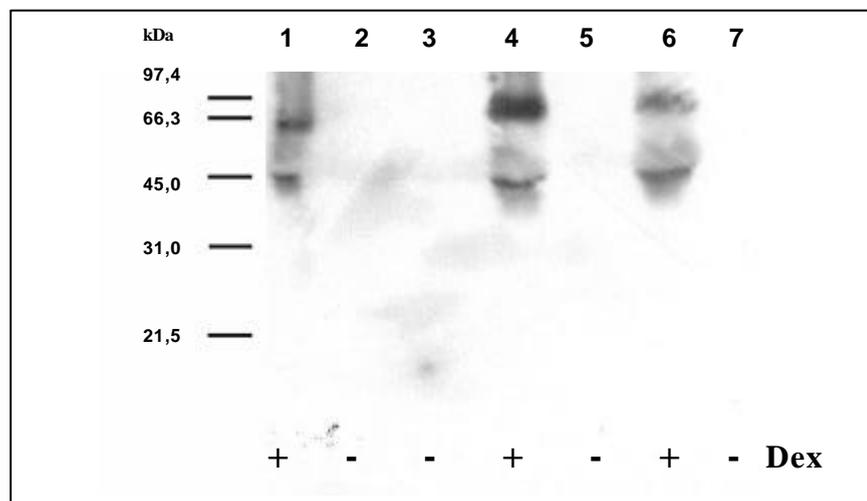


Abb. 26: Western-Blot-Analyse der durch Dexamethason induzierbaren AtPIN1-Expression in Blättern von ColpTA::AtPIN1-Pflanzen der T3-Generation. Jeweils 60 μ g mikrosomaler Proteine wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und auf PVDF-Membran transferiert. Es wurde polyklonaler affinitätsgereinigter anti-AtPIN1-Antikörper verwendet. Die Detektion erfolgte durch Chemilumineszenz durch Peroxidase-gekoppelte, sekundäre Antikörper. In den Spuren wurde aufgetragen: Linie 17 induziert (1), nicht-induziert (2). Linie 1 nicht-induziert (3), induziert (4); Linie 8 nicht-induziert (5) und induziert (6); Columbia-Wildtyp nicht-induziert (7).

3.2.4 Phänotypische Charakterisierung

Zur Analyse der phänotypischen Änderungen wurden Samen der Pflanzenlinien 1, 8 und 17 (T3-Generation) auf Medium mit verschiedenen Dexamethason-Konzentrationen (0,1 μM und 1,0 μM) ausgelegt. Nach 10 d zeigten sich deutliche Störungen des Pflanzenhabitus in den Dexamethason-behandelten Linien, wobei die Dexamethason-Konzentration keinen Einfluß auf die Ausprägung der phänotypischen Änderungen hatte (nicht gezeigt). Bei Pflanzen der Linien 8 und 17 waren Hypokotyl und Wurzel deutlich verkürzt. Nach 10 d waren die Keimblätter ausgebildet, während nicht-Dexamethason-behandelten Keimlingen bereits 4 bis 6 Rosettenblätter zeigten (s. Abb. 27). Bei Keimlingen der Linie 1 waren die Defekte stärker ausgeprägt: Dexamethason-behandelte Keimlinge waren im Vergleich zu denen der Linien 8 und 17 kleiner und die Keimblätter nicht geöffnet (s. Abb. 27). Nach 5 d waren bereits einige Keimlinge abgestorben.

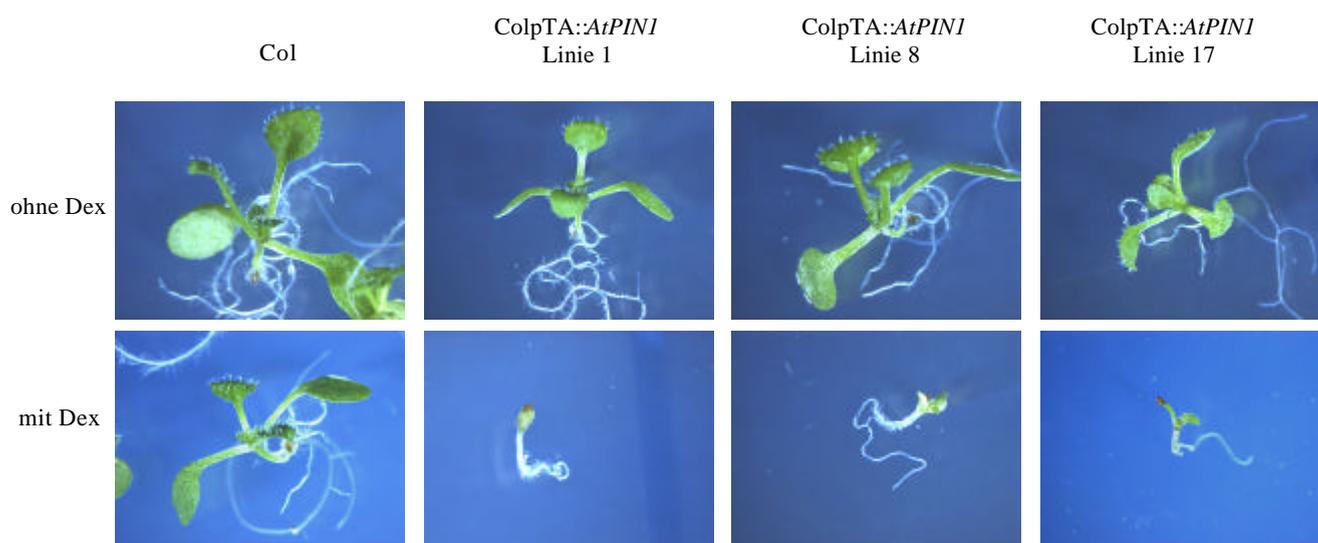


Abb. 27: Phänotyp-Analyse von Keimlingen der ColpTA::AtPIN1-Pflanzen durch Dexamethason-induzierte AtPIN1-Expression. Keimlinge wurden auf Medium ohne bzw. mit Dexamethasone (Dex) 10 d angezogen.

Da die Anzucht auf Dexamethason-haltigem Medium zu keimlingslethalen Phänotypen führte, wurde die induzierte AtPIN1-Überexpression in älteren Pflanzen untersucht. Auf 25 d alte Pflanzen wurde alle 3 bis 4 d ein 30 μM Dexamethason-haltiges Aerosol appliziert. Kontrollpflanzen wurden mit der entsprechenden Lösung ohne Dexamethasone behandelt. Nach 3 Wochen waren erste Veränderungen zu erkennen: Die Dexamethason-behandelten Pflanzen waren etwas blasser, zeigten aufwärtsgerichtete Blattspitzen und löffelförmig eingebogene (hyponastische) Hochblätter und Rosettenblätter (s. Abb. 28 D). Dieser Phänotyp verstärkte sich bei längerer Versuchsdauer. Nach weiteren 3 Wochen waren in Linie 1 die

Hochblätter trichterförmig eingerollt (s. Abb. 28 C), während bei Pflanzen der Linien 8 und 17 eine stärkere Hyponastie beobachtet werden konnte. Insgesamt zeigten die Linien 8 (s. Abb. 28 A) und 17 leicht, und Linie 1 deutlich geringeren Wuchs als die Kontrollpflanzen (nicht gezeigt).

Die AtPIN1-Überexpression könnte den dorsiventralen Auxintransport oder die Auxinhomöostase verändert haben, so daß mehr Auxin an den Blätterunterseiten akkumuliert wird und es dadurch zu unterschiedlich starker Zellstreckung an der Blattober- und Blattunterseite kommt.

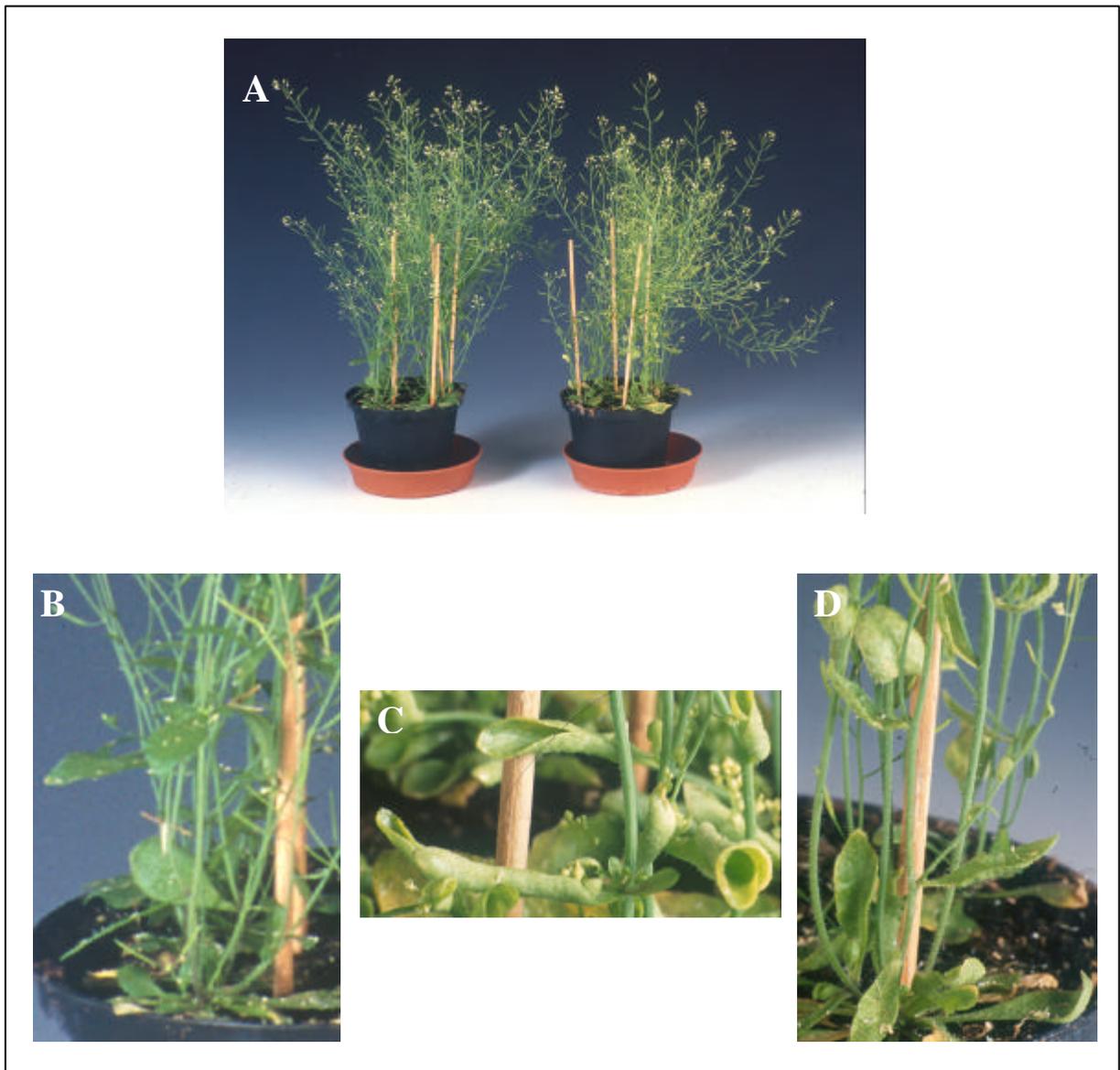


Abb. 28: Phänotyp-Analyse von im Gewächshaus angezogenen 8 Wochen alten *ColpTA::AtPIN1*-Pflanzen, die mit Dexamethason-haltiger Lösung besprüht worden sind. Pflanzen der Linie 8 ohne Dexamethasone (links) und mit Dexamethason (rechts) behandelt (A). Vergrößerter Ausschnitt von (A) von Hochblättern und Rosettenblättern von unbehandelten Pflanzen der Linie 8 (B). Vergrößerter Ausschnitt von (A) von Hochblättern und Rosettenblättern von Dexamethason-behandelten Pflanzen der Linie 8 (D). Hochblätter von Dexamethason-behandelten Pflanzen der Linie 1 (C).

3.3 Auxintransportstudien in heterologen Expressionssystemen

Zur Charakterisierung der mutmaßlichen Auxinefflux-Carrier Funktion wurde AtPIN1 in heterologen Systemen exprimiert.

- 1) *S. cerevisiae* (Hefe) wurde mit *AtPIN1*-cDNA transformiert und das exprimierte Protein mittels Western-Blot Analyse in der mikrosomalen Proteinfractionen nachgewiesen (Daten nicht gezeigt). Immunocytochemische Untersuchungen zeigten eine Plasmamembran-Lokalisierung des Proteins (J. Friml, persönliche Mitteilung). Mittels Diffusion wurden die Hefezellen mit [³H]IAA beladen, gewaschen und in frisches Medium überführt. Die Retention von IAA in Hefezellen wurde über einen Zeitraum von 40 min gemessen: AtPIN1-exprimierende Hefezellen gaben IAA genauso schnell ab wie untransformierte Zellen (s. Abb. 29 unten).
- 2) Außerdem wurde der IAA-Transport in *Xenopus* Oozyten untersucht. *AtPIN1*-cRNA wurde in Oozyten injiziert und nach 2 bis 4 Tagen konnte AtPIN1 in der mikrosomalen Proteinfraction durch Westernblot-Analyse nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Die Plasmamembran-Lokalisierung wurde auf Semi-Dünnschnitten von Oozyten durch AtPIN1-Antikörperfärbung gezeigt (s. Abb. 29 B). Die Oozyten wurden durch Mikroinjektion mit [³H]IAA beladen und die zeitliche Zunahme der Radioaktivität im umgebenden Medium gemessen. Es konnten keine Unterschiede zwischen AtPIN1-exprimierenden Zellen und den Kontrollen festgestellt werden (s. Abb. 29). Kompetitionsversuche mit überschüssigem unmarkiertem IAA und Messungen bei verschiedenen pH-Werten ergaben keinen Hinweis, daß AtPIN1 eine Transportfunktion für Auxin besitzt (Daten nicht gezeigt).

Möglicherweise fehlen in *S. cerevisiae* und *Xenopus* Oozyten spezifische Proteine, die als Kofaktoren für den funktionellen Auxinefflux-Carrier-Komplex notwendig sind. Deswegen wurden weitere Auxintransport-Untersuchungen in *A. thaliana*-Suspensionskulturen durchgeführt.

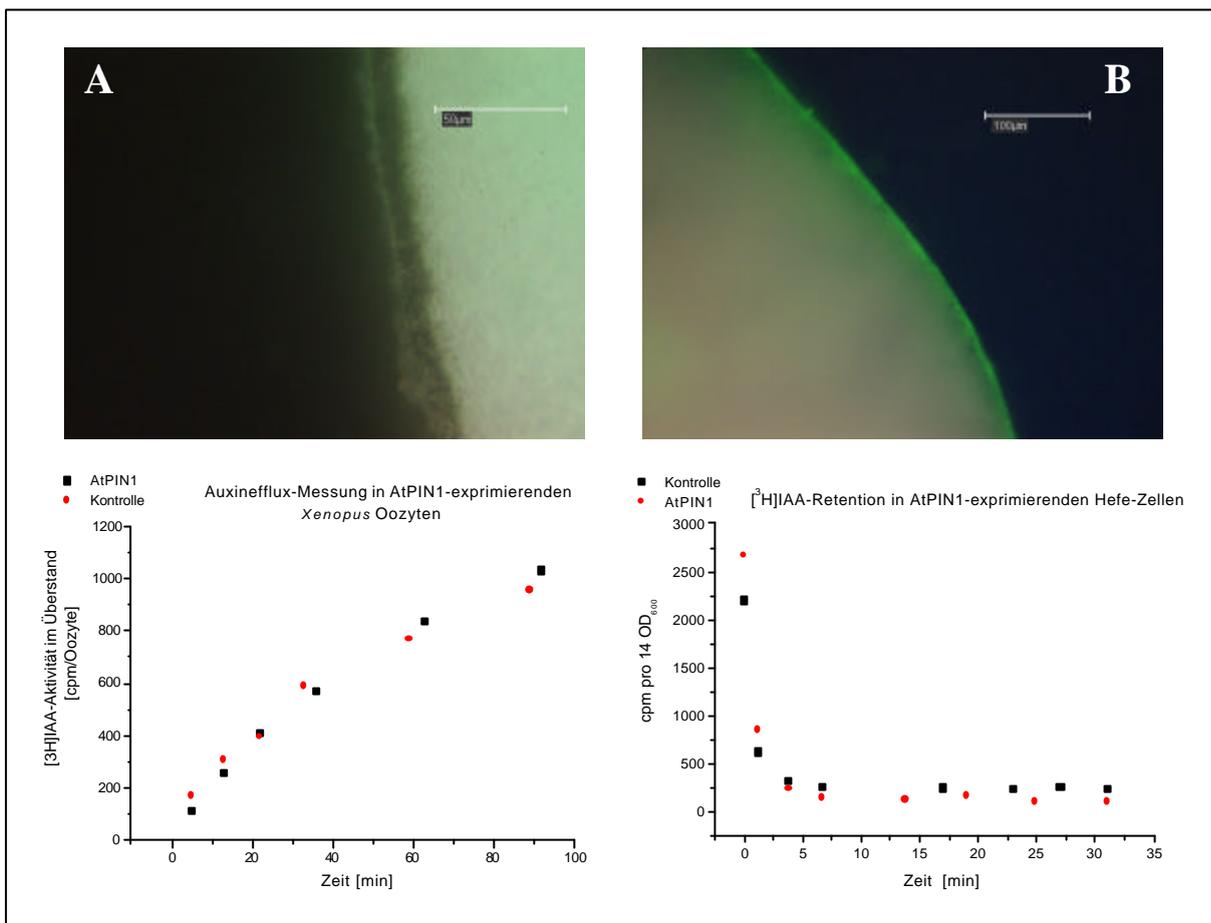


Abb. 29: Oben: Immunfluoreszenzmarkierung von AtPIN1 in 100 μm starken Semi-Dünnschnitten von Oozyten. **(A)** Unbehandelte Oozyte. **(B)** Oozyte 4 d nach Injektion von *AtPIN1*-cRNA. Die AtPIN1-Detektion erfolgte mit polyklonalem affinitätsgereinigtem anti-AtPIN1-Antikörper und FITC-gekoppeltem Sekundärantikörper durch Fluoreszenzmikroskopie.

Unten: Auxinefflux-Messungen in heterologen Expressionssystemen. **Links:** Messung des Auxinefflux von [³H]IAA beladenen, AtPIN1-exprimierenden Oozyten. Aufgetragen ist die [³H]IAA-Aktivität pro Oozyte im umgebenden Medium gegen die Zeit. **Rechts:** Messung der [³H]IAA-Retention in AtPIN1-exprimierenden Hefe-Zellen. Dargestellt ist die [³H]IAA-Aktivität von 14 OD₆₀₀-Einheiten gegen die Zeit.

3.4 Auxintransport in *A. thaliana*-Suspensionskulturen

Im Vergleich zu Pflanzen bieten Suspensionskulturen für Auxintransport-Messungen einige Vorteile:

- Das im Medium enthaltene Auxin 2,4-D bewirkt eine fortlaufende Zellteilung und verhindert die Zelldifferenzierung. Somit ist das Material sehr homogen und entwicklungspezifische Veränderungen des polaren Auxintransports sind unerheblich.
- Die Zellen liegen in Mikrokalli vor. Dadurch ist die Gesamtoberfläche, die in Kontakt mit Auxin und Effektoren treten kann, größer als z.B. bei Stengelstücken, wodurch die Versuchszeiten verkürzt werden können. Damit lassen sich Effekte minimieren, die durch hohe Auxin- bzw. Effekorkonzentrationen bei längeren Versuchszeiten auftreten können, wie z.B. die Bildung von Auxin-Konjugaten oder Störung des Vesikeltransports durch NPA.

In Tabak-Suspensionskulturen wurde der Auxintransport bereits untersucht (Delbarre *et al.*, 1996/1998). Dort sind aber mögliche molekulare Komponenten des Auxintransportsystems noch nicht identifiziert worden. In *A. thaliana* wird AUX1 als Influx-Carrier (Bennett *et al.*, 1996) diskutiert. Weitere mögliche Komponenten sind u.a. BIG/TIR3 und RCN1 (Gil *et al.*, 2001; Gabers *et al.*, 1996; Rashotte *et al.*, 2001). Für die funktionelle Charakterisierung dieser Proteine ist längerfristig ein homologes Auxintransport-Untersuchungssystem notwendig.

Es sollte untersucht werden, ob

- 1.) *A. thaliana*-Suspensionskulturen Auxintransport-Aktivität besitzen
- 2.) Überexpression von AtPIN1 in Suspensionkulturen den Auxinefflux verändert.

3.4.1 Etablierung von ColpTA::AtPIN1-Suspensionskulturen

Von den 3 als induzierbar charakterisierten ColpTA::AtPIN1-Linien 1, 8 und 17 (s. 3.2.2) wurden Suspensionskulturen angelegt (s. 2.8.1). Die induzierbare AtPIN1-Expression wurde durch Western-Blot-Analyse überprüft: 4 Tage nach Umsetzen der Suspensionskulturen wurde mit 1 μ M Dexamethason für 24 h inkubiert und die Gesamtproteinextrakte isoliert.

Der Proteinextrakt der Linie 1 zeigte im Vergleich zur nicht-induzierten Kontrolle eine starke Expression, während in den Linien 8 und 17 keine induzierbare AtPIN1-Expression

festgestellt werden konnte (Daten nicht gezeigt). Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu den Experimenten an den ursprünglichen Pflanzenlinien, in denen eine induzierbare AtPIN1-Überexpression nachgewiesen werden konnte (vgl. Abb. 26). Vermutlich kam es hier zu einem Gen-*silencing* des pTA::AtPIN1-Konstrukts. Im weiteren wurde mit der Suspensionskultur der Linie 1 gearbeitet. In Western-Blot-Analysen wurde für diese Linie 1 eine über mehrere Monate konstante, induzierbare AtPIN1-Überexpression nachgewiesen (Daten nicht gezeigt, vgl. Abb. 31).

3.4.2 Bestimmung der Wachstumscharakteristik und der Induktionskinetik

Zur Bestimmung der Wachstumscharakteristik der Suspensionskulturen wurde, um den optimalen Zeitraum für physiologische Experimente zu ermitteln, nach der Subkultivierung alle zwei Tage 2 ml der Zellsuspension abgenommen und das Frischgewicht bestimmt.

Die Zellmasse nimmt über einen Zeitraum von ca. 11 d um das 3-fache zu, wonach die Zellkultur eine stationäre Phase erreicht (s. Abb. 30). Für die nachfolgenden Experimente wurden Zellkulturen 6 bis 8 d nach Subkultivierung verwendet.

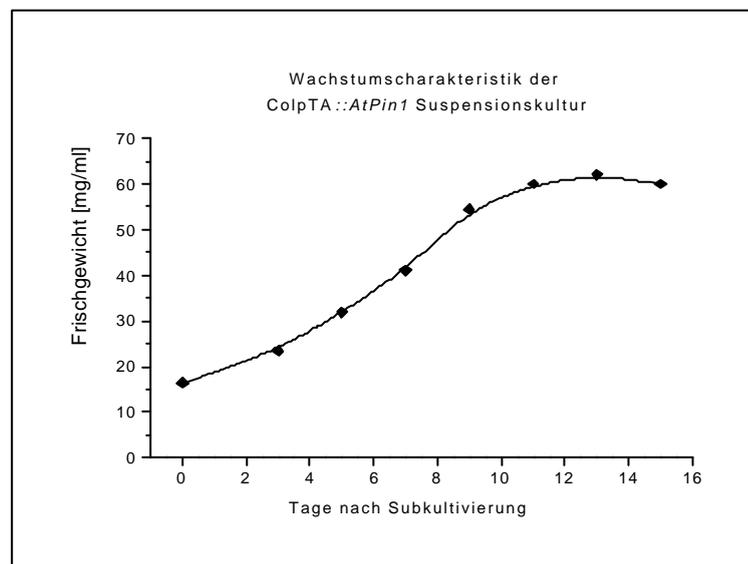


Abb. 30: Graphische Darstellung des Zellwachstums der *A. thaliana*-Suspensionskultur ColpTA::AtPin1-Linie1. Dargestellt ist die Auftragung des Frischgewichtes pro Volumen der Zellsuspension gegen die Zeit.

Die Induktionskinetik der AtPIN1-Überexpression wurde 8 Tage nach der Subkultivierung bestimmt: 3, 8 und 24 h nach Dexamethason-Zugabe wurden jeweils 8 ml der Zellsuspension entnommen und die Gesamtproteinextrakte isoliert. Die Expression wurde mittels Western-Blot analysiert. Nach etwa 8 Stunden konnte eine Erhöhung des AtPIN1-Gehaltes detektiert werden, der bei einer Inkubationszeit von 24 Stunden stark zunahm (s. Abb. 31). Ein weiterer Anstieg bei längeren Inkubationszeiten konnte nicht beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

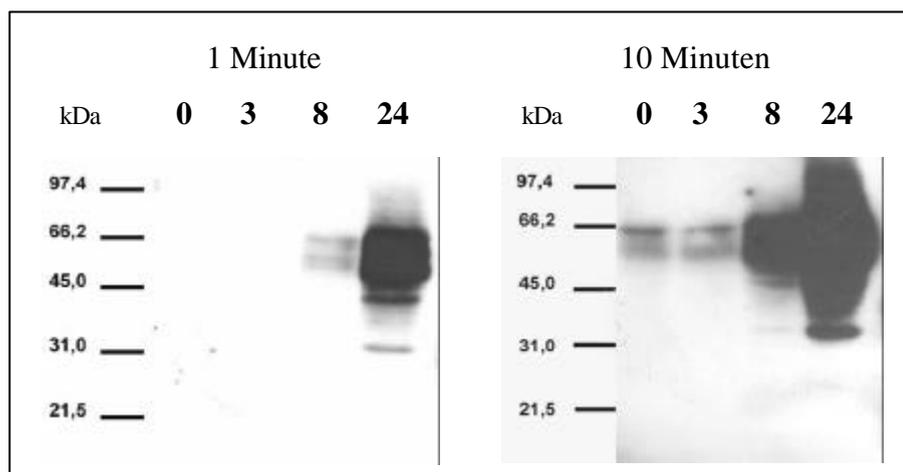


Abb. 31: Western-Blot-Analyse der induzierbaren AtPIN1-Expression in *A. thaliana*-Suspensionskultur ColpTA::*AtPIN1*-Linie 1: Jeweils 50 µg Gesamtproteinextrakte verschiedener Zeitpunkte wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Es wurde polyklonaler, affinitätsgereinigter anti-AtPIN1-Antikörper verwendet. Die Detektion erfolgte durch Chemilumineszenz über Peroxidase-gekoppelten sekundären Antikörper. Abgebildet sind 2 verschiedene Expositionszeiten des Blots (1 Minute und 10 Min). Die Spuren sind bezeichnet als: T= 0 (1), T= 3 h (2), T= 8 h (3), T= 24 h (4).

3.4.3 Auxintransportstudien auf einer *A. thaliana*-Suspensionskultur

In ersten Experimenten wurde untersucht, ob *A. thaliana*-Suspensionskulturen Auxinefflux-Aktivität zeigen. Da Auxine in Tabak-Zellkulturen schnell in ihre inaktiven Konjugate überführt werden (Delbarre *et al.*, 1996), wurde die Versuchsdauer auf 30 s beschränkt. Zur Messung des Transporter-vermittelten Auxinefflux wurde mit ansteigenden Konzentrationen an unmarkiertem Auxin inkubiert, wobei der Anteil tritiierten Auxins konstant gehalten wurde. Für die Messungen wurde 1-NAA verwendet, da es im Gegensatz zu IAA nicht als Substrat für den Auxininflux-Carrier fungiert, sondern in die Zelle diffundiert (Delbarre *et al.*, 1996/1998). Auf diese Weise läßt sich der Auxinefflux, unabhängig von einem Influx mit eigener Kinetik, charakterisieren. Wird die 1-NAA-Konzentration erhöht, nimmt der relative Anteil des durch den Efflux-Carrier aus der Zelle transportierten [³H]1-NAA ab, und es wird eine erhöhte Radioaktivität in den Zellen gemessen. Eine geringere Radioaktivität der Zellen entspricht demnach einer höheren Exportrate.

Aliquots der Suspensionszellen wurden mit 11,4 nM [³H]1-NAA und ansteigenden Mengen unmarkiertem 1-NAA inkubiert, und nach 30 s wurde die Radioaktivität der Zellen durch Szintillationsmessung bestimmt (s. 2.6.2). Im Bereich von 1 bis 10 µM 1-NAA konnte eine zunehmende Radioaktivität in den Zellen festgestellt werden, die ihr Maximum bei 30-50 µM 1-NAA erreichte (s. Abb. 32). Die Abnahme der [³H]1-NAA Aktivität zwischen 100 und 300 µM 1-NAA könnte verursacht werden durch eine Verringerung des cytosolischen pH-Wertes durch die schwache Säure 1-NAA (pK_a = 4,2; Delbarre *et al.*, 1996).

Der Betrag des saturierbaren, Transporter-vermittelten Auxinefflux, berechnet als die Differenz der [³H]1-NAA Aktivität bei 0 und 50 µM 1-NAA (s. Abb. 32), macht in der untersuchten Suspensionskultur ca. 28% der [³H]1-NAA-Gesamtaktivität aus. Die Hintergrundaktivität von etwa 130 cpm kann durch extrazellulär gebundenes [³H]1-NAA erklärt werden. Für die weiteren Versuche zur Bestimmung des kompetitierbaren Auxinefflux wurde eine Konzentration von 50 µM 1-NAA verwendet.

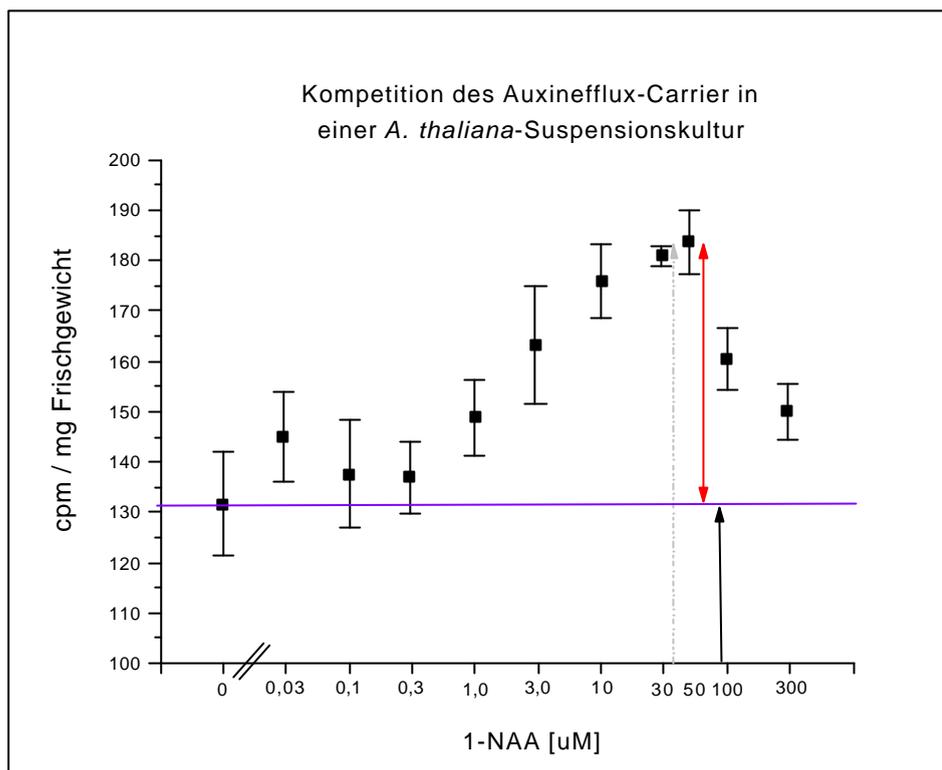


Abb. 32: Darstellung des Auxinefflux der Columbia-Wildtyp-Suspensionskultur. Es ist die Radioaktivität in Zählrate pro Minute (*cpm*) gegen die 1-NAA-Konzentration im logarithmischen Maßstab aufgetragen. Der rote Pfeil zeigt die Größe des saturierbaren Auxinefflux bei maximaler Konkurrenz durch unmarkiertes 1-NAA an. Der schwarze Pfeil repräsentiert die Größe des nicht am Transporter-vermittelten Auxinefflux beteiligten [3 H]1-NAA (ca. 72 % der Gesamtaktivität). Der graue Pfeil zeigt die Gesamtaktivität an. Ein Datenpunkt ist der Mittelwert aus drei Wiederholungen. Der 0-Werte ist der Mittelwert aus 6 Wiederholungen.

Es konnte gezeigt werden, daß *A. thaliana*-Suspensionskulturen 1-NAA über einen Carrier-vermittelten Mechanismus aus der Zelle transportieren. Daher kann angenommen werden, daß die zum Auxinefflux notwendigen Proteine exprimiert werden und die Suspensionskultur als homologes System zur Untersuchung von Komponenten des Auxintransports geeignet sind.

3.4.4 Auxintransportstudien auf einer AtPIN1-überexprimierenden *A. thaliana*-Suspensionskultur

Zur Untersuchung des Einflusses der AtPIN1-Überexpression auf den Auxinefflux wurde die ColpTA::*AtPIN1*-Suspensionskultur geteilt und eine Hälfte für ca. 14 h durch 1 μ M Dexamethasone induziert. Die andere Hälfte diente als Kontrolle und wurde mit dem selben Volumen Lösungsmittel versetzt. Nach jedem Experiment wurde die Induktion in Western-Blot Analysen untersucht, wobei stets AtPIN1-Überexpression nachgewiesen werden konnte (Daten nicht gezeigt, vgl. Abb. 31). Der kompetetierbare bzw. saturierbare Auxinefflux wurde berechnet als Differenz der [3 H]1-NAA-Aktivitäten bei 0 und 50 μ M 1-NAA.

Verglichen mit den Kontrollen zeigten die AtPIN1-überexprimierenden Suspensionskulturen einen höheren saturierbaren Auxinefflux. Bezogen auf die [3 H]1-NAA-Gesamtaktivität betrug dieser saturierbare Auxinefflux in den nicht-induzierten Zellen zwischen 12% und 30% und in induzierten Suspensionskulturen zwischen 25% und 64% (s. Abb. 33). Die Zunahme des Auxinefflux konnte durch AtPIN1-Überexpression bis zu 34% betragen.

Die Ergebnisse der Transportstudien zeigten teilweise deutliche Abweichungen voneinander. Dennoch konnte an induzierten Zellen, verglichen mit den nicht-induzierten, innerhalb eines Einzelexperimentes immer ein erhöhter Auxinefflux gemessen werden.

Um auszuschließen, daß Dexamethason den Auxinefflux beeinflusst, wurden Columbia-Wildtyp-Suspensionskulturen mit dem Glucocorticoid inkubiert. Es stellte sich heraus, daß der Auxinefflux nahezu unverändert blieb (s. Abb. 33).

Damit konnte gezeigt werden, daß AtPIN1-Überexpression in *A. thaliana*-Suspensionskulturzellen zu einem erhöhten Auxinefflux führt.

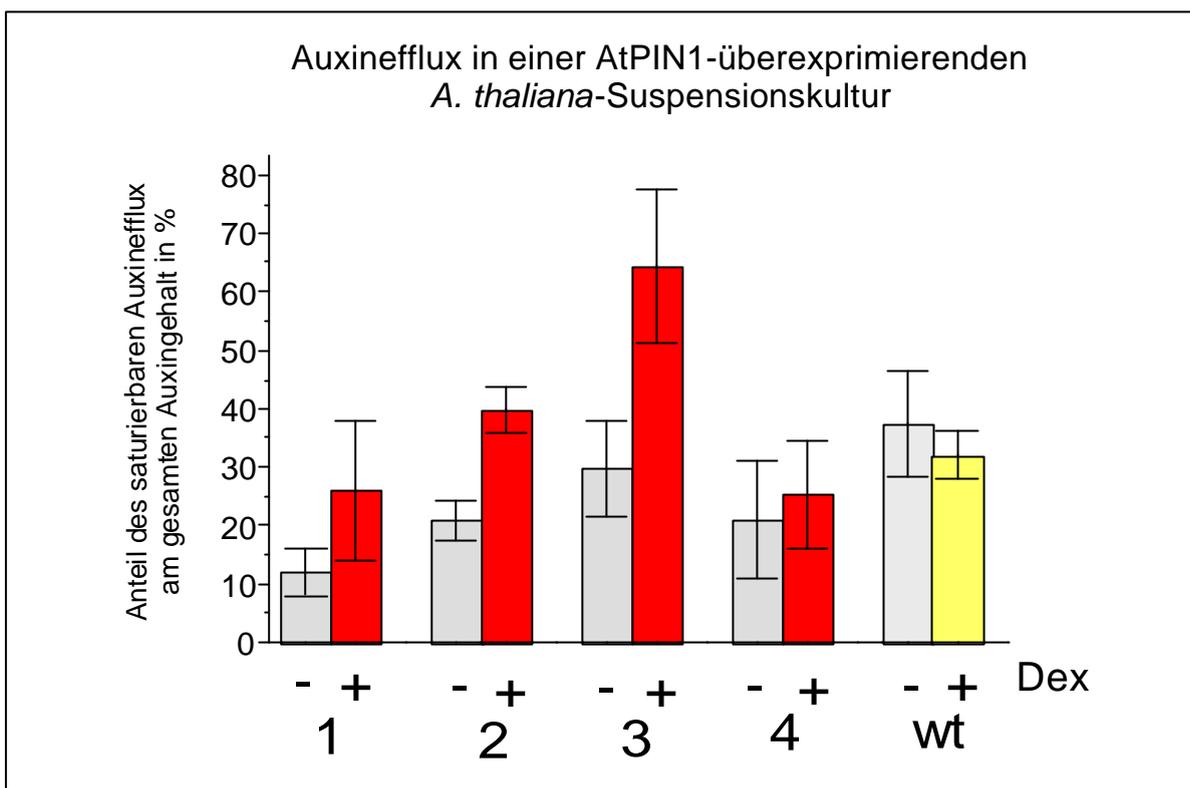


Abb. 33: Darstellung des Auxinefflux in der induzierbaren AtPIN1-überexprimierenden Suspensionskultur ColpTA::AtPIN-Linie 1. Dargestellt sind 4 unabhängige Versuchsreihen. Innerhalb einer Versuchsreihe wurde die Messung je Konzentration 6 mal wiederholt. Nach Bestimmung der Aktivität wurden in jeder Gruppe die Mittelwerte gebildet und die prozentuale Erhöhung der [^3H]1-NAA Aktivität bei Messung mit 50 μM unmarkiertem 1-NAA bezogen auf die Werte ohne 1-NAA ermittelt. Graue Meßbalken zeigen den prozentualen saturierbaren Auxinefflux von nicht-induzierten Kontrollen an, rote Meßbalken den von induzierten. Der hellgraue Meßbalken (wt) zeigt die Columbia-Wildtyp-Suspensionskultur ohne Dexamethason, der gelbe Meßbalken nach Dexamethason-Zugabe. Die Fehlerbalken geben den zusammengesetzten Fehlerwert beider Standardabweichungen der einzelnen Messungen an.

3.4.5 Inhibierung des Auxintransports in einer AtPIN1-überexprimierenden *A. thaliana*-Suspensionskultur

In 3.1.14 wurde gezeigt, daß in Sproßachsen von konstitutiv AtPIN1-überexprimierenden Pflanzen der polare Auxintransport (PAT) weniger sensitiv gegenüber der Inhibierung durch NPA ist. Dies sollte auf dem Zellkultursystem überprüft werden. Von Vorteil ist die kurze Versuchszeit. Im „Stengelassay“ dagegen können wegen der langen Versuchszeit von bis zu 16 h indirekt auf den PAT wirkende Effekte von NPA, wie z.B. eine Störung des intrazellulären Vesikeltransports (Geldner *et al.*, 2001), nicht ausgeschlossen werden.

Mit 1 μM Dexamethason induzierte Zellen und unbehandelte Zellen wurden mit 6 nM [^3H]1-NAA und ansteigenden Konzentrationen von NPA für 30 s inkubiert, das Medium anschließend entfernt und die [^3H]1-NAA Aktivität der Zellen gemessen. Bei

Konzentrationen zwischen 1 μM und 5 μM NPA akkumulierten AtPIN1-überexprimierende Suspensionskulturzellen ca. 30% weniger ^3H 1-NAA als die Kontrollen. Die induzierten Zellen zeigen also eine erhöhte Auxinefflux-Aktivität (s. Abb. 34). Bei höheren Konzentrationen zwischen 25 μM und 50 μM NPA konnte innerhalb der Fehlergrenzen kein signifikanter Unterschied festgestellt werden ($P > 0,35$), die Auxinefflux-Aktivität ist annähernd gleich stark inhibiert wie in den Kontrollzellen (s. Abb. 34).

Die Ergebnisse zeigen, daß AtPIN1-Überexpression sowohl in Suspensionskultur als auch in Spößachsen (s. 3.1.14) zu einer konzentrationsabhängig niedrigeren Sensitivität des Auxintransports gegenüber dem Inhibitor NPA führt.

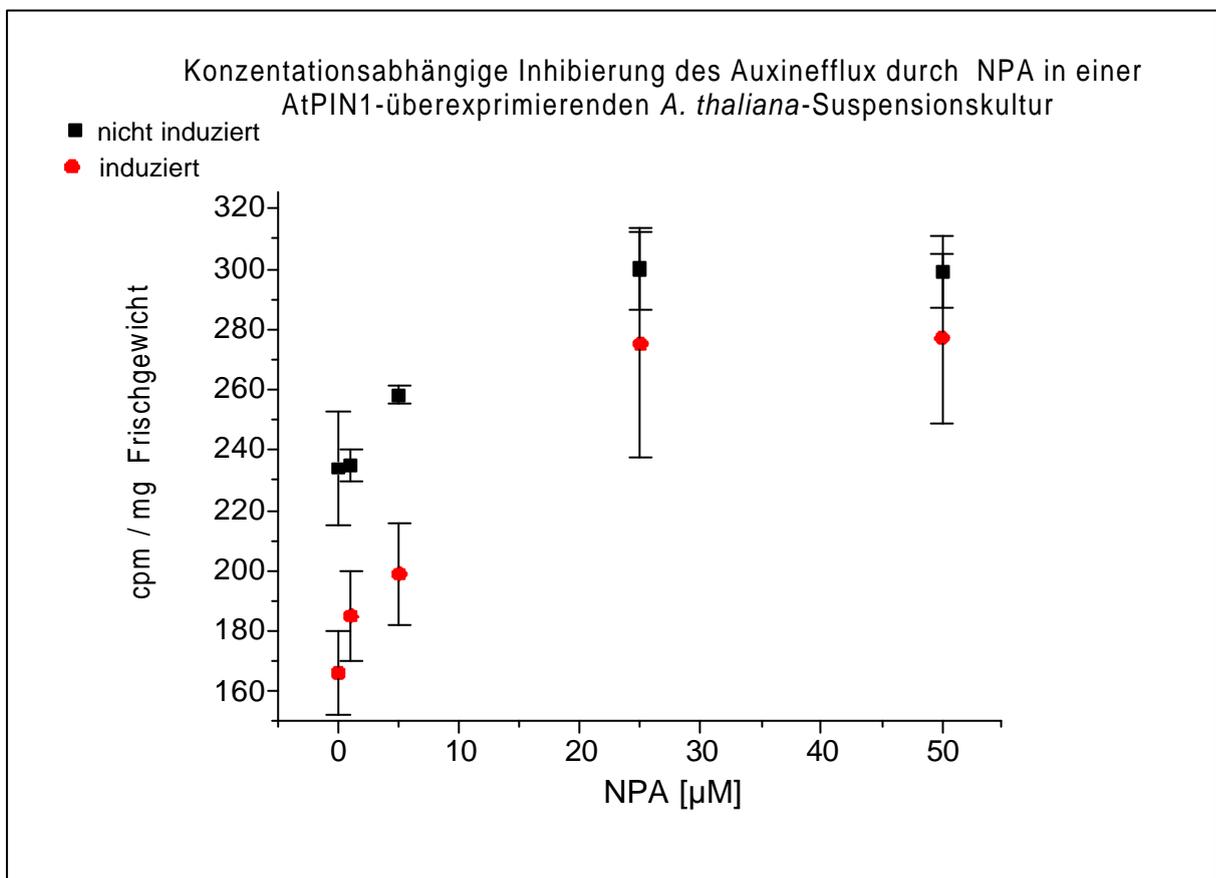


Abb. 34: Graphische Darstellung der konzentrationsabhängigen Inhibierung des Auxinefflux durch NPA in induzierten, AtPIN1-überexprimierenden Suspensionskulturzellen. In der Graphik ist die Radioaktivität in Zählrate pro Minute (*cpm*) gegen die NPA Konzentration aufgetragen. Ein Datenpunkt ist der Mittelwert aus drei Wiederholungen. Zwei weitere unabhängige Versuche ergaben qualitativ das gleiche Ergebnis.

3.5 AtPIN-Lokalisierungen in *pinoid*-Mutanten und PINOID-überexprimierenden Pflanzen

Die phänotypischen Änderungen in *pinoid*-Mutanten (*pid*) sind denen bei *pin1*-Mutanten vergleichbar: Die Anzahl der lateralen Infloreszenzorgane ist reduziert, und die typische nadelförmige Infloreszenzspitze (*pin*-artig) tritt ebenfalls auf. Der polare Auxintransport (PAT) in Stengeln ist ebenfalls reduziert, die Anzahl von Blüten ist verringert und ihre Entwicklung stark gestört (Bennett *et al.*, 1995). Das *PID*-Gen kodiert für eine Serin/Threonin-Kinase und ist in Blütenorganen sowie in vaskulärem Gewebe von Keimlingen und Blütenständen adulter Pflanzen exprimiert (Christensen *et al.*, 2000; Benjamins *et al.*, 2001). In Xylem-Parenchymzellen ist *PID* koexprimiert mit *AtPIN1*. Die Überexpression von *PID* in *A. thaliana* führt zu gravitrop gestörtem Wurzelwachstum und einer reduzierten *DR5*-Aktivität in Wurzelspitzen (Benjamins *et al.*, 2001).

Möglicherweise sind *PINOID* und *AtPIN1* gemeinsam am PAT beteiligt. Deswegen wurde untersucht, ob der Ausfall der *PID*-Proteinfunktion oder eine *PID*-Überexpression das Expressionsprofil von *AtPIN1* und den polaren Auxintransport beeinflusst.

3.5.1 *AtPIN1*-Lokalisierung in Wurzelspitzen und Sproßachsen von *pinoid*-Mutanten und *PINOID*-überexprimierenden Pflanzen

Lokalisierung von *AtPIN1* in Wurzelspitzen

Da die prägnantesten phänotypischen Änderungen durch *PID*-Überexpression in Wurzeln auftreten und mit Störungen im PAT verbunden sind, wurde die *AtPIN1*-Expression und Lokalisierung immunocytochemisch in Wurzelspitzen von 2 bis 4 Tage alten Keimlingen untersucht. Es wurden dabei zwei *Col35S::PID*-Linien verwendet: Zum einen die stark *PID*-überexprimierende Linie 21 und die schwächere Linie 10 (Charakterisierung durch Northern-Blot-Analyse in Benjamins *et al.*, 2001). Außerdem wurde die *AtPIN1*-Expression in der *pinoid*-Mutante *pid-2* (Bennett *et al.*, 1995) und in der Transposon *pid*-Mutante EN::310 (Benjamins *et al.*, 2001) analysiert.

In den *pid*-Mutantenlinien war die *AtPIN1*-Expression und -Lokalisierung unverändert (s. Abb. 35 A/B). Dagegen wurden Änderungen in den *Col35S::PID*-Linien festgestellt: *AtPIN1* war noch immer in denselben Zellen exprimiert, aber seine intrazelluläre Verteilung zeigt

starke Abweichungen von Wildtyp-Pflanzen und *pid*-Mutanten. In der Endodermis und im Perizykel wurden Signale am basalen (oberen) Ende der Zellen, und in einigen Zellen angeschlossen an beiden Längsseiten (lateral) auf ca. 1/3 der Zelllänge detektiert. Es konnte jedoch, anders als im Wildtyp, kein AtPIN1-Signal am apikalen (unteren) Ende detektiert werden. Auch in den Zellen der Stele wies die AtPIN1-Lokalisierung eine Veränderung auf. Es fällt auf, daß das AtPIN1-Signal über die ganze Zelllänge hinweg lateral lokalisiert vorlag, wenngleich stärkere AtPIN1-Signale am basalen Zellende detektiert wurden (s. Abb. 35 C/D/E). In Wildtyp- und *pid*-Wurzelspitzen ist AtPIN1 in der Stele fast ausschließlich apikal lokalisiert (s. Abb. 15 und 35 A/B).

In den äußeren Zellschichten der Wurzelspitze ist die Lokalisierung der AtPIN-Proteine wegen der Zellgröße und dem Ablösen der Zellen voneinander, -aufgrund der *whole mount* Methode- besser zu erkennen als in den weiter innen gelegenen Zellschichten. In Wildtyp-Pflanzen wird AtPIN1 dort allerdings nicht exprimiert. Deswegen wurden *Col35S::AtPIN1*-Pflanzen mit *Col35S::PID*-Pflanzen gekreuzt. In 4 d alten Keimlingen der F1-Generation wurde die AtPIN1-Lokalisierung untersucht: Ectopisch exprimiertes AtPIN1 ist in der Wurzelhaube, der Epidermis und in Rindenzellen nur basal lokalisiert und nicht, wie in *35S::AtPIN1*-Pflanzen, am apikalen Zellende. D. h. durch PINOID-Überexpression erfolgte in diesen Zelltypen ebenfalls eine Umkehrung der intrazellulären AtPIN1-Lokalisierung (s. Abb. 35 F).

Benjamins und Mitarbeiter haben festgestellt, daß die Keimung von *Col35S::PID*-Pflanzen auf Medium mit niedrigen NPA-Konzentrationen das Kollabieren des Hauptwurzelmeristems verhindert und das reduzierte Wurzellängenwachstum partiell kompensiert, was darauf hindeutet, daß durch PID-Überexpression der PAT verändert wird.

Untersucht wurde, ob eine NPA-Behandlung eine veränderte AtPIN1-Lokalisierung zur Folge hat. Hierzu wurden 7 d alte Keimlinge der stark PID-überexprimierenden Linie 21, gewachsen auf Medium mit NPA, analysiert. Ohne NPA waren 7% der Hauptwurzelmeristeme (n=14), bei 0,3 µM NPA 65% (n=17) und bei 1 µM NPA 88% (n=16) der Hauptwurzelmeristeme intakt. In diesen Keimlingen wurde die AtPIN1-Lokalisierung in Wurzelspitzen untersucht. Es konnten keine Veränderungen registriert werden, d.h. AtPIN1 war noch immer vornehmlich am basalen Zellende lokalisiert. Bei Wildtyp-Keimlingen hatte die NPA-Behandlung keinen Einfluß auf die AtPIN1-Lokalisierung (Daten nicht gezeigt). Dies zeigt, daß die veränderte AtPIN1-Lokalisierung nicht die Ursache für die morphologischen Defekte in Wurzelspitzen von PID-überexprimierenden Keimlingen ist.

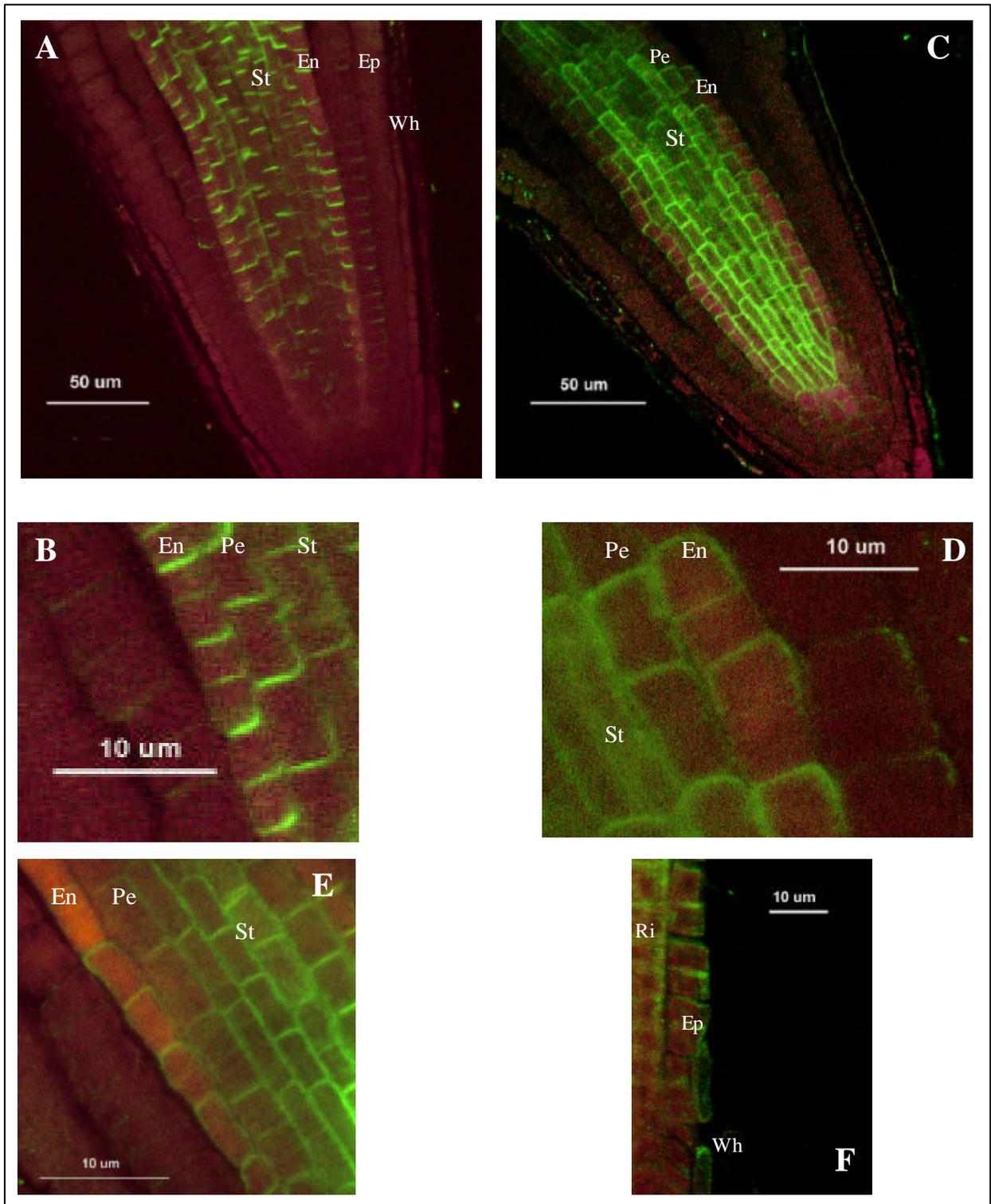


Abb. 35: AtPIN1-Lokalisierung in Wurzelspitzen von 2 bis 4 d alten Pflanzen mit polyklonalem affinitätsgereinigtem anti-AtPIN1-Antikörper. Die Detektion erfolgte mit FITC-gekoppelten Sekundärantikörpern. *pid-2* Mutante (A) und vergrößerter Ausschnitt (B). Col35S::*PID* Linie 21 (C) und vergrößerter Ausschnitt (D). Col35S::*PID*-Linie 10 (E) und F1-Kreuzungsnachkomme von Col35S::*AtPIN1*-Linie 6_1 mit Col35S::*PID*-Linie 10 (F). Die Aufnahmen wurden mit einem konfokalen Laserscanning Mikroskop gemacht. Der rötliche Hintergrund wurde mit einem TRITC-Filter aufgenommen, das grüne AtPIN1-Signal mit einem FITC-Filter. Anschließend wurden die Bilder überlagert. Abkürzungen für gekennzeichnete Zelltypen. St: Stele; Pe: Perizykel; En: Endodermis; Ri: Rindenzellen; Ep: Epidermis; Wh: Wurzelhaube.

AtPIN1-Lokalisierung in Sproßachsen

In oberirdischen Organen von PINOID-überexprimierenden Pflanzen wurden außer einer leicht reduzierten Apikaldominanz keine phänotypischen Änderungen festgestellt (Benjamins *et al.*, 2001).

Die AtPIN1-Lokalisierung wurde in Sproßachsen von stark PID-überexprimierenden Keimlingen der Linie 21 analysiert. Um den Ausfall der PID-Proteinfunktion zu untersuchen, wurde die stärkste bekannte *PID*-Mutante, *pid-3*, verwendet (Bennett *et al.*, 1995). Es wurden Stengelsegmente direkt über der Rosette abgeschnitten, von 31 d alten Pflanzen untersucht. 10-12 µm starke Längsschnitte wurden angefertigt und mit anti-AtPIN1-Antikörper und Fluorophor-gekoppeltem sekundärem Antikörper inkubiert und im Fluoreszenzmikroskop untersucht (Methodik wie bei 3.1.15). In Col35S::*PID*-Stengelsegmenten wurden, ebenso wie im Wildtyp, Signale in Leitbündelzellen benachbart zu den Xylemzellen detektiert. Dort zeigten sie eine strikte intrazelluläre apikal-basal Polarität. In leicht voneinander abgelösten Zellen ließen sich die AtPIN1-Signale den einzelnen Zellen zuordnen: Die Signale konnten nur am apikalen (oberen) Zellende detektiert werden (s. Abb. 36 A/B). Im Gegensatz dazu ist in Wildtyp-Sproßachsen AtPIN1 strikt basal (unten) lokalisiert (s. Abb. 36 D, Gälweiler *et al.*, 1998). Im Vergleich zum Wildtyp stellt dies also eine Umkehr der intrazellulären AtPIN1-Lokalisierung dar. In Stengeln von *pid-3*-Mutanten war weder eine Veränderung des AtPIN1-Expressionsprofils noch seiner Lokalisierung festzustellen. AtPIN1 war, wie im Wildtyp, am basalen Ende von Zellen lokalisiert (s. Abb. 36 C).

Abb. 36 (siehe nächste Seite): Mikroskopische Aufnahmen der AtPIN1-Lokalisierungen in Stengelsegmenten von 31 Tage alten Sproßachsen. Verwendet wurde polyklonaler affinitätsgereinigter anti-AtPIN1-Antikörper. Zur Fluoreszenzmarkierung wurde ein Alexa488-markierter Sekundärantikörper benutzt. Jeweils rechts neben den Fluoreszenzaufnahmen sind die entsprechenden Hellfeldaufnahmen dargestellt. Col35S::*PID*-Linie 21 (**A**) und (**B**), *pid-3*-Mutante (**C**), Columbia-Wildtyp (**D**).

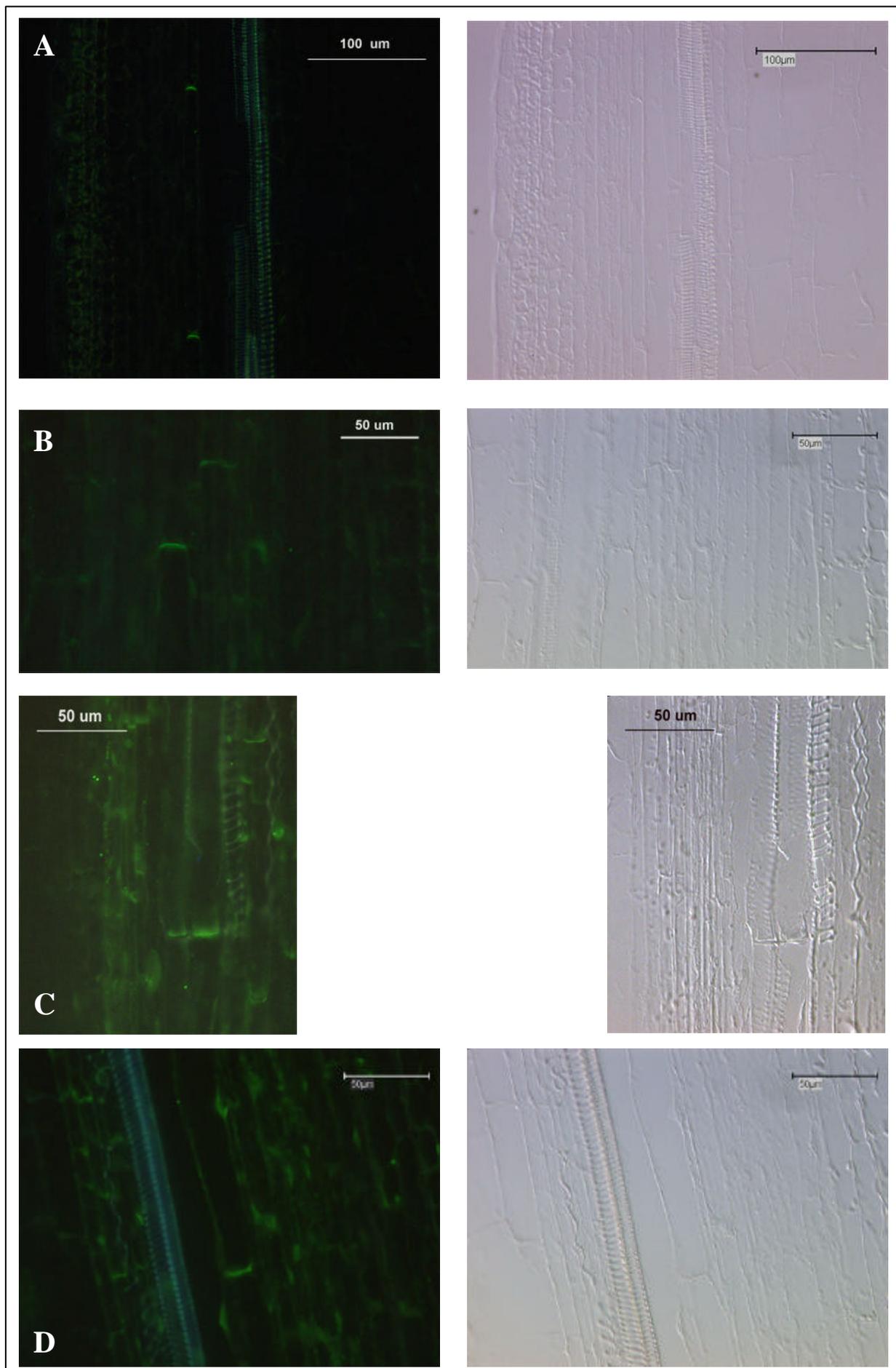


Abb. 36 (Legende siehe vorhergehende Seite):

3.5.2 Untersuchung des polaren Auxintransports in PINOID-überexprimierenden Pflanzen

In Blütenstandachsen von PID-überexprimierenden Pflanzen liegt offensichtlich eine Umkehrung der intrazellulären AtPIN1-Lokalisierung vor. Da angenommen wird, daß die basale AtPIN1-Lokalisierung in Leitbündelzellen und der basipetaler Auxintransport einander bedingen, wurde untersucht, inwieweit der polare Auxintransport beeinträchtigt ist. Hierzu wurden Messungen in 2,5 cm Stengelsegmenten, abgeschnitten direkt über der Rosette, von 31 d alten Pflanzen der stark PID-überexprimierenden Linie 21 durchgeführt (s. 2.6.1). Die Akkumulation von tritiiertem IAA in den oberen 5 mm der Stengelsegmente wurde nach 4 und 18 h gemessen. Es konnten keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen gemessen werden (s. Abb. 37). Zusammenfassend läßt sich festzustellen, daß der polare Auxintransport durch die Lokalisierungs-Umkehr von AtPIN1 in Sproßachsen von PINOID-überexprimierenden Pflanzen unverändert ist.

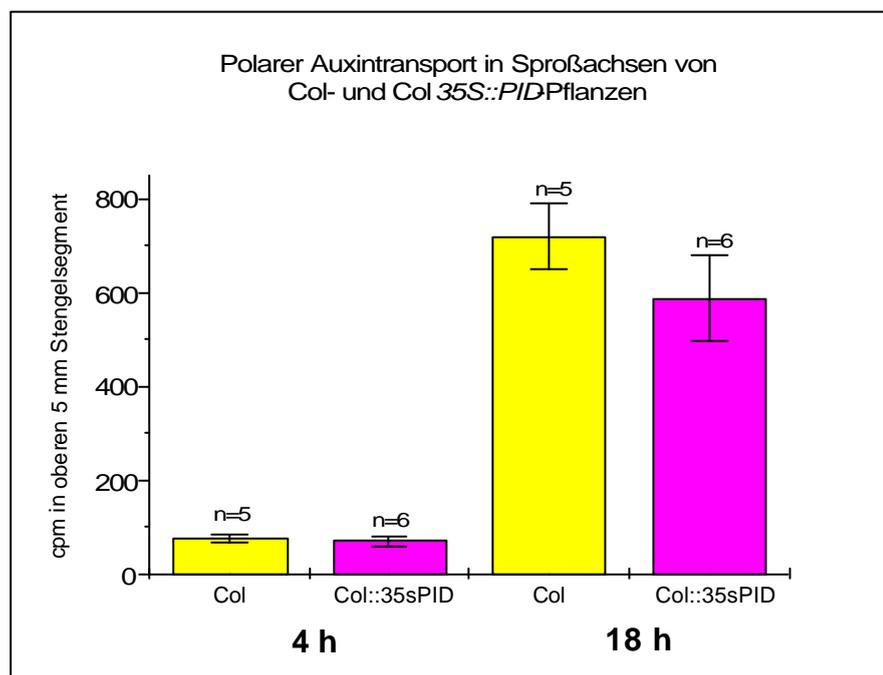


Abb. 37: Polarer Auxintransport in Stengelsegmenten von Wildtyp- und Col35S::PID- Pflanzen der Linie 21. Die Versuchsdauer betrug 4 h und 18 h. Neben 1,45 μ M IAA enthielt die Lösung 7,6 nM [3 H]IAA. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung vom Mittelwert an, darüber ist die Anzahl der verwendeten Stengelsegmente angegeben. Ein weiterer unabhängiger Versuch ergab qualitativ das gleiche Ergebnis.

3.5.3 Lokalisierung von AtPIN2 und AtPIN4 in Wurzelspitzen von PINOID überexprimierenden Pflanzen

Im weiteren Verlauf der Untersuchung sollte die Frage geklärt werden, ob die Änderung der AtPIN1-Lokalisierung in PID-überexprimierenden Pflanzen proteinspezifisch ist, oder ob die Lokalisierung anderer, polar lokalisierter Membranproteine ebenfalls verändert ist.

Zwei weitere Mitglieder der AtPIN-Familie, AtPIN2 und AtPIN4, sind in einigen Zellen der Wurzelspitze ebenfalls polar verteilt. AtPIN4 ist in Zellen der Stele apikal (unten) lokalisiert. Im Ruhenden Zentrum und in der ersten Columella-Zellreihe ist es um die ganze Zelle herum verteilt. In den benachbarten Zellen ist AtPIN4 wiederum apikal lokalisiert (Friml *et al.*, 2002b).

Immuncytochemische Untersuchungen von AtPIN4 und AtPIN2 wurden auf Wurzelspitzen von 2 bis 4 d alten Keimlingen in den PID-überexprimierenden Pflanzenlinien durchgeführt. In Zellen, in denen AtPIN4 nicht-polar verteilt ist, wurden im Vergleich zum Wildtyp keine Unterschiede beobachtet. Dagegen war in Columella angrenzenden Zellen die Verteilung verändert: AtPIN4 lokalisierte am entgegengesetzten basalen Ende von Zellen, während in der Stele die apikal-basal Polarität, ähnlich wie bei AtPIN1, abgeschwächt war. AtPIN4 lokalisierte auch an Längsseiten von Zellen, wobei allerdings stärkere Signale am basalen Zellende detektiert wurden (s. Abb. 38 A-D).

Die intrazelluläre AtPIN2-Lokalisierung war in einigen Zellen ebenfalls verändert: Während in Epidermis und Wurzelhaube AtPIN2, genauso wie im Wildtyp, am basalen Zellende lokalisierte, wurde es in Rindenzellen vornehmlich basal detektiert und nicht apikal wie im Wildtyp (s. Abb. 38 E-H).

Faßt man die immuncytochemischen Untersuchungen auf Wurzelspitzen zusammen, so ist festzustellen, daß die Überexpression der Serin/Threonin-Kinase PINOID in *A. thaliana* die Lokalisierung von AtPIN1, 2 und 4 beeinflusst: AtPIN1 ist in allen Zelltypen vornehmlich am entgegengesetzten, basalen Zellende lokalisiert. In Zellen mit polarer AtPIN4-Verteilung, ist seine intrazelluläre Lokalisierung ebenfalls von apikal zu basal revertiert. In Zellen, in denen AtPIN2 im Wildtyp apikal vorliegt, ist es in PID-überexprimierenden Pflanzen am basalen Zellende lokalisiert. Dagegen ist in anderen Zelltypen die basale AtPIN2-Lokalisierung durch PID-Überexpression unverändert.

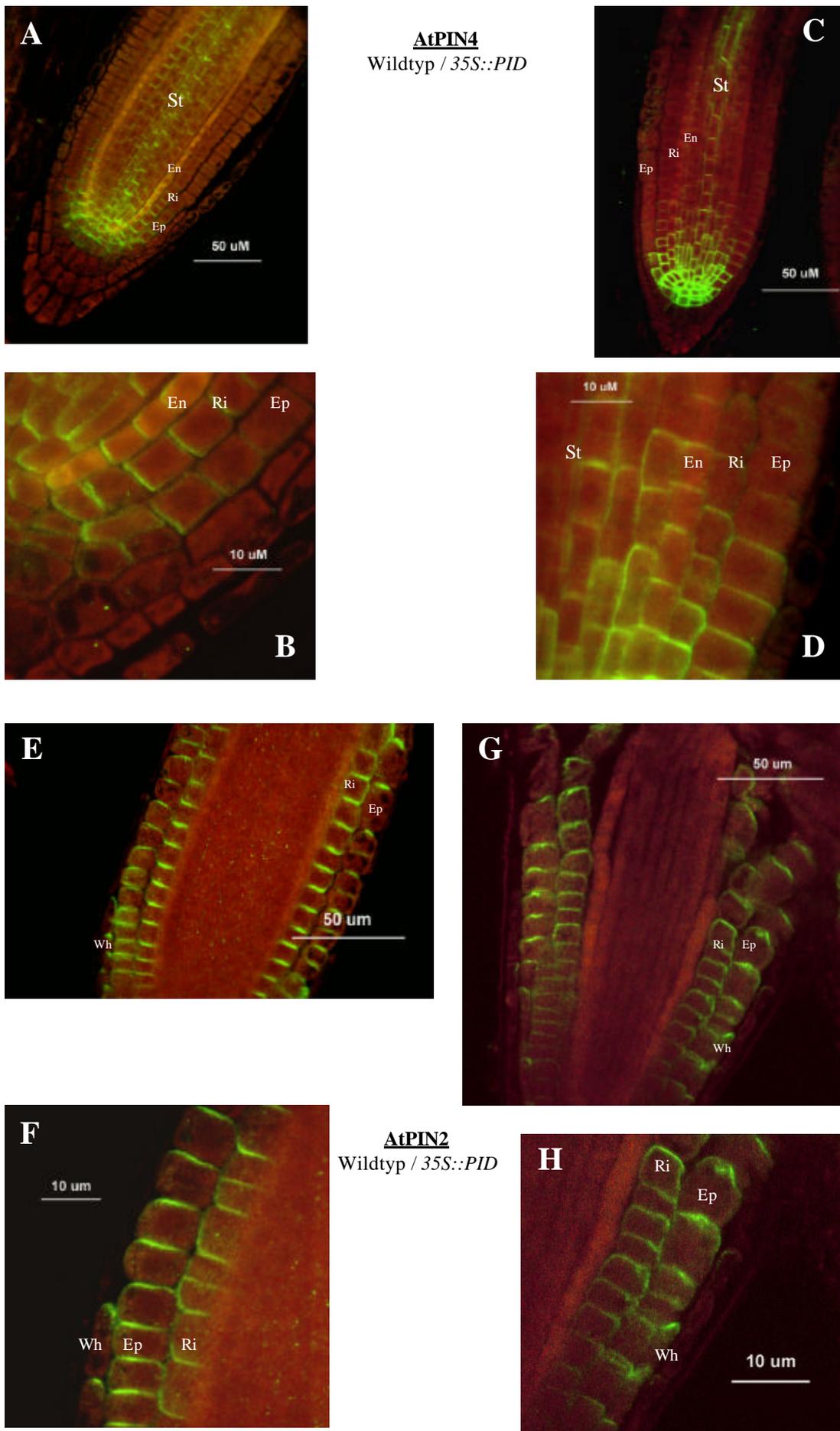


Abb. 38 : (Legende siehe nächste Seite)

Abb. 38 (siehe vorhergehende Seite): AtPIN4-Lokalisierung in Wurzelspitzen von 4 d alten Pflanzen mit polyklonalem anti-AtPIN4-Serum. Columbia (**A**) und vergrößerter Ausschnitt (**B**). Col35S::*PID*-Linie 10 (**C**) und vergrößerter Ausschnitt (**D**). AtPIN2-Lokalisierung in Wurzelspitzen von 2 d alten Pflanzen mit affinitätsgereinigtem anti-AtPIN2-Antikörper. Columbia (**E**) und vergrößerter Ausschnitt (**F**). Col35S::*PID*-Linie 21 (**G**) und vergrößerter Ausschnitt (**H**).

4 Diskussion

Der polare Auxintransport ist wichtig für die Entwicklung von Pflanzen (Lomax *et al.*, 1995). Nur wenige der beteiligten Gene wurden bisher identifiziert. Unter ihnen nehmen *PIN*-Gene eine Schlüsselstellung ein. Sie kodieren für Transporter ähnliche Membranproteine der MFS-Klasse. Es wird vermutet, daß sie am Export von Auxin aus Zellen beteiligt sind (zur Übersicht Friml und Palme, 2002). Von den vier über Mutantanalyse bislang charakterisierten *PIN*-Genen aus *A. thaliana* zeigt die *Atpin1*-Mutante (auch *pin1* genannt) die deutlichsten phänotypischen Veränderungen (s. Einleitung Abb. E) . Dieser Phänotyp erbrachte bislang die wertvollsten Hinweise zur AtPIN1-Funktion.

- Der Ausfall der AtPIN1-Proteinfunktion verursacht in Sproßachsen einen stark reduzierten polaren Auxintransport (Okada *et al.*, 1991, Bennett *et al.*, 1995).
- AtPIN1 ist in Auxintransport-kompetenten-Zellen am basalen Ende lokalisiert, korrespondierend mit der Richtung des polaren Auxintransports in diesen Zellen (Gälweiler *et al.*, 1998)
- Wildtyp-Pflanzen, angezogen unter dem Einfluß von Auxintransportinhibitoren, zeigen einen *pin1*-ähnlichen Phänotyp (Gälweiler *et al.*, 1998).

Es wird daher angenommen, daß AtPIN1 am polaren Auxintransport (PAT) beteiligt ist und womöglich die katalytische Untereinheit des Auxinefflux-Carriers darstellt.

Um Hinweise zur Funktion von AtPIN1 zu bekommen, wurde im Rahmen dieser Arbeit AtPIN1 in verschiedenen Organismen exprimiert und die morphogenetischen Veränderungen sowie die Auswirkung auf den Auxintransport untersucht.

4.1 Konstitutive AtPIN1-Expression in *A. thaliana*

4.1.1 Funktionalität der *AtPIN1*-cDNA

Ein genomischer *AtPIN1*-Klon lag nicht vor, so daß entschieden wurde, für Überexpressionsstudien die *AtPIN1*-cDNA unter der Kontrolle des *CaMV35S*-Promotors zu verwenden. Da Introns die Genexpression beeinflussen können (Bourdon *et al.*, 2001), wurde

überprüft, ob das *35S::AtPIN1*-Konstrukt in der Lage ist, die *pin1-1*-Mutante (Ökotyp Enkheim) zu komplementieren. Hierfür wurde eine *pin1-1*-Suspensionskultur mit dem Konstrukt transformiert und über Regeneration transgene Pflanzen erzeugt (als Enk(p1)*35S::AtPIN1* bezeichnet). In oberirdischen Geweben zeigten diese im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen keine phänotypischen Änderungen (s. 3.1.4 und 3.1.5). Damit wurde gezeigt, daß die *AtPIN1*-cDNA die Defekte der *pin1-1*-Mutante komplementiert und somit als funktionell anzusehen ist.

4.1.2 Phänotypische Charakterisierung der *AtPIN1*-überexprimierenden Pflanzen

Zur Absicherung der phänotypischen Veränderungen, die durch ectopische konstitutive *AtPIN1*-Expression in *pin35S::AtPIN1*-Pflanzen auftreten und um ausschließen zu können, daß Veränderungen vom Ökotyp abhängen, wurden transgene *A. thaliana* im Ökotyp Columbia hergestellt (als *Col35S::AtPIN1* bezeichnet). Für die näher charakterisierten homozygoten transgenen Pflanzen im *pin1*-Mutanten- und im Columbia-Hintergrund wurde in Southern-Blot Analysen ihre genetische Unabhängigkeit gezeigt (s. 3.1.7).

Die Überexpression von *AtPIN1* führt zu gravitrop gestörtem Wurzelwachstum

Die Analysen von Auxintransportmutanten wie z.B. *aux1* und *Atpin2/eir1/agr1* haben gezeigt, daß der polare Auxintransport (PAT) eine wichtige Funktion beim gravitropen Wurzelwachstum besitzt (Bennett *et al.*, 1996, Müller *et al.*, 1998; Chen *et al.*, 1998; Luschnig *et al.*, 1998). Bei 13 von 24 untersuchten *Col::35SAtPIN1*- und allen 4 *Enk(p1)35S::AtPIN1*-Pflanzenlinien traten deutlich sichtbare Defekte im gravitropen Wurzelwachstum auf: Die Wurzeln wuchsen nicht gerade entlang des Schwerkraftvektors, sondern in „zick-zack“-förmigen Mustern oder rollten sich ein (s. Abb. 6 und Abb. 7). In einigen Pflanzenlinien wurde die *AtPIN1*-Expression in Wurzeln mittels Western-Blot-Analysen überprüft. Es stellte sich heraus, daß in *Enk(p1)35S::AtPIN1*- bzw. *Col35S::AtPIN1*-Linien mit starkem Phänotyp auch die *AtPIN1*-Menge stark erhöht war, wogegen in einer *Col35S::AtPIN1*-Linie ohne deutlichen Phänotyp nur eine geringfügig erhöhte *AtPIN1*-Menge detektiert wurde (s. Abb. 12). Zwischen den untersuchten *Col35S::AtPIN1*- und *Enk(p1)35S::AtPIN1*-Linien mit gravitrop gestörtem Wurzelwachstum wurden *AtPIN1*-Expressionsunterschiede festgestellt. Um aufzuklären, ob ein Dosis-Effekt vorliegt, wurde der Verlauf des gravitropen Wurzelwachstums untersucht (s. 2.9.3 und 3.1.8).

Es fiel auf, daß die Wurzeln der stärker AtPIN1-überexprimierende Co β 35S::*AtPIN1* Linie 9_1 ähnlich agravitrop wächst wie die der schwächer AtPIN1-überexprimierende Linie 6_1 (vgl. Abb. 11 mit Abb. 12). Dies zeigt an, daß die beobachteten Wachstumsstörungen ab einer gewissen AtPIN1-Menge nicht weiter verstärkt werden und somit ein Schwellenwert vorliegen könnte. Andererseits wachsen Wurzeln der untersuchten Enk(p1)35S::*AtPIN1*-Linie weniger agravitrop als die der beiden Co β 35S::*AtPIN1*-Linien, obwohl mehr AtPIN1-Protein in Wurzeln vorliegt. Möglicherweise ist der *A. thaliana* Ökotyp Enkheim hinsichtlich einer AtPIN1-Überexpression weniger sensitiv als der Ökotyp Columbia. Zudem ist es denkbar, daß der *pin1*-Mutanten Hintergrund bei diesen Pflanzen eine Rolle spielt.

AtPIN1 wird als katalytische Untereinheit des Auxinefflux-Carrier diskutiert (Friml und Palme, 2002). Wegen der engen Verknüpfung von gravotropem Wurzelwachstum und polarem Auxintransport ist es denkbar, daß eine AtPIN1-Überexpression den Auxintransport verändert und es somit zu dem beobachteten agravitropen Wurzelwachstum kommt. Dafür spricht auch die Lokalisierung von ectopisch exprimiertem AtPIN1.

Ectopisch exprimiertes AtPIN1 zeigt eine polare intrazelluläre Lokalisierung am unteren Zellende und ist in einigen Zelltypen entgegengesetzt zu AtPIN2 lokalisiert (s. 3.1.11)

In Wurzelspitzen von Keimlingen der AtPIN1-überexprimierenden Linien wurde immunocytochemisch mit spezifischen anti-AtPIN1-Antikörpern (Gälweiler *et al.*; 1998, Friml *et al.*, 2002b) die AtPIN1-Lokalisierung untersucht. In Wildtyp-Wurzelspitzen wird AtPIN1 ausschließlich im Zentralzylinder (Stele) und den angrenzenden Zellen des Perizykel und der Endodermis exprimiert, wo das AtPIN1-Protein am apikalen Zellende lokalisiert (s. Abb. 13, Friml *et al.*, 2002b). In Wurzelspitzen von AtPIN1-überexprimierenden Keimlingen wurde zusätzlich ectopisch exprimiertes AtPIN1 in den äußeren Zellschichten in der Wurzelhaube, in der Epidermis und in der Rinde detektiert. Interessanterweise wurde es in diesen Zellen ebenfalls am apikalen (unteren) Zellenende mit angrenzender lateraler Lokalisierung detektiert (s. Abb. 13). In Sproßachsen von Enk(p1)35S::*AtPIN1*-Pflanzen wurde AtPIN1 ebenfalls nur am basalen (unteren) Ende detektiert (s. Abb. 23).

Da das agravitrope Wurzelwachstum in AtPIN1 überexprimierenden Pflanzen stark den Defekten in *Atpin2*-Mutanten ähnelte, ist wegen der hohen Konservierung der *AtPIN1*- und *AtPIN2*-Gene eine Repression von AtPIN2 durch HDGS (*homology dependent gene silencing*) nicht auszuschließen. HDGS kann auftreten, wenn stark transkribierte Transgene hohe Ähnlichkeiten zu endogenen Transkripten aufweisen. Durch Degradation der mRNA wird die

Translation unterbunden (zur Übersicht Meyer und Saedler, 1996). Um zu überprüfen, ob HDGS die AtPIN1-Expression beeinflusst, wurde die AtPIN2-Expression und -Lokalisierung immunocytochemisch mit spezifischen anti-AtPIN2-Antikörpern (Müller *et al.*, 1998) in Wurzelspitzen von Keimlingen überprüft. Die Signale in *35S::AtPIN1*-Keimlingen erschienen mit ähnlicher Intensität wie in Wildtyp-Keimlingen. Die intrazelluläre AtPIN2-Lokalisierung ist nicht geändert (s. Abb. 14 und Abb. 15). Somit scheint das gestörte gravitrope Wurzelwachstum tatsächlich auf AtPIN1-Überexpression und nicht auf *silencing* des *AtPIN2*-Gens zurückzuführen sein.

Müller und Mitarbeiter (1998) haben in Wurzelspitzen mit denselben Antikörpern AtPIN2 in Rindenzellen und Epidermis detektiert. In Epidermiszellen wurde es als basal (oben) und in Rindenzellen sowohl apikal als auch lateral an der Zelllängsseite lokalisiert beschrieben. Konsistent mit einer möglichen Funktion als katalytische Komponente des Auxinefflux-Carriers ist AtPIN2 in der Richtung lokalisiert wie der basipetal, von der Wurzelspitze hinweg zur Elongationszone führende, Auxintransportweg in der Epidermis der Wurzel (Ohwaki und Tsurumi, 1976, Tsurumi und Ohwaki, 1978). In Übereinstimmung damit ist der basipetale Auxintransport in *Atpin2*-Mutanten stark reduziert (Rashotte *et al.*, 2000). In dieser Arbeit wurden erstmals basal lokalisierte AtPIN2-Proteine in Zellen der oberen Wurzelhaube detektiert (s. Abb. 14). Die Immunfluoreszenz in diesen Zellen korrespondiert mit *AtPIN2*-Promotor-GUS Studien (A. Müller, persönliche Mitteilung).

Welche Funktion hat AtPIN2 in diesen Zellen? Da der polare Auxintransport (PAT) offensichtlich auch über Zellen der Wurzelhaube verläuft, könnte AtPIN2 daran beteiligt sein: Die Expression des β -Glucuronidase-Gens (GUS) oder des *green fluorescent protein* (GFP) unter der Kontrolle des auxinresponsiven *DR5*-Promotorelements führte in gravistimulierten Wurzeln an der erdzuwendenden Seite der Wurzelspitze zu einer verstärkten Expression in Zellen der Wurzelhaube, was dort eine erhöhte Auxinmenge anzeigt. Dies wird offensichtlich durch den Auxintransport bewirkt, da die verstärkte *DR5::GUS*-Expression in der Wurzelhaube durch Auxintransportinhibitoren blockiert werden konnte (Rashotte *et al.*, 2001; Ottenschläger, 2002). Ein weiterer Hinweis auf einen polaren Auxintransportweg in der Wurzelhaube ist die Expression des Auxininflux-Carrier AUX1 in Zellen der Wurzelhaube (Swarup *et al.*, 2001).

Wie kann gravitrop gestörtes Wurzelwachstum, bewirkt durch AtPIN1-Überexpression, erklärt werden? In der Epidermis und in der Wurzelhaube ist ectopisch exprimierte AtPIN1 entgegengesetzt von endogenem AtPIN2 am apikalen Zellende lokalisiert (vgl. Abb. 13 und Abb. 14). Es ist denkbar, daß ectopisch exprimierte AtPIN1 gegen die normalerweise

basipetale Auxintransportrichtung in den äußeren Zellschichten der Wurzel (Lomax *et al.*, 1995) Auxin acropetal zur Wurzelspitze hin transportiert (s. Abb. I). Dadurch wird die Auxinhomöostase in diesen Zellen verändert und es kommt zu gravitrop gestörtem Wurzelwachstum.

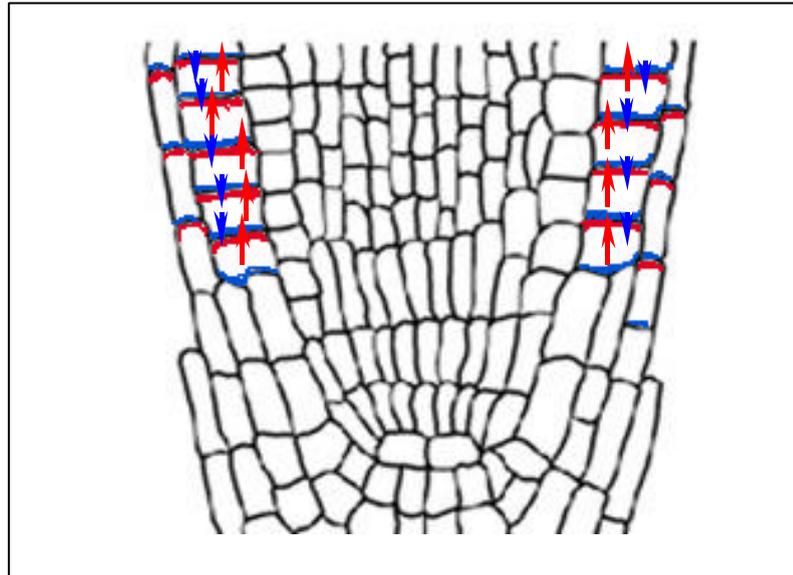


Abb. I: Schematisches Modell des gestörten Auxintransports in Wurzeln von AtPIN1-überexprimierenden Keimlingen. AtPIN1 (blau) transportiert Auxin in Richtung des Apex, entgegen dem durch AtPIN2 (rot) bewirkten basipetalen Auxintransport.

Interessanterweise kolokalisieren ectopisch exprimiertes AtPIN1 und endogenes AtPIN2 in Rindenzellen, im Gegensatz zu Epidermis und Wurzelhaube, am apikalen Zellende (vgl. Abb. 15 mit Abb. 16).

Die molekularen Mechanismen, durch die polare Verteilungen von Membranproteinen in Pflanzen zustande kommen bzw. aufrechterhalten werden, sind nicht bekannt. Die intrazelluläre Lokalisierung von AtPIN1 und AtPIN2 scheint unterschiedlich reguliert zu sein (s. auch 4.5):

- 1) Die AtPIN1-Lokalisierung in Wildtyp-Pflanzen scheint durch Protein intrinsische Motive gesteuert zu sein. AtPIN1 ist in allen bisher untersuchten Zelltypen am unteren Zellende (im Sproß basal, in Wurzelspitzen apikal) lokalisiert (s. Abb. 13 und 23).
- 2) Die AtPIN2-Lokalisierung in Wildtyp-Pflanzen ist sowohl vom Protein als auch durch den Zelltyp bestimmt. AtPIN2 ist in der Wurzelhaube und der Epidermis basal, in Rindenzellen dagegen apikal lokalisiert (s. Abb. 14).

AtPIN1-Überexpression führt in Wurzelspitzen von Keimlingen zu einer erhöhten DR5-Promotoraktivität (s. 3.1.12)

Um festzustellen, ob sich durch AtPIN1-Überexpression die Auxinverteilung in *A. thaliana* verändert hat, wurde eine indirekte Methode zur Auxindetektion eingesetzt: Das synthetische auxininduzierbare DR5-Promotorelement, fusioniert mit Reporter genen wie *GUS* oder *GFP* erlaubt es, freies Auxin in Pflanzen sichtbar zu machen (Ulmasov *et al.*, 1997a; Ottenschläger, 2002). Mittels quantitativer massenspektroskopischer Analysen wurde festgestellt, daß die DR5-Aktivität mit der tatsächlichen Verteilung von freiem Auxin in der Wurzelspitze korreliert (Casimiro *et al.*, 2001; Bhalerao *et al.*, 2002; Friml *et al.* 2002b; Ottenschläger, 2002). Über die molekulare Wirkungsweise der Aktivierung ist wenig bekannt. Es wird eine Beteiligung von AUX/IAA-Proteine und Transkriptionsfaktoren der ARF-Familie angenommen (Ulmasov *et al.*, 1997a/b). Die DR5-Promotoraktivität ist durch verschiedene Auxine stark induzierbar.

Die DR5::*GUS*- bzw. DR5::*GFP*-Konstrukte wurde in Col35S::*AtPIN1*- und Enk(p1)35S::*AtPIN1*-Pflanzen bzw. Col35S::*AtPIN1*-Pflanzen eingeführt. Dabei wurde festgestellt, daß die DR5-Aktivität in Wurzelmeristemen von Keimlingen bei allen stark AtPIN1-überexprimierenden Linien im Vergleich zum Wildtyp erhöht ist (s. Abb. 16 und 17). Zudem ist die Auxinverteilung verändert: Während sich bei Wildtyp-Keimlingen die maximale DR5-Aktivität auf die Zellen des ruhenden Zentrums und der Columella beschränkt, so erscheint sie in 35S::*AtPIN1*-Keimlingen ebenfalls in den benachbarten Zellen mit der gleichen Aktivität und zeigt außerdem eine asymmetrische Verteilung in der Wurzelhaube (s. Abb. 17). Eine Erklärung für die verstärkte DR5-Aktivität kann ein durch AtPIN1-Überexpression verstärkter acropetaler Auxintransport sein: Auxin wird zumeist in oberirdischen Geweben (*source*) gebildet und über den PAT in die Wurzel transportiert, wobei das Wurzelmeristem den Sammelpunkt (*sink*) darstellt (Lomax *et al.*, 1995). Somit fallen dort Störungen in der Auxinhomöostase (hier evtl. hervorgerufen durch verstärkten PAT), deutlicher aus, als in anderen Geweben. Dies könnte auch erklären, warum AtPIN1-Überexpression bei adulten Pflanzen in oberirdischen Geweben zu keinen phänotypischen Veränderungen geführt hat (s. Abb. 6).

Bei der Analyse der DR5-GFP Aktivität in Col35S::*AtPIN1*-Keimlingen wurde die GFP-Fluoreszenz in Zellen der Wurzelhaube nur an Krümmungsinenseiten von agravitrop wachsenden Wurzeln detektiert (s. Abb. 18).

Ähnliches wurde auch bei im basipetalen Auxintransport beeinträchtigten *Atpin2*-Mutanten beobachtet: Es wurde ebenfalls eine erhöhte *DR5*-Aktivität in Zellen der Wurzelhaube detektiert und zwar nur an einer Seite der Wurzelspitze, nämlich an der Innenseite von gekrümmten, agravitrop wachsenden Wurzeln (Ottenschläger, 2002). Dies ist auch bei gravitstimulierten Wildtyp-Keimlingen zu beobachten (Rashotte *et al.*, 2001; Ottenschläger, 2002). Dem klassischen Modell zufolge kommt gravitropes Wurzelwachstum u.a. dadurch zustande, daß Auxin an einer Organseite stärker akkumuliert als an der anderen und dort die Zellstreckung inhibiert und somit eine Krümmung der Wurzel bewirkt wird (zur Übersicht Firm, 2000). Dies deutet darauf hin, daß durch *AtPIN1*-Überexpression, genauso wie in *Atpin2*-Mutanten, der basipetale Auxintransport in der Wurzel reduziert ist. Dabei könnte *AtPIN1* in Epidermis und Wurzelhaube entgegen dem basipetalen Auxinstrom Auxin acropetal transportieren (s. oben).

Die *DR5*-Aktivität wurde auch in Wurzelspitzen von *pin1*-Mutanten untersucht. Dort fiel auf, daß sie im Vergleich zum Wildtyp nicht verändert war (s. Abb. 17). Sabatini und Mitarbeiter (1999) dagegen haben berichtet, daß die *DR5*-Aktivität in *pin1*-Mutanten stark reduziert ist und dies als Argument für einen durch *AtPIN1* vermittelten acropetalen Auxintransport in Wurzeln angesehen. Die Ergebnisse wurden kürzlich korrigiert (Friml *et al.*, 2002b) und stimmen nun mit den hier gemachten Beobachtungen überein. Dies bedeutet allerdings nicht unbedingt, daß *AtPIN1* nicht am acropetalen PAT in Wurzeln beteiligt ist. Denkbar ist, daß der Ausfall der *AtPIN1*-Funktion in Wurzeln durch ein redundantes *AtPIN*-Protein - möglicherweise *AtPIN4*, daß teilweise in denselben Zellen exprimiert - kompensiert wird - (vgl. Abb. 13 mit Abb. 38 A/B).

AtPIN1-Überexpression führt bei Keimlingen zu einer verstärkten Induktion von Seitenwurzeln (s. 3.1.13)

Seitenwurzeln entwickeln sich aus Zellen des Perizykel durch Dedifferenzierung und Wiedereintritt in den Zellzyklus (Malamy und Benfey, 1997). Der erste Schritt, die Initiierung der Seitenwurzelentwicklung aus Perizykel-Zellen, ist Auxin-abhängig: Sowohl exogen zugegebene Auxine, als auch ein durch Mutationen erhöhter endogener Auxinspiegel erhöhen die Anzahl von Seitenwurzelprimordien (Muday und Hayworth, 1994; Zhang und Hasenstein, 1999; Sitbon *et al.*, 1992; Barlier *et al.*, 2000). Sowohl das Entfernen der oberirdischen Organe von *A. thaliana*-Keimlingen als auch Applikation des Auxintransportinhibitors NPA auf den Sproß-Wurzel-Übergang reduzierten die Anzahl der Seitenwurzeln. Dies tritt nicht bei Zugabe von IAA auf (Muday und Hayworth, 1994; Reed *et al.*, 1998). Somit wird

offensichtlich die Seitenwurzelinduktion über acropetal aus dem Sproß in die Wurzel transportiertes Auxin reguliert (Reed *et al.*, 1998). Der basipetale Auxintransport in Wurzeln scheint nicht an der Seitenwurzelentwicklung beteiligt zu sein. Dies wird dadurch verdeutlicht, daß sowohl Dekapitation der Wurzelspitze von *A. thaliana* als auch Zugabe von NPA an den unteren Teil der Wurzel nur einen sehr geringen Einfluß auf die Anzahl von Seitenwurzeln hat (Reed *et al.*, 1998). In Übereinstimmung damit bilden *Atpin2*-Mutanten, die einen reduzierten basipetalen Auxintransport zeigen, genauso viele Seitenwurzeln wie Wildtyp-Pflanzen (E. Benkova, persönliche Mitteilung), wohingegen die im acropetalen Auxintransport beeinträchtigten *aux1*- und *tir3*-Mutanten weniger Seitenwurzeln aufweisen (Marchant *et al.*, 2002, Ruegger *et al.*, 1997).

Wegen der offensichtlichen Verbindung von acropetalem Auxintransport und der Seitenwurzelentwicklung wurde in Keimlingen von mehreren *AtPIN1*-überexprimierenden Linien die Seitenwurzel-dichte bestimmt. Dabei fiel auf, daß in Keimlingen aller durch Western-Blot-Analyse als stark *AtPIN1*-überexprimierend charakterisierten Linien eine zwischen 40% und 67% höhere Seitenwurzel-dichte vorlag (s. Abb. 19). Bei pharmakologischer Reduktion des PAT durch 0,5 µM NPA war die Dichte der Seitenwurzeln bei allen Linien nur noch genauso groß wie im Wildtyp (s. Abb. 19). Dies deutet daraufhin, daß durch *AtPIN1*-Überexpression der acropetale Auxintransport in Wurzeln erhöht wird. *Pin1*-Mutanten zeigten im Vergleich zum Wildtyp keine Veränderungen, was eher auf einen unveränderten acropetalen Auxintransport in Wurzeln hindeutet. Eine Erklärung hierfür könnte die oben erwähnten Redundanz der *AtPIN*-Proteine sein.

4.1.3 Kosuppression durch *AtPIN1*-Überexpression

Sowohl in den charakterisierten *Col35S::AtPIN1*-Pflanzenlinien, die *AtPIN1* stark überexprimieren, als auch in anderen Linien mit gestörtem Wurzelwachstum traten ab etwa der 5. Woche in oberirdischen Pflanzenteilen morphologische Veränderungen auf wie sie auch bei *pin1*-Mutanten vorkommen (s. Abb. 8). Die Veränderungen betrafen nicht die ganze Pflanze, sondern nur einzelne Triebe bzw. Organe. Dieses Phänomen war in den verschiedenen Linien unterschiedlich stark ausgeprägt und trat nicht bei allen Pflanzen einer Linie auf.

Dies legt die Vermutung nahe, daß es in den Linien zu Kosuppression, auch PTGS (*post transcriptional gene silencing*) genannt, gekommen ist: PTGS wird durch die mRNA des

Transgens oder des endogenen Gens initiiert, von denen doppelsträngige RNA-Moleküle transkribiert werden, die in ca. 25 Basen lange Fragmente zerschnitten werden. Durch bis jetzt noch nicht aufgeklärte Mechanismen bewirken die RNA-Fragmente im Cytosol die Degradation der exogenen- und endogenen mRNA (zur Übersicht Sijen und Kooter, 2000). Wie in vielen Untersuchungen beschrieben wurde, betrifft PTGS nicht unbedingt die ganze Pflanze und nicht alle Pflanzen einer Linie; kann auch erst im fortgeschrittenem Alter auftreten. Außerdem ist PTGS meiotisch reversibel, d. h. Keimlinge der nachfolgenden Generation müssen nicht unbedingt betroffen sein (zur Übersicht Vaucheret *et al.*, 1998). Dies stimmt mit den hier gemachten Beobachtungen bei den Col35S::*AtPIN1*-Pflanzen überein.

In einigen Untersuchungen wurde berichtet, daß für PTGS endogenes und exogenes Transkript vorhanden sein sollte und zusammengenommen eine gewisse Menge überschreiten müssen (zur Übersicht Vaucheret *et al.*, 1998).

Somit könnte erklärt werden, warum bei Pflanzen der schwach *AtPIN1* überexprimierenden Linie 7_1 keine *pin1*-artigen Veränderungen auftraten, weil bei ihr die *AtPIN1*-mRNA Menge, wie die Western-Blot-Analysen andeuten, niedriger sein muß, als bei den Linien 6_1 und 9_11. Vaucheret und Mitarbeiter (1997) haben zudem festgestellt, daß bei Einführung eines Gens in die entsprechende Mutante kein PTGS auftrat, wohl jedoch beim Wildtyp.

In dieser Arbeit wurde bei keiner der 4 Enk(p1)35S::*AtPIN1*-Pflanzenlinien im späteren Entwicklungsstadium *pin1*-artige Veränderungen festgestellt (s. Abb. 6), obwohl eine starke *AtPIN1*-Überexpression vorliegt (s. Abb. 12).

4.2 Induzierbare *AtPIN1*-Expression in *A. thaliana*-Pflanzen

Konstitutiv *AtPIN1*-exprimierende Pflanzen haben in oberirdischen Pflanzenteilen keine phänotypischen Veränderungen gezeigt, obwohl ectopische *AtPIN1*-Expression nachgewiesen werden konnte (s. 3.1.15). Das lag womöglich an einer dafür nicht ausreichend hohen Proteinmenge. Das offensichtliche „Gegensteuern“ von Pflanzen gegenüber hohen Transkriptmengen durch Kosuppression zeigt die Limitierung der konstitutiven Überexpression. Um Kosuppression zu vermeiden, wurde *AtPIN1* daher unter der Kontrolle des Glucocorticoid induzierbaren GVG-Systems (Aoyama und Chua, 1997) in *A. thaliana* des Ökotyp Columbia exprimiert (s. 3.2).

Keimlinge von 3 Pflanzenlinien, die auf Medium mit Induktor angezogen wurden, starben nach ca. 2 Wochen (s. Abb. 27), was auf eine hohe Toxizität von großen *AtPIN1*-Mengen

hindeutet. Zeitweises Besprühen von älteren Pflanzen mit dem Induktor führte zu auffällig löffelförmig gewölbten (hyponastischen) Hochblättern, die bei einer Pflanzenlinie sogar teilweise eingerollt waren (s. Abb. 28).

In *Phaseolus vulgaris* (Bohne) wurde über einen Zusammenhang zwischen polarem Auxintransport und Blattwachstum berichtet: Applizierte man Auxin auf Blattoberseiten, so wurde das Zellstreckungswachstum an Blattunterseiten stimuliert und schon nach 15 Minuten war ein Aufwölben der Blätter zu beobachten. Wurden allerdings Inhibitoren des polaren Auxintransports zusammen mit Auxin appliziert, so erfolgte kein hyponastisches Blattwachstum (Hayes und Lippincott, 1976; Hayes, 1981). Die Autoren postulierten deswegen einen inhibierbaren dorsiventralen Auxintransport in Blättern.

Daher ist es denkbar, daß die in Western-Blot-Analysen nachgewiesene (s. Abb. 26) stark erhöhte AtPIN1-Menge zu einem erhöhten Auxintransport in Blättern geführt hat, der eine differentielle Zellstreckung an Blattober- und Blattunterseite bewirkt hat.

4.3 Auxintransportstudien in heterologen Expressionssystemen

Der nächstliegende Ansatz zur Untersuchung einer möglichen Auxinefflux-Carrier Funktion von AtPIN1 ist seine Expression in heterologen Expressionssystemen und die Messung des Auxintransports. Der Vorteil heterologer Systeme besteht darin, daß in der Regel keine redundanten Gene vorhanden sind, die z. B. Defekte durch das Ausschalten von Genen kompensieren können und Überexpressionseffekte nicht durch differentielle Expression von anderen Genen, Gen-*silencing* oder Proteinmodifikation abgeschwächt werden. Der Nachteil von heterologen Systemen besteht im Fehlen eventuell benötigter Hilfsfaktoren

Die *AtPIN1*-cDNA wurde in *Saccharomyces cerevisiae* (Hefe) und in *Xenopus* Oozyten (Froscheiern) exprimiert. In Oozyten wurde tritiiertes IAA direkt injiziert und sein Ausstrom durch Messung der Aktivität im Überstand bestimmt. Die Hefen wurden über Diffusion beladen, und nach einem Waschschrift wurde die Kinetik der Retention von tritiiertem IAA in den Hefen gemessen. Sowohl *AtPIN1*-exprimierende Hefen als auch die Kontrollen verloren schon nach sehr kurzer Zeit fast die gesamte Aktivität (s. Abb. 29), was auf endogene Transporter oder Permeasen, die Auxin hinaustransportieren, hindeutet. Oozyten gaben IAA zwar langsamer an das umgebende Medium ab als Hefe (s. Abb. 29), jedoch war kein erhöhter Ausstrom aus *AtPIN1*-exprimierenden Zellen festzustellen. Kompetitionsversuche mit überschüssigem, unmarkiertem IAA veränderten die Ausstromkinetik in Oozyten nicht

und deuten somit auf Diffusion oder einen nicht kompetierbaren Efflux als Mechanismus für den IAA-Heraustransport hin.

Obwohl für das AtPIN2-Protein bereits funktionelle Untersuchungen in Hefe durchgeführt wurden, gibt es auch in diesen Fällen keine überzeugenden Hinweise auf eine Auxintransportaktivität. Chen und Mitarbeiter (1998) haben, ähnlich den Versuchen in dieser Arbeit, Hefezellen mit tritiiertem IAA beladen und seine Retention gemessen. Für kinetische Untersuchungen völlig unzureichend wurden nur zwei Zeitpunkte (nach 0- und nach 60 Minuten) angegeben, wobei nach 60 Minuten weniger Aktivität in AtPIN2-exprimierenden Hefen gemessen wurde. Zum Nachweis eines Carrier-vermittelten Auswärtstransports hätten auch Wettbewerbsversuche mit unmarkiertem IAA durchgeführt werden müssen, worüber aber nicht berichtet wurde. Luschnig und Mitarbeiter (1998) zeigten, daß AtPIN2-exprimierende Hefen resistent gegen normalerweise toxisches 5-Fluoro-Indol (5-F-In) sind, was sie durch Efflux der Substanz aus den Zellen erklärten. Es wurde aber nicht gezeigt, ob diese Substanz überhaupt ein Substrat für den Auxinefflux-Carrier ist. Zwar ist IAA (Indol-3-Essigsäure) auch ein Indolderivat, besitzt aber im Gegensatz zu 5-F-In noch eine Carboxylgruppe. Die meisten Substanzen mit Auxin-Aktivität und alle bis jetzt bekannten Substrate für den Auxinefflux-Carrier haben als strukturelle Gemeinsamkeit einen Aromaten und eine Carboxylgruppe (Lomax *et al.*, 1995). Es wird angenommen, daß dies für die spezifischen Wechselwirkungen von Auxin mit Proteinen entscheidend ist (Libenga und Mennes, 1995).

In heterologen Systemen konnte also bisher noch nicht überzeugend gezeigt werden, daß es sich bei AtPIN-Proteinen um Auxintransporter handelt.

4.4 Funktionelle Charakterisierung von AtPIN1 in *A. thaliana*-Suspensionskulturen und in *A. thaliana*-Pflanzen

Die funktionelle Charakterisierung von Proteinen, die am polaren Auxintransport (PAT) beteiligt sind, ist stark limitiert durch die zur Verfügung stehenden homologen Untersuchungssysteme. In Blütenstandachsen z.B. ist der PAT von mehreren entwicklungsabhängigen Faktoren abhängig: Vom Alter der Pflanzen, von der Anzahl der lateralen Organe und von der Entwicklung des vaskulären Systems (Bennett *et al.*, 1995; Prezemeck *et al.*, 1996). In Suspensionskulturen spielen entwicklungsspezifische Prozesse

eine geringere Rolle, da die Zellen wenig differenziert sind. In Tabak-Suspensionskulturen wurden Auxininflux und -efflux mittels radioaktiv markierten Auxinen durch Konkurrenz bzw. Inhibierung charakterisiert (Delbarre *et al.*, 1996/1998; Imhoff *et al.*, 2000). Direkte Efflux-Messungen waren nicht möglich, da innerhalb weniger Minuten über 40% des zugegebenen Auxins metabolisiert wurde, weswegen auch die kurzen Versuchszeiten von 30 Sekunden gewählt worden sind (Delbarre *et al.*, 1996). Methodisch vergleichbar mit diesen Experimenten, wurde zur Messung einer möglichen Beteiligung von AtPIN1 am Auxinefflux im Rahmen dieser Arbeit erstmals ein Auxintransportassay in *A. thaliana*-Suspensionskulturen erfolgreich etabliert (s. 3.4.3).

Der Auxinefflux in *A. thaliana*-Suspensionskulturen erfolgt über einen Transporter vermittelten Mechanismus (s. 3.4.3)

Als Auxin wurde 1-NAA verwendet, das ausschließlich über Diffusion in Zellen gelangt und nur ein Substrat für den Efflux-Carrier, aber nicht für den Influx-Carrier ist (Delbarre *et al.*, 1996). Der Auxinefflux in einer *A. thaliana* Columbia-Wildtyp-Suspensionskultur wurde in Konkurrenzexperimenten untersucht.

Aliquots der Suspensionskultur wurden 30 s mit einer konstanten Menge [^3H]1-NAA und ansteigenden Mengen 1-NAA inkubiert und die Radioaktivität der Zellen gemessen. Die Konkurrenzkurve verlief glockenförmig (s. Abb. 32). Bei 30-300 nM 1-NAA war kein Anstieg der [^3H]1-NAA Aktivität festzustellen. Die Konkurrenzkurve verlief ab 1 μM 1-NAA steiler und erreichte ihr Maximum bei 30-50 μM 1-NAA, bei der der Auxinefflux gesättigt war (s. Abb. 32). Die Differenz der [^3H]1-NAA Aktivität zwischen 0 und 50 μM 1-NAA stellt den Betrag des saturierbaren-Efflux dar. Er machte ca. 28 % der [^3H]1-NAA Gesamtaktivität aus, in die auch noch Reste des Mediums, extrazelluläre- und in Organellen adsorbiertes [^3H]1-NAA einfließen. Die konzentrationsabhängige Konkurrenz zeigt, daß in *A. thaliana*-Suspensionskulturen ein Transporter-vermittelter Auxinefflux vorliegt. Bemerkenswert ist die Geschwindigkeit des Auxinefflux, der innerhalb von 30 Sekunden signifikante Mengen 1-NAA aus Zellen heraustransportiert, was seinerseits gerade erst durch Diffusion eingeströmt ist. Studien in Tabak-Suspensionskulturen haben gezeigt, daß zu diesem Zeitpunkt erst 25% der [^3H]1-NAA-Aktivität, bezogen auf den Gleichgewichtszustand, in Zellen vorliegt (Delbarre *et al.*, 1996).

Bei Zugabe von 100-300 μM 1-NAA wurde eine geringere [^3H]1-NAA Aktivität gemessen, was einem niedrigeren saturierbaren Efflux entspricht (s. Abb. 32). Die gleichen Beobachtungen wurden auch in Tabak-Suspensionskulturen gemacht (Delbarre *et al.*, 1996).

Die Autoren erklärten dies mit einer Verringerung des cytosolischen pH-Wertes durch die schwache Säure 1-NAA, wodurch auch der Auxinefflux reduziert wurde (Delbarre *et al.*, 1996).

Vergleicht man die Kompetitionskurve der in dieser Arbeit verwendeten *A. thaliana*- mit der der Tabak-Suspensionskultur (Delbarre *et al.*, 1996), so ist ein sehr ähnlicher Verlauf festzustellen. Dies deutet darauf hin, daß in beiden Systemen der Auxinefflux eine ähnliche Charakteristik besitzt.

Überexpression von AtPIN1 in *A. thaliana*-Suspensionskulturen erhöht den Auxinefflux und führt zu einer konzentrationsabhängig reduzierten Sensitivität gegenüber dem Inhibitor NPA

Ähnlich wie in der *A. thaliana*-Wildtyp-Suspensionskultur wurde der Auxinefflux in einer durch Glucocorticoid-Zugabe induzierbar AtPIN1-überexprimierenden *A. thaliana*-Suspensionskultur untersucht. (s. 3.4.4). Die Kultur wurde aus Col $pTA::AtPIN1$ -Keimlingen erzeugt (s. 2.8.1 und 3.2.4). Der Betrag des saturierbaren Auxinefflux wurde bei AtPIN1-überexprimierender Suspensionskultur und nicht-induzierter Kontrollkultur ermittelt und miteinander verglichen. Dabei wurde festgestellt, daß bei AtPIN1-Überexpression der Auxinefflux bis zu 64% der [3 H]1-NAA-Gesamtaktivität ausmachte, während er in der Kontrollkultur maximal 30% betrug (s. Abb. 33). Zwischen den einzelnen Experimenten waren Unterschiede im Betrag des erhöhten saturierbaren Auxinefflux durch AtPIN1-Überexpression festzustellen (s. Abb. 33). Diese Streuung könnte von verschiedenen starken AtPIN1-Expressionsniveaus aufgrund von Variabilitäten des GVG-Systems herrühren (McNellis *et al.*, 1998). In Western-Blot-Analysen wurden zwischen den Experimenten zwar keine signifikanten Expressionsunterschiede festgestellt, allerdings lassen sich mit dieser Methode geringe Unterschiede in der Proteinmenge nicht nachweisen.

Somit konnte indirekt gezeigt werden, daß die Überexpression von AtPIN1 zu einer erhöhten Auxinefflux-Aktivität in Suspensionskulturzellen führt. Neben dem reduzierten Auxintransport in Blütenstandachsen von *pin1*-Mutanten (Okada *et al.*, 1991), ist dies der zweite transportphysiologische Hinweis einer Beteiligung von AtPIN1 am Auxinefflux.

Da *pin1*-Mutanten starke Veränderungen im vaskulären Gewebe aufweisen und ein enger Zusammenhang zwischen der Entwicklung des vaskulären Systems und dem PAT besteht (Sachs 1981, 1991) war unklar, ob AtPIN1 unmittelbar am PAT beteiligt ist. Der *pin1*-Phänotyp ließ auch die Möglichkeit zu, daß AtPIN1 nur einen wichtigen Faktor für die Entwicklung des vaskulären Systems darstellt. Da Suspensionskulturen nicht vaskularisiert

sind, kann festgestellt werden, daß AtPIN1 am PAT beteiligt ist. Im homologen System kann allerdings nicht unterschieden werden, ob AtPIN1 ein Auxintransporter oder ein Regulator des polaren Auxintransports ist.

Zur Untersuchung einer möglichen regulativen Funktion von AtPIN1 im PAT wurde in der AtPIN1-überexprimierenden Suspensionskultur die Inhibierbarkeit des Auxinefflux durch den Auxintransportinhibitor NPA untersucht. Dabei akkumulierte bei Zugabe von 0 bis 5 μM NPA in Suspensionskulturzellen bis zu 30% weniger [^3H]1-NAA als in den Kontrollen. Bei Zugabe von 25 und 50 μM NPA war, innerhalb der Fehlergrenzen, ähnlich viel [^3H]1-NAA in den überexprimierenden Zellen, wie in der nicht-induzierten Kontrolle (s. Abb. 34). Die niedrigere [^3H]1-NAA Menge, die bei geringen NPA-Konzentrationen in AtPIN1 überexprimierenden Zellen akkumuliert, kann mit einer höheren Efflux-Aktivität erklärt werden, weil NPA den Auxinefflux weniger stark inhibiert als in den Kontrollen. Wird die NPA Konzentration erhöht, so akkumuliert in AtPIN1-überexprimierenden Suspensionskulturen ähnlich viel [^3H]1-NAA wie in den Kontrollen, und in beiden Fällen tritt maximale Inhibierung des Efflux auf. Somit verringert eine AtPIN1-Überexpression konzentrationsabhängig die Regulierbarkeit des Auxinefflux-Carriers durch NPA.

Konstitutive AtPIN1-Expression in *A. thaliana* führt in Sproßachsen ebenfalls zu einer konzentrationsabhängig reduzierten Sensitivität des PAT gegenüber NPA (s. 3.1.14)

Der Einfluß von NPA auf den PAT wurde in Stengelsegmenten von 2 AtPIN1-überexprimierenden *Enk(p1)35S::AtPIN1*-Pflanzenlinien untersucht. Bei Zugabe von 5 und 15 μM NPA war im Vergleich zum Wildtyp ein um 100 bis 150% erhöhter PAT festzustellen. Bei 50 μM NPA war der PAT genauso stark reduziert wie im Wildtyp (s. Abb. 21). Somit wurden in AtPIN1 überexprimierenden Zellkulturen und in *Enk(p1)35S::AtPIN1*-Stengelsegmenten, qualitativ betrachtet, die gleichen Effekte festgestellt. Folgende Erklärungen für die Beobachtungen sind denkbar:

- NPA bindet an AtPIN1. NPA wird teilweise durch überexprimiertes AtPIN1 „heraustitriert“ und kann somit den PAT weniger stark inhibieren. Wird die NPA-Konzentration weiter erhöht, so werden „NPA-Bindungsstellen“ an allen AtPIN1-Proteinen abgesättigt und der PAT ist maximal inhibiert.
- AtPIN1 kompetitiert die Bindung von NPA an ein NPA-bindendes Protein (für Kandidaten s. 1.1.5). AtPIN1 interagiert direkt mit einem NPA-Bindungsprotein. Wird die AtPIN1-Menge erhöht, so konkurriert es mit NPA um dieselben Bindungsstellen und reduziert die NPA-Bindung, womit die inhibierende Wirkung von NPA auf den PAT

abgeschwächt ist. Bei höheren NPA-Konzentrationen würde dann weniger AtPIN1 gebunden sein und der PAT wird stark inhibiert.

Im Unterschied zu AtPIN1 überexprimierenden Suspensionskulturen, bei denen der Auxintransport erhöht ist, wurde in Sproßachsen von *Enk(p1)35S::AtPIN1*-Pflanzen kein verstärkter PAT gemessen (s. Abb. 20). Ectopisch exprimiertes AtPIN1 wurde immunocytochemisch am basalen Ende in allen Zellen der untersuchten Stengelsegmente nachgewiesen (s. Abb. 23). Zusammen mit den Western-Blot Untersuchungen in Wurzeln von Keimlingen (s. Abb. 12) zeigt dies eine AtPIN1-Überexpression auch in Sproßachsen an. Möglicherweise ist in *Enk(p1)35S::AtPIN1*-Pflanzen die für einen deutlich meßbar erhöhten Auxintransport notwendige AtPIN1-Menge nicht vorhanden.

4.5 Wechselwirkungen zwischen AtPIN-Proteinen und PINOID

Pin1- und *pinoid*-Mutanten (*pid*) zeigen ähnliche phänotypische Veränderungen sowie einen reduzierten PAT in Sproßachsen (Bennett *et al.*, 1995). Das PID-Gen kodiert für eine cytosolische Serin/Threonin-Kinase (Christensen *et al.*, 2000). Konstitutiv *PID*-überexprimierende *A. thaliana*-Keimlinge zeigen ein gravitrop gestörtes Wurzelwachstum, und in stark überexprimierenden Pflanzenlinien kollabiert das Hauptwurzelmeristem schon nach wenigen Tagen. Dies kann durch Anzucht auf NPA-haltigem Medium verhindert werden, was auf einen erhöhten Auxintransport in diesen Pflanzen hindeutet (Benjamins *et al.*, 2001). Zudem ist PID in einigen Organen in Xylem-Parenchymzellen co-exprimiert mit AtPIN1 (Benjamins *et al.*, 2001). Diese Ergebnisse lassen vermuten, daß AtPIN1 und PID möglicherweise in einem engen funktionalen Zusammenhang stehen. Deswegen wurde untersucht inwieweit in *pid*-Mutanten oder *PID*-überexprimierenden Pflanzen (*35S::PID*) die Lokalisierung und das Expressionsprofil der mutmaßlichen Auxinefflux-Carrier Komponente AtPIN1 beeinflußt ist.

PID-Überexpression führt zu einer basal-apikal Umkehrung der zellulären AtPIN1 Lokalisierung in Blütenstandachsen, wobei der PAT jedoch nicht signifikant verändert ist

Der PAT wurde in Stengelsegmenten einer *PID*-überexprimierenden Pflanzenlinie untersucht (s. 3.5.2). Dabei wurden im Vergleich zum Wildtyp keine signifikanten Veränderungen

festgestellt (s. Abb. 37). Dies korreliert mit den schwachen phänotypischen Veränderungen in oberirdischen Pflanzenteilen (Benjamins *et al.*, 2001). Da angenommen wird, daß die basale zelluläre Lokalisierung von AtPIN1 in Xylem-Parenchymzellen die Richtung des PATs, der über Zell-zu-Zell Transport erfolgt, in diesen Zellen bedingt (Palme und Gälweiler, 1999), wurde die Lokalisierung von AtPIN1 in Blütenstandachsen von *35S::PID*-Pflanzen untersucht: Immuncytochemische Untersuchungen zeigten Signale in Xylem-Parenchymzellen. Das Expressionsprofil stimmt mit dem von AtPIN1 in Wildtyp-Pflanzen überein (Gälweiler *et al.*, 1998; diese Arbeit s. Abb. 36 D). Allerdings ist die intrazelluläre Lokalisierung von AtPIN1 revertiert. Während AtPIN1 in Wildtyp-Sprossen am basalen (unteren) Zellende lokalisiert ist, befindet es sich bei der untersuchten *35S::PID*-Linie am apikalen (oberen) Zellende (s. Abb. 36 A/B).

Die revertierte intrazelluläre AtPIN1-Lokalisierung bei gleichzeitig unverändertem PAT steht offenbar im Widerspruch zur postulierten Rolle von AtPIN1 als katalytische Untereinheit des Auxinefflux-Carriers. Eine mögliche funktionelle Kompensation der AtPIN1-Inversion durch andere Proteine der AtPIN-Familie ist unwahrscheinlich. Die starken phänotypischen Veränderungen in *pin1*-Mutanten deuten auf eine nicht-redundante Funktion von AtPIN1 in oberirdischen Geweben hin. Zudem sind andere AtPIN-Proteine in *35S::PID*-Pflanzen ebenfalls revertiert (s.u.). Gegen eine Funktion von AtPIN1 als Auxintransporter sprechen auch die folgenden Ergebnisse:

Keimung von *35S::PID*-Pflanzen auf NPA-haltigem Medium kompensiert zwar die meisten Defekte, die durch PID-Überexpression bewirkt wurden, beeinflusst aber nicht die „falsche“ AtPIN1-Lokalisierung

Benjamins und Mitarbeiter (2001) berichteten, daß das Hauptwurzelmeristem von *35S::PID*-Keimlingen nach wenigen Tagen kollabiert und die Auxinhomöostase in Wurzelspitzen verändert ist. Dies konnte durch niedrige Dosen NPA kompensiert werden, was einen erhöhten PAT als Grund dafür wahrscheinlich erscheinen läßt. In dieser Arbeit wurde bestätigt, daß NPA das Kollabieren des Hauptwurzelmeristem verhindert, wobei aber nicht die gestörte AtPIN1-Lokalisierung in Wurzelspitzen verändert wurde (s. 3.5.1). Zusammengekommen mit der gleichfalls umgedrehten AtPIN1-Lokalisierung in Sproßachsen von *35S::PID*-Pflanzen, ist dies ein weiterer Hinweis darauf, daß die basale (in Wurzeln: apikale) Lokalisierung von AtPIN1 nicht notwendig für einen basipetalen (in Wurzeln: acropetalen) PAT ist. Um allerdings redundante Funktionen anderer AtPIN-Proteine in

Wurzeln völlig ausschließen zu können, muß noch deren Lokalisierung in NPA-behandelten 35S::*PID*-Keimlingen untersucht werden.

In Wurzelspitzen und Sproßachsen der untersuchten *pid*-Mutantenallele wurde keine veränderte AtPIN1-Lokalisierung festgestellt (s. Abb. 35, 36). In Wurzelspitzen wird PID gar nicht (Benjamins et al., 2001) und in Sproßachsen nur sehr schwach (R. Offringa, persönliche Mitteilung) exprimiert. Somit kann keine Aussage über den Einfluß von PID auf die AtPIN1-Proteinlokalisierung im Wildtyp getroffen werden. Untersuchung der AtPIN1-Lokalisierung in stark PID-exprimierenden Geweben wie jungen lateralen Infloreszenzorganen und Blüten (Christensen et al., 2000; Benjamins et al., 2001) sollte Aufschluß darüber geben.

*Was kann aus den Untersuchungen der 35S::*PID*-Pflanzen für die Funktion von AtPIN1 im polaren Auxintransport geschlußfolgert werden ?*

AtPIN1 ist ein positiver Regulator des PAT. Die vorliegenden Daten lassen eine Funktion als Porenkomponente des AEC unwahrscheinlich erscheinen. Dabei scheint AtPIN1 nicht unbedingt über direkte Protein-Protein-Wechselwirkungen den Auxinefflux-Carrier zu regulieren, sondern eventuell über noch nicht bekannte Signaltransduktionswege.

Für einige Zucker-Transporter-ähnliche Proteine aus Hefe und Pflanzen wurde gezeigt, daß sie als Zucker-Sensor oder dual als Zucker-Transporter und –Sensor funktionieren können. Sie regulieren durch bisher noch nicht aufgeklärte Mechanismen die Transkription bzw. Endocytose von Transportproteinen oder den Zucker-Metabolismus, wodurch der Zuckergehalt in Zellen gesteuert wird (zur Übersicht Lalonde et al., 1999).

Funktionen als regulatorische Proteine im PAT sind sowohl für AtPIN1, wie in dieser Arbeit gezeigt wurde als auch für AtPIN2 denkbar: Rashotte und Mitarbeiter (2001) haben drei *Atpin2*-Mutantenallele (*eir1-1*, *agr1-5*, *agr1-7*) mit stark reduziertem basipetalen Auxintransport in Wurzeln mit der *rcn1*-Mutante gekreuzt, die einen stark erhöhten basipetalen Auxintransport zeigt. Die Kreuzungsnachkommen zeigten einen ebenso stark erhöhten Auxintransport wie *rcn1*-Mutanten. D.h. der Defekt in der Phosphatase 2A-Untereinheit ist dominant über den Ausfall der AtPIN2-Funktion. Wäre AtPIN2 die Porenkomponente des Auxinefflux-Carriers in den äußeren Zellschichten der Wurzel, so müßte sein Ausfall dominant sein. Also sollte der basipetale Auxintransport in *eir1-1* etc. x *rcn1* genauso stark reduziert sein wie in *eir1-1*, *agr1-5* und *agr1-7*, was aber nicht zutrifft.

Diese Daten deuten auch für AtPIN2 auf eine regulatorische Funktion im polaren Auxintransport hin.

PID-Überexpression führt ebenfalls zu einer Umkehrung der intrazellulären Lokalisierung von AtPIN2 und AtPIN4 in Wurzelspitzen (s. 3.5.3)

In Wurzelspitzen von *35S::PID*-Keimlingen wurde immuncytochemisch die Lokalisierung von AtPIN-Proteinen untersucht. AtPIN1 ist intrazellulär genauso wie im Sproß nicht mehr apikal (unten) wie im Wildtyp, sondern größtenteils basal (oben) lokalisiert (s. Abb. 35 A/B).

In Kreuzungsnachkommen von *35S::AtPIN1*- mit *35S::PID*-Pflanzen zeigte auch ectopisch exprimiertes AtPIN1 eine apikal-zu-basal Lokalisations-Umkehrung (s. Abb. 35 F).

In Zellen, in denen AtPIN4 im Wildtyp apikal lokalisiert, ist es nun ebenfalls basal lokalisiert. Dagegen zeigt AtPIN4 in Columella-Zellen keine veränderte Lokalisierung und liegt wie im Wildtyp um die ganze Zelle herum verteilt vor (s. Abb. 38 C/D). Interessanterweise wurde die AtPIN2-Lokalisierung in *35S::PID*-Keimlingen nur in Rindenzellen vom apikalen zum basalen Ende verändert, dagegen zeigt AtPIN2 in Zellen der Wurzelhaube und der Epidermis noch immer seine ursprüngliche basale Lokalisierung (s. Abb. 38 G/H und Abb. II).

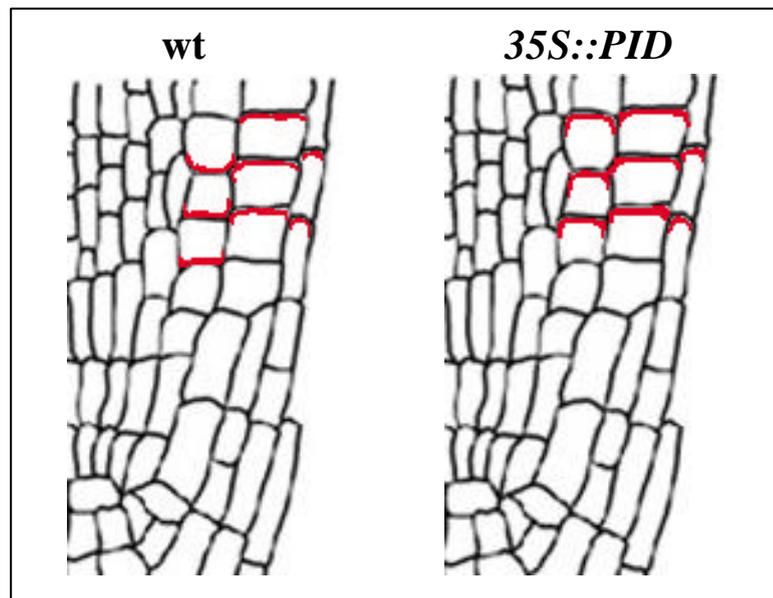


Abb. II: Schematische Darstellung der Zelltyp-spezifischen AtPIN2-Reversion (rot) in Rindenzellen von Wurzelspitzen in PID-überexprimierenden Keimlingen. Zelltypen (von außen nach innen): Wurzelhaube, Epidermis, Rinde.

Offenbar beeinflusst also die PID-Überexpression selektiv nur die Lokalisierung von normalerweise basal (im Sproß) bzw. apikal (in der Wurzel) lokalisierten AtPIN-Proteinen. Wie ist dieser Befund zu erklären ?

In Pflanzen ist bisher wenig über das intrazelluläre *sorting* von polar lokalisierten Membranproteinen bekannt. In tierischen Epithel- und Nervenzellen sind die Mechanismen besser untersucht. Ausgehend vom Trans-Golgi-Netzwerk (TGN) gibt es verschiedene Mechanismen für die Translokation von basalen und apikalen Membranproteinen. Basal adressierte Proteine erreichen die Plasmamembran über verschiedenen Vesikel (u.a. Clathrinummantelte-Vesikel). Apikal adressierte Proteine werden in Lipid-Flößen (*lipid rafts*) im TGN „gesammelt“ und dann zur apikalen Membran transportiert. Apikal-Basal-Lokalisierungen sind nicht streng voneinander getrennt. Mittels Transcytose können basale Proteine auch zur apikalen Membran gelangen (zur Übersicht Keller und Simons, 1997). Für basal adressierte Proteine gibt es mindestens zwei *sorting*-Signale innerhalb der Proteinsequenz wie Tyrosine oder ein Di-Leucin bzw. ein Leucin-Isoleucin Aminosäurepaar im C-terminalen Bereich (Matter und Mellman, 1994). Erkennung und „Einbau“ oder Assoziierung von Proteinen an Lipid-Flöße für eine apikale Translokation erfolgt durch Glycophosphatidyl-Inositol-Anker, Transmembrandomänen und N-Glucosylierte Aminosäuren. Basales *sorting* scheint dominant über apikales *sorting* zu sein: Einige normalerweise basal lokalisierte Proteine, bei denen der C-Terminus deletiert wurde, lokalisierten an der apikalen Membran (zur Übersicht Simons und Ikonen, 1997). Es gibt Hinweise darauf, daß eine über Transcytose verlaufende basal-zu-apikal Umkehrung der Lokalisierung von Membranproteinen über Phosphorylierung von Serin-Aminosäuren stattfindet (Mostov und Cardone, 1995).

Ähnlich zu einigen polar lokalisierten Membranproteinen aus Tieren, besitzen AtPIN-Proteine am C-Terminus mehrere Di-Leucin- und Leucin-Isoleucin Motive, die als basales *sorting*-Signal fungieren könnten. Zudem sind mehrere Serine, die als mögliche Phosphorylierungsstellen in Frage kommen, am C-Terminus vorhanden (Friml, 2000).

Daraus läßt sich folgendes Modell zur Steuerung der AtPIN-Polarität ableiten:

In polarisierten Zellen sind AtPIN1/2/4, falls sie nicht phosphoryliert werden, apikal lokalisiert (ectopisch exprimiertes AtPIN1 ist in allen untersuchten Zelltypen apikal (im Sproß: basal) lokalisiert). Durch Zelltyp-abhängige, selektive Phosphorylierung einzelner AtPIN-Proteine kann das dominante apikale Lokalisierungsmuster verändert werden. In Rindenzellen der Wurzel sind ectopisch exprimiertes AtPIN1 und endogenes AtPIN2 beide

apikal lokalisiert. In Epidermis-Zellen dagegen sind ectopisches AtPIN1 und endogenes AtPIN2 entgegengesetzt lokalisiert. Durch Überexpression der PINOID-Kinase werden AtPIN1/2/4 in allen polarisierten Zellen phosphoryliert (direkt oder über eine Kaskade) und lokalisieren nun am basalen Ende.

Zur Erhärtung der Hypothese müßte zunächst die Interaktion von PID mit den AtPIN-Proteinen nachgewiesen werden durch z.B. Hefe-2-Hybrid-Untersuchungen und Immunpräzipitationsversuche. Mögliche Phosphorylierungsstellen der AtPIN-Proteine sollten mutiert und die Lokalisierung der Proteine untersucht werden.

Mögliche Funktion von PINOID beim polaren Auxintransport

Da PID-Überexpression zwar die AtPIN1-Lokalisierung im Sproß revertiert, aber der PAT dadurch nicht verändert wird und weil die morphologischen Veränderungen der Wurzelspitze wahrscheinlich durch einen erhöhten PAT verursacht sind, ist es vorstellbar, daß PID auch andere am PAT beteiligte Proteine beeinflusst. Dabei könnte PID ein Glied einer, die Translokation von Proteinen steuernden, Signaltransduktionskette sein: PID zeigt gewisse Ähnlichkeiten zu Proteinkinase-C-Proteinen aus Tieren. Gut erforscht ist die Signaltransduktionskette der Insulin-induzierten Translokation des Glucosetransporters GLUT4. Sie geht aus vom Insulinrezeptor, der über eine Phosphoinositol/Proteinkinase-C-Signaltransduktionskette zur Phosphorylierung von GLUT4 enthaltenden sekretorischen Vesikeln führt, die an Actin-Filamenten entlang zur basalen-Plasmamembran gelangen und mit ihr fusionieren (zur Übersicht Simpson *et al.*, 2001). Interessanterweise gibt es zu den beteiligten Proteinen Orthologe in Pflanzen, wovon die meisten auch eine Funktion im Auxintransport zu haben scheinen (u.a. PID, RCN1, GNOM, KNOLLE; zur Übersicht Muday, 2002). Dies könnte bedeuten, daß Pflanzen einen ähnlichen Mechanismus zur Regulation des Auxintransports nutzen. Es ist unwahrscheinlich, daß PID-Überexpression zu einer Inversion sämtlicher basal (in Wurzeln: apikal) lokalisierter Membranproteine führt, da die Zellpolarität - und damit die asymmetrische Verteilung von Membranproteinen - für den Aufbau mehrzelliger Organismen entscheidend ist. Zudem zeigen PID-überexprimierende Pflanzen nur leichte morphologische Veränderungen in oberirdischen Pflanzenorganen. Es ist denkbar, daß PID-Überexpression in Wurzeln zu einer erhöhten Sekretion von noch nicht charakterisierten Auxinefflux-Carrier-Proteinen an die Plasmamembran führt. Kandidaten dafür sind die ABC-Transporter ähnlichen Proteine AtMDR1, AtPGP1 und AtPGP2 (zur Übersicht Muday, 2002) aus *A. thaliana* oder TM20 aus Mais, das keiner bekannten Proteinklasse angehört (Stiefel *et al.*, 1999). In *pid*-Mutanten ist möglicherweise deren

Sekretion vermindert und verursacht dadurch den „Auxintransport“-Phänotyp. Die Inversion der 3 AtPIN-Proteine ist also möglicherweise nur ein Teilaspekt, der durch PID-Überexpression hervorgerufenen Veränderungen.

4.6 Modell für die Funktion von AtPIN1

Zusammenfassend werden Ergebnisse aus dieser Arbeit und aus der Literatur zusammengestellt, aus denen ein Modell für die Funktion von AtPIN1 beim polaren Auxintransport (PAT) abgeleitet werden kann:

- *pin1*-Mutanten zeigen einen reduzierten PAT in Sproßachsen und phänotypische Veränderungen, die durch Behandlung mit Auxintransportinhibitoren phänotypisch kopiert werden können (Okada *et al.*, 1991; Gälweiler *et al.*, 1998). Mutationen in anderen Genen (*PID*, *IFL1*, *MP*, s. Einleitung), deren Funktion beim PAT bisher unverstanden sind, bewirken ähnliche Störungen in *A. thaliana*. Somit ist unklar, welche Funktion AtPIN1 beim PAT besitzt.
- Die phänotypischen Änderungen bei konstitutiv AtPIN1-überexprimierenden Keimlingen wie die Defekte im gravitropen Wurzelwachstum und die erhöhte Seitenwurzeldichte deuten auf einen veränderten PAT hin. Diese Vermutung wird bestärkt durch die erhöhte und asymmetrische Aktivität des auxinresponsiven *DR5*-Promotorelements in Wurzelspitzen, was erhöhte Auxinkonzentrationen und eine veränderte Auxinhomöostase anzeigt.
- AtPIN1 besitzt die berechnete Topologie eines Membranproteins mit Homologie zu Transportproteinen. In Xylem-Parenchymzellen des Sproßes, durch die der PAT verläuft, lokalisiert AtPIN1 am basalen Ende von Zellen, was mit einer möglichen Funktion als Porenkomponente des basal lokalisierten Auxinefflux-Carrier-Komplex (AEC) korreliert (Gälweiler *et al.*, 1998). Gegen eine Funktion als Auxintransporter spricht, daß in PINOID-überexprimierenden *A. thaliana* die intrazelluläre AtPIN1-Lokalisierung sowohl im Sproß als auch in der Wurzelspitze umgedreht ist, wodurch allerdings der PAT im Sproß nicht verändert wurde (s. Abb. 35, 36, 37). Dies bedeutet, daß für eine normale Entwicklung von *A. thaliana* AtPIN1 zwar benötigt wird, aber seine intrazelluläre Lokalisierung nicht mit der Richtung des PAT korrelieren muß. Es ist offensichtlich nicht notwendig, daß AtPIN1 mit dem in den Xylem-Parenchymzellen des Sproßes basal lokalisierten AEC (Lomax *et al.*, 1995) kolokalisiert.

- Überexpression von AtPIN1 führt in *A. thaliana*-Suspensionskulturen zu einem (i) erhöhten Auxinefflux und (ii) zu einer konzentrationsabhängigen niedrigeren Sensitivität des Auxintransports gegenüber Inhibierung durch NPA sowohl in Suspensionskulturen als auch in Sproßachsen von AtPIN1-überexprimierenden Pflanzen. Dies zeigt, daß AtPIN1 (i) den Auxinefflux stimuliert und (ii) eine regulatorische Funktion im PAT besitzt.

Die Aufklärung der konkreten Funktion von AtPIN1 beim PAT wird also weiterhin Gegenstand der Forschung sein. Hertel (1983) spekulierte über ein in Zellen polar lokalisiertes Protein mit Auxin-Rezeptor-Eigenschaften. Ähnlich wie bei Zuckertransporter-homologen Proteinen aus Pflanzen und Hefe mit Rezeptor-Funktion (zur Übersicht Lalonde *et al.*, 1999), ist es denkbar, daß AtPIN1 als Auxin-Sensor wirkt. Dabei könnte AtPIN1 dazu analog die Transkription oder die Endocytose von Komponenten des AEC regulieren.

4.7 Ausblick

Funktionelle Charakterisierung von Komponenten des Auxintransportsystems

In dieser Arbeit wurden erstmals *A. thaliana*-Suspensionskulturen für Auxinefflux-Transportuntersuchungen gezeigt. Damit steht nun ein homologes System zur funktionellen Charakterisierung von Komponenten oder Regulatoren des Auxinefflux-Carriers wie z.B. PID, RCN1 oder BIG (s. 1.1.7) zur Verfügung. Transformation der induzierbar AtPIN1-überexprimierenden Suspensionskultur mit *sense* und *antisense* Konstrukten unter Kontrolle eines z.B. Ethanol induzierbaren Promotors und anschließende Auxin-Transportstudien könnten,

- 1) eine direkte Beteiligung der Proteine am Auxintransport belegen
- 2) mögliche funktionelle Interaktionen mit AtPIN1 bei der Regulation des Auxinefflux aufklären.

Weiterhin könnte in *A. thaliana*-Suspensionskulturen der putative Auxininflux-Carrier AUX1 funktionell charakterisiert werden.

Ist AtPIN1 ein NPA-bindendes Protein ?

In Sproßachsen von konstitutiv AtPIN1-überexprimierenden Pflanzen und in der induzierbar AtPIN1-übererexprimierenden Suspensionskultur wurde eine konzentrationsabhängig reduzierte Sensitivität des Auxintransports gegenüber dem Inhibitor NPA festgestellt.

Möglicherweise bindet NPA an AtPIN1, was ein weiterer Hinweis auf eine regulatorische Funktion von AtPIN1 beim PAT wäre. In Kompetitionsstudien mit tritiiertem NPA an mikrosomale Proteinfractionen von *35S::AtPIN1*-Pflanzen und AtPIN1-exprimierender Hefe kann diese Fragestellung untersucht werden.

Ist AtPIN1 ein Auxin-bindendes Protein ?

Um Hinweise auf eine mögliche Auxin-Rezeptorfunktion zu erhalten, können Bindungsstudien mit tritiiertem Azido-IAA an mikrosomale Proteinfractionen von *35S::AtPIN1*-Pflanzen und AtPIN1-exprimierender Hefe durchgeführt werden. Mehrere Auxin-bindende Proteine wurden bereits auf diese Weise identifiziert (Feldwisch *et al.*, 1992, 1994).

Heterologe Expression in Xenopus Oozyten

Oozyten wurden für Auxinefflux-Experimente genutzt. AtPIN1 zeigte in diesem System keine Auxin-Transportaktivität, da es wahrscheinlich ein Regulator des Auxinefflux ist. Der AEC besteht vermutlich aus mehreren Proteinen (s. 1.1.5). Koexpression von AtPIN1 mit den putativen Auxin-Transportern AtMDR1, AtPGP1, AtPGP2 oder TM20 in Oozyten und Auxinefflux-Messungen könnten zur Aufklärung der Struktur des AEC beitragen.

Intrazelluläre Polarität von Membranproteinen

Die polare Verteilung von Membranproteinen und Lipiden in Zellen ist eine Voraussetzung zur Ausbildung von Zellpolaritäten und somit für mehrzelliges Leben. Die Umkehrung der intrazellulären Lokalisierung von AtPIN1, 2 und 4 in einigen Zelltypen in PID-überexprimierenden *A. thaliana* zeigt die Bedeutung von Kinasen bei der Etablierung bzw. Erhaltung der zellulären Polarität. PID beeinflusst wahrscheinlich die Translokation von AtPIN-Proteinen zur Plasmamembran. Die Homologie von PID zu Proteinkinase-C-Proteinen (Zur Übersicht Muday, 2002) deutet auf eine vordere Position in einer möglichen Signaltransduktionskette hin, wogegen die AtPIN-Proteine wahrscheinlich an deren Ende stehen. Somit kann der Mechanismus zur Ausbildung von Proteinpolaritäten ausgehend von 2 Ausgangspunkten untersucht werden.

1) AtPIN-Proteine:

AtPIN2 und ectopisch exprimiertes AtPIN1 zeigten in einigen Zelltypen der Wurzel eine entgegengesetzte Lokalisierung. Die proteinintrinsischen Faktoren, die offensichtlich für die intrazelluläre Lokalisierung mitverantwortlich zeichnen, sind nicht bekannt. In einem

ersten Schritt kann die Herstellung von chimären AtPIN1/AtPIN2-Genen, deren Expression in *A. thaliana* und die Untersuchung der intrazellulären polaren Verteilung der Proteine für das polare *sorting* wichtige Proteinbereiche identifizieren. In einem zweiten Schritt können durch Deletion bzw. Mutagenese einzelner Aminosäuren *sorting*-Signale identifiziert werden.

Am polaren *sorting* beteiligte bzw. die polare Lokalisierung aufrechterhaltende Proteine in Pflanzen sind bisher nicht bekannt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden transgene *A. thaliana*-Pflanzen hergestellt, die ein AtPIN1/GFP-Fusionsprotein unter der Kontrolle des *AtPIN1*-Promotors exprimieren. Erste Analysen zeigten polar lokalisiertes Fusionsprotein und deuten die Funktionalität des Proteins an (Daten nicht gezeigt). Zur Identifizierung von Proteinen, die polares *sorting* steuern, könnten AtPIN1/GFP-Pflanzen chemisch oder mittels Agrobakterien vermittelter T-DNA Insertion mutagenisiert werden. Die Nachkommen können im Fluoreszenzmikroskop auf eine veränderte AtPIN1/GFP-Lokalisierung hin untersucht werden und betroffene Gene mittels revers-genetischer Methoden identifiziert werden.

2) PINOID

Zur Analyse der Spezifität der PINOID-Funktion beim polaren Protein-*sorting* sollte die Lokalisierung weiterer polar lokalisierter Membranproteine untersucht werden. Hierfür wurden Kreuzungen von *35S::PID*-Pflanzen mit Pflanzen, die ein AUX1/HA-Fusionsprotein (Swarup *et al.*, 2001) exprimieren, angefertigt. Der HA-Marker (Hemagglutinin) ist mit spezifischen Antikörpern immuncytochemisch detektierbar. Die Kreuzungsnachkommen werden zur Zeit untersucht.

Mögliche Interaktionspartner von PINOID können in Hefe-2-Hybrid-Analysen identifiziert werden. Anschließende *in vitro* Phosphorylierungsassays können Hinweise darauf ergeben, ob es sich um weitere Glieder der Signaltransduktionskette, die die Polarität von AtPIN-Proteinen reguliert, handeln könnte. Über die Kenntnis der wechselwirkenden Proteine kann möglicherweise auch die Funktion von PINOID im PAT besser verstanden werden.

5 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde das am polaren Auxintransport (PAT) beteiligte plasmamembranständige AtPIN1-Protein mit Homologie zu Transportproteinen aus *Arabidopsis thaliana* charakterisiert.

Zur Funktionsanalyse von AtPIN1 in *A. thaliana* wurden transgene Pflanzen hergestellt, die die *AtPIN1*-cDNA unter der Kontrolle des konstitutiven *CaMV35S*-Promotors transkribierten. Zur Überprüfung der Funktionalität der *AtPIN1*-cDNA wurde eine *pin1*-Suspensionskultur transformiert und daraus transgene Pflanzen, die in oberirdischen Pflanzenteilen ein Wildtyp-Erscheinungsbild aufwiesen, regeneriert. Des Weiteren wurden Pflanzen des Ökotyp Columbia transformiert. Homozygote Pflanzen wurden selektiert und die phänotypischen Veränderungen charakterisiert. Die Keimlinge zeigten ein stark gestörtes gravitropes Wurzelwachstum und eine erhöhte Dichte von Seitenwurzeln. Mittels Expression des *GUS*-Reportergens unter der Kontrolle des auxinsensitiven *DR5*-Promotorelements wurde die Auxinverteilung in Wurzelspitzen untersucht. Dabei wurde bei AtPIN1-überexprimierenden Keimlingen eine Verbreiterung des Auxinmaximums in der Wurzelspitze festgestellt. Dies und die beobachteten phänotypischen Veränderungen der Wurzel deuten auf eine Störung des PAT hin. In Western-Blot-Analysen auf Proteinextrakten aus Wurzeln korrelierte die Stärke der beobachteten phänotypischen Veränderungen mit der Menge an überexprimiertem AtPIN1. Die Expression wurde ebenfalls immunocytochemisch in Wurzelspitzen und in Sproßachsen nachgewiesen. Dabei lokalisierte ectopisch exprimiertes AtPIN1 vornehmlich am basalen Zellende, während ein anderes Protein der AtPIN-Familie -AtPIN2- in denselben Zellen am apikalen Ende lokalisierte, was eine proteinspezifische Translokation für AtPIN-Proteine anzeigt. In Sproßachsen von adulten Pflanzen wurde kein erhöhter Auxintransport gemessen, allerdings wurde eine konzentrationsabhängig niedrigere Sensitivität des Auxintransports gegenüber dem spezifischen Inhibitor NPA festgestellt.

Um eine höhere Expression in Pflanzen zu erreichen, wurde AtPIN1 unter der Kontrolle eines Glucocorticoid-induzierbaren Promotors in *A. thaliana* Ökotyp Columbia exprimiert. Eine stark induzierbare AtPIN1-Expression wurde in Western-Blot-Analysen gezeigt. Die Keimung unter Induktionsbedingungen war verlangsamt und später starben die Pflanzen. Bei zeitweiser Behandlung mit dem Glucocorticoid unter Gewächshausbedingungen trat bei

Hochblättern hyponastisches Blattwachstum auf, was ein Hinweis auf einen erhöhten Auxintransport in Blättern ist.

Zum Nachweis einer möglichen Funktion als katalytische Komponente des Auxinefflux-Carriers wurde AtPIN1 in *S. cerevisiae* und *Xenopus* Oozyten exprimiert und die Retention bzw. der Efflux von Tritium-markiertem Auxin gemessen. AtPIN1 zeigte in beiden Systemen keine Auxintransport-Aktivität.

Um eine Beteiligung von AtPIN1 am Auxinefflux untersuchen zu können, wurde aus induzierbar AtPIN1-überexprimierenden Pflanzen eine Suspensionskultur angelegt. Hier wurde zum ersten mal die Verwendbarkeit von *A. thaliana*-Suspensionskulturen für Auxinefflux-Messungen gezeigt. In Kompletionsanalysen mit Tritium-markiertem Auxin wurde in AtPIN1-Suspensionskulturen ein erhöhter Auxinefflux festgestellt. Mit dem reduzierten polaren Auxintransport in Sproßachsen von *pin1*-Mutanten ist dies ein weiterer transportphysiologischer Hinweis, daß AtPIN1 am Auxintransport beteiligt ist. Durch AtPIN1-Überexpression wurde, genauso wie in Sproßachsen, eine konzentrationsabhängig niedrigere Sensitivität der Inhibierbarkeit des Auxinefflux durch den spezifischen Inhibitor NPA bewirkt. Dies deutet auf eine regulatorische Funktion von AtPIN1 im PAT hin.

Um mögliche Interaktionen zwischen AtPIN1 und der Serin/Threonin-Kinase PINOID (PID) aufzuklären, wurde immunocytochemisch die AtPIN1-Lokalisierung in Stengelstücken von PID überexprimierenden Pflanzen und *pid*-Mutanten untersucht. In PID-überexprimierenden Pflanzen wurde eine Umkehrung der intrazellulären AtPIN1-Lokalisierung festgestellt, wobei der PAT in Sproßachsen unverändert war. In *pid*-Mutanten wurde keine veränderte AtPIN1-Lokalisierung festgestellt. In Wurzelspitzen wurde immunocytochemisch neben AtPIN1 auch die Lokalisierung von AtPIN2 und AtPIN4 untersucht. In Zelltypen, in denen AtPIN-Proteine im Wildtyp am apikalen Zellende lokalisiert sind, wurde in PID-überexprimierenden Pflanzen ebenfalls eine Umkehrung der intrazellulären Lokalisierung aller 3 Proteine beobachtet. Dagegen wurde bei im Wildtyp basal lokalisiertem AtPIN2 keine Änderung der intrazellulären AtPIN2-Lokalisierung in PID-überexprimierenden Pflanzen beobachtet. Hiermit wurde zum ersten mal in Pflanzen der Hinweise erbracht, daß, ähnlich wie bei Tieren, das polare *sorting* von Membranproteinen selektiv durch Kinasen beeinflußt wird. Bislang ist die Funktion der PID-Kinase unbekannt. Die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse zeigen, daß PID an der Translokation von Proteinen beteiligt ist.

Die Umkehrung der intrazellulären AtPIN1-Lokalisierung bei PID-überexprimierenden Pflanzen, in Geweben des Stengels wo PAT stattfindet, ohne den PAT zu verändern, widerspricht der bisher vermuteten Funktion von AtPIN1 als katalytische Untereinheit des AEC. Die phänotypischen Veränderungen in AtPIN1-überexprimierenden Pflanzen sowie die Auxintransport-Untersuchungen in Pflanzen und Suspensionskulturen deuten auf eine Funktion von AtPIN1 als positiven Regulator des Auxinefflux hin.

6 Literatur

- Abel, S. und Theologis, A. (1996) Early genes and auxin action. *Plant Physiol.*, **111**, 9-17.
- Aloni, R. (1987) Differentiation of vascular tissues. *Annu. Rev. Plant. Physiol.* **38**, 179-204.
- Aloni, R. (1995) The induction of vascular tissues by auxin and cytokinin. In: *Plant Hormones, Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*. (Davies, P.J., ed.). Martinus Nijhoff Publishers, Kluwer Academic Publishers Group, Dordrecht. 531-546.
- Aoyama, T. und Chua, N.-H. (1997) A glucocorticoid-mediated transcriptional induction system in transgenic plants. *The Plant Journal*, **11**(3), 605-612.
- Bhalerao, R.P., Eklöf, J., Ljung, K., Marchant, A., Bennett, M. und Sandberg, G. (2002) Shoot derived auxin is essential for early lateral root emergence. *Plant Journal*, **29**(3), 325-332.
- Bandurski, R. S., Cohen, J. D., Slovin, J. P. und Reinecke, D. M. (1995) Auxin biosynthesis and metabolism. Davies, P. J.: Ed. *Plant hormones: Physiology, biochemistry and molecular biology*, 2nd edition, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 39-65.
- Barlier, I., Kowalczyk, M., Marchant, A., Ljung, K., Bhalerao, R., Bennett, M., Sandberg, G., Bellini, C. (2000) The *SUR2* gene of *Arabidopsis thaliana* encodes the cytochrome P450 CYP83B1, a modulator of auxin homeostasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **97**, 14819-24.
- Bartel, B. und Fink G.R. (1994) Differential regulation of an auxin-producing nitrilase gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 6649-6653.
- Bartel, B. (1997) Auxin biosynthesis. Jones, R. L.: Ed. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **48**, 51-66.
- Becker, D., Kemper, E., Schell, J. und Materson, R. (1992) New plant binary vectors with selectable markeres located proximal to the left T-DNA border. *Plant Molecular Biology*, **20**, 1195-1197.
- Benjamins, R., Quint, A., Weijers, D., Hooykaas, P. und Offringa, R. (2001) The PINOID protein kinase regulates organ development in *Arabidopsis* by enhancing polar auxin transport. *Development*, **128**, 4057-4067.
- Bennett, M. J., Marchant, A., Green, H. G., May, S. T., Ward, S. P., Millner, P. A., Walker, A. R., Schulz, B. und Feldmann, K. A. (1996) *Arabidopsis AUX1* gene: a permease-like regulator of root gravitropism. *Science*, **273**, 948-50.
- Bennett, S.R.M, Alvarez, J, Bossinger, G. und Smyth, D.R. (1995) Morphogenesis in *pinoid* mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal*, **8**(4), 505-520.
- Benning, C. (1986) Evidence supporting a model of voltage-dependent uptake of auxin into *Cucurbita-pepo* vesicles. *Planta*, **169**, 228-237.

- Bensadoun, A. und Weinstein, D. (1976) Assay of proteins in the presence of interfering materials. *Anal. Biochem.*, **70**, 241- 250.
- Berleth, T. und G. Jürgens (1993) The role of the *Monopteros* gene in organising the basal body region of the *Arabidopsis* embryo. *Development* **118**(2): 575-587.
- Blake, M. S., Johnston, K. H., Russel-Jones, G. J. und Gotschlich, E. C. (1984) A rapid, sensitive method for detection of alkaline phosphatase-conjugated anti-antibody on Western blots. *Anal. Biochem.*, **136**, 175-179.
- Bonner, J. (1933) The action of the plant growth hormone. *J. Gen. Physiol.*, **63**, 63-76.
- Bourdon V., Harvey, A. und Lonsdale, D.M. (2001) Introns and their positions affect the translational activity of mRNA in plant cells. *EMBO reports*, **2**(5), 394-398.
- Brown, D. E., Rashotte, A. M., Murphy, A. S., Normanly, J., Tague, B. W., Peer, W. A., Taiz, L. und Muday, G. (2001) Flavonoids act as negativ regulators of auxin transport *in vivo* in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, **126**, 524-535.
- Cambridge, A. P. and D. A. Morris (1996) Transfer of exogenous auxin from the phloem to the polar auxin transport pathway in pea (*Pisum sativum L.*). *Planta*, **199**(4), 583-588.
- Carland, F. M. and N. A. McHale (1996). LOP1: A gene involved in auxin transport and vascular patterning in *Arabidopsis*. *Development*, **122**(6), 1811-1819.
- Cande, W. Z. und Ray, P. M. (1976) Nature of cell-to-cell transfer of auxin in polar transport. *Planta*, **129**, 43-5.
- Casimiro, I., Marchant, A., Bhalerao, R.P., Beeckman, T., Dhooge, S., Swarup, R., Graham, N., Inze, D., Sandberg, G., Casero, P.J., Bennett, M. (2001) Auxin transport promotes arabidopsis lateral root initiation. *Plant Cell*, **13**, 843-52.
- Chen, J.-G., Ullah, H., Im, K.-H., Young, J. C. und Jones A. M. (2000) *Arabidopsis* auxin-binding protein 1 gene knockout is embryo lethal. P-4.1, *EMBO Workshop on Auxin*, France.
- Chen, R., Hilson, P., Sedbrook, J., Rosen, E., Caspar, T. und Masson, P.H. (1998) The *Arabidopsis thaliana* AGR1 gene encodes a component of the polar-auxin-transport efflux carrier. *PNAS*, **95**, 15112-15117.
- Christensen, S.K., Dagenais, N., Chory, J. und Weigel, D. (2000) Regulation of Auxin Response by the Protein Kinase PINOID. *Cell*, **100**, 469-478.
- Cleland R. E. (1995) Auxin and cell elongation. Davies, P. J.: Ed. *Plant hormones: Physiology, biochemistry and molecular biology, 2nd edition*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 214-227.
- Cnops, G., den Boer, B., Gerats A., Van Montagu, M. und Van Lijsebettens, M. (1996) Chromosome landing at the *Arabidopsis TORNADO1* locus using an AFLP-based strategy. *Mol. Gen. Genet.*, **253**, 32-41.

- Cohen, J. D. und Bandurski, R. S. (1982) Chemistry and biology of the bound auxins. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, **33**, 403-430.
- Colon-Carmona, A., Chen, D.L., Yeh K.C. und Abel, S. (2000) Aux/IAA proteins are phosphorylated by phytochrome *in vitro*. *Plant Physiology*, **124**, 1728-1738.
- Darwin, C. und Darwin, F. (1881) *The power of movements in plants. Darwins gesammelte Werke Bd. 13*, Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung, Stuttgart.
- Davies P. J. (1995) The plant hormones: Their nature, occurrence, and functions. Davies, P. J.: Ed. *Plant hormones: Physiology, biochemistry and molecular biology, 2nd edition*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1-12.
- Davies, P. J., Doro, A. und Tarbox, A. W. (1976) The movement and physiological effect of indoleacetic acid following point applications to root tips of *Zea mays*. *Physiol. Plant.*, **36**, 333-337.
- Delbarre A., Müller P., Imhoff V., Guern J. (1996) Comparison of mechanisms controlling uptake and accumulation of 2,4D dichlorophenoxy acetic acid, naphthalene-1-acetic acid and indole-3-acetic acid in suspension-cultured tobacco cells. *Planta*, **198**, 532-541.
- Delbarre, A., Muller, P. und Guern, J. (1998) Short-lived and phosphorylated proteins contribute to carrier-mediated efflux, but not to influx, of Auxin in suspension-cultured Tobacco cells. *Plant Physiology*, **116**, 833-844.
- DeLong, A., Mockaitis, K. und Christensen, S. (2002) Protein phosphorylation in the delivery and response to auxin signals. *Plant Molecular Biology*, **49**, 285-303.
- del Pozo, J. C., Timpte, C., Tan, S., Callis, J. und Estelle, M. (1998) The ubiquitin-related protein RUB1 and auxin response in *Arabidopsis*. *Science*, **280**, 1760-1763.
- Dibb-Fuller, J. E. and D. A. Morris (1992) Studies on the evolution of auxin carriers and phytochrome receptors transmembrane auxin transport in unicellular and multicellular chlorophyta. *Planta*, **186**(2), 219-226.
- Epel, B. L., Warmbrodt, R. P. und Bandurski, R. S. (1992) Studies on the longitudinal and lateral transport of IAA in the shoots of etiolated corn seedlings. *J. Plant Physiol.*, **140**, 310-318.
- Evans, M. L. und Ishikawa, H. (1997) Cellular specificity of gravitropic motor response in roots. *Planta*, **203**, 115-122.
- Feldwisch, J.; Zettl. R.; Hesse F. ; Schell, J.& Palme, K. (1992): An auxin-binding protein is localized to the plasma membrane of maize coleoptile cells: identification by photoaffinity labeling and purification of a 23-kDa polypeptide. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **89**, 475-479.
- Feldwisch, J.; Vente, A.; Zettl, R.; Bako, L.; Campos, N. & Palme K. (1994): Charakterisation of two membrane-associated β -glucosidases from maize (*Zea mays* L.) coleoptiles. *Biochem. J.* **302**, 15-21.

- Friml, J. (2000) Isolation and characterisation of novel *AtPIN*-genes from *A.thaliana* L. *Doktorarbeit*, Universität zu Köln.
- Friml, J., Wisniewska J., Benkova, E., Mendgen, K. und Palme K. (2002a) Lateral relocation of auxin efflux regulator PIN3 mediates tropism in *Arabidopsis*. *Nature*, **415**, 806-809.
- Friml, J., Benkova, E., Ikram, Blilou, I., Wisniewska J., Hamann, T., Ljung, K., Wood, S., Sandberg, G., Scheres, B. und Palme K. (2002b) AtPIN4 mediates sink-driven gradients and root patterning in *Arabidopsis*. *Cell*, **108**, 661-673.
- Friml, J. und Palme, K. (2002) Polar auxin transport – old questions and new concepts ? *Plant Mol. Biol.* **49**, 273-284.
- Frommer, W.B. und Ninnemann, O. (1995) Heterologous expression of genes in bacterial, fungal, animal and plant cells. *Annu. Rev. Plant. Mol. Biol.*, **46**, 419-44.
- Gälweiler, L., Guan, C., Müller, A., Wisman, E., Mendgen, K., Yephremov, A. und Palme, K. (1998) Regulation of polar auxin transport by AtPIN1 in *Arabidopsis* vascular tissue. *Science*, **282**, 2226-2230.
- Gälweiler, L. (1999) Isolierung und Charakterisierung des *PIN1*-Gens von *Arabidopsis thaliana* L.. *Doktorarbeit*, Universität Hohenheim.
- Geldner, N., Friml, J., Stierhof, Y.D., Jürgens, G. und Palme, K., (2001) Auxin transport inhibitors block PIN1 cycling and vesicle trafficking. *Nature*, **413**, 425-428.
- Gil, P., Dewey, E., Friml, J., Zhao, Y., Snowden, K.C., Putterill, J., Palme, K., Estelle, M. und Chory, J.(2001) BIG: A calossin-like protein required for polar auxin transport in *Arabidopsis*. *Genes and Development*, **15**, 1985-1997.
- Goldsmith, M. H. M. (1977) The polar transport of auxin. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, **28**, 439-478.
- Goto, N. und Starke, M. (1987) Effect of gibberellins on flower development of the Pin-formed mutant of *Arabidopsis thaliana*. *Arabidopsis Information Service* **23**: 66-71.
- Griffing, B. und Scholl, R.L. (1991) Qualitative and quantitative genetic studies of *Arabidopsis thaliana*. *Genetics*, **129**, 605-609.
- Hager, A., Debus, G., Edel, H. G., Stransky, H. und Serrano, R. (1991) Auxin induces exocytosis and the rapid synthesis of a high-turnover pool of plasma-membrane proton ATPase. *Planta*, **185**, 527-537.
- Hardtke, C.S. und Berleth, T. (1998) The *Arabidopsis* gene *MONOPTEROS* encodes a transcription factor mediating embryo axis formation and vascular development. *EMBO J.*, **17**, 1405-1411.
- Hayes, A.B. (1981) The interaction of auxin and ethylen in the maintenance of leaf blade form in *Phaseolus vulgaris* L. var. Pinto. *American Journal of Botany*, **68**, 733-740.

- Hayes, A.B. und Lippincott, J.A. (1976) Growth and gravitational response in the development of leaf blade hyponasty. *American Journal of Botany*, **63**, 383-387.
- Hertel, R. (1983) The mechanisms of auxin transport as a model for auxin action. *Z. Pflanzenphysiol.* **112**, 53-67.
- Hertel, R., Lomax, T. L. und Briggs, W. R. (1983) Auxin transport in membrane vesicles from *Curcubita pepo* L., *Planta*, **157**, 757-759.
- Hesse, T., Feldwisch, J., Balshuesemann, D., Bauw, G., Puype, M., Vandekerckhove, J., Löbner, M., Klämbt, D., Schell, J. und Palme, K. (1989) Molecular cloning and structural analysis of a gene from *Zea mays* L. coding for a putative receptor for the plant hormone auxin. *EMBO J.*, **8**, 2453-2462.
- Holmes, D. S. und Quigley, M. (1981) A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal. Biochem.*, **114**, 193-197.
- Jacobs, M. und Rubery, P. H. (1988) Naturally Occurring Auxin Transport Regulators. *Science*, **241**, 346-349.
- Jacobs, W.P. (1952) The role of auxin in differentiation of xylem around a wound. *Am. J. Bot.*, **39**, 301-309.
- Kang, H.-G., Fang, Y. und Singh, K.B. (1999) A glucocorticoid-inducible system causes severe growth defects in Arabidopsis and induces defense-related genes. *The Plant Journal*, **20**(1), 127-133.
- Keller, P. und Simons, K. (1998) Post-Golgi biosynthetic trafficking. *Journal of Cell Science*, **110**, 3001-3009.
- Klee, H.J., Horsch, R.B., Hinchee, M.A., Hein, M.B., Hoffmann, N.L. (1987) The effects of overproduction of two *Agrobacterium tumefaciens* T-DNA auxin biosynthetic gene products in transgenic petunia plants. *Genes Dev.*, **1**, 86-96.
- Kögl, F. und Kostermans, D. G. F. R. (1934) Hetero-Auxin als Stoffwechselprodukt niederer pflanzlicher Organismen. *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.* 113-121.
- Koncz, C., und Shell, J. (1986) The promotor of TL DNA gene 5 encodes controls the tissue specific expression of chimeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. *Mol.Gen.Genet.*, **204**, 386-396.
- Konings, H. (1995) Gravitropism of roots: an evaluation progress during the last three decades. *Acta. Bot. Neerl.*, **44**, 195-223.
- Kutschera, U. (1994) Tansley Review No. 66: The current status of the acid-growth hypothesis. *New Phytologist*, **126**, 549-569.
- Laemmli, U. K., (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.

- Lalonde, S., Boles, E., Hellmann, H., Barker, L., Patrick, J.W., Frommer, W.B. und Ward, J. (1999) The dual function of sugar carriers: transport and sugar sensing. *Plant Cell*, **11**, 707-726.
- Lembi, C. A., Morre, D. J., Thompson, K.-S. und Hertel, R. (1971) N-1-Naphthylphthalamic-acid-binding activity of plasma membrane-rich fraction from maize coleoptiles. *Planta*, **99**, 37-45.
- Leyser, H. M. O., Lincoln Cynthia, A., Timpte, C., Lammer, D., Turner, J. und Estelle, M. (1993) Arabidopsis auxin-resistance gene *AXRI* encodes a protein related to ubiquitin-activating enzyme E1. *Nature*, **364**, 161-164.
- Li, Y., Hagen, G., Guilfoyle, T.J. (1991) An auxin-responsive promoter is differentially induced by auxin gradients during tropisms. *Plant Cell* **3**, 1167-1176.
- Libenga, K.R. und Mennes, A.M. (1995) Hormone binding and signal transduction. In: *Plant hormones, physiology, biochemistry an molecular biology* (Davies, P.J., ed.) Martinus Nijhoff Publishers, Kluwer Academic Publishers Group, Dordrecht, 272-297.
- Liu, C. M. und Xu, Z. H und Chua, N.H. (1993) Auxin polar transport is essential for the establishment of bilateral symmetry during early plant embryogenesis. *Plant Cell* **5**(6): 621-630.
- Ljung, K., Rishikesh, B.P. und Sandberg, G. (2001) Site and homeostatic control of auxin biosynthesis in *Arabidopsis* during vegetative growth. *Plant Journal*, **28**(4), 465-474.
- Lomax, T. L., Muday G. K. und Rubery, P. H. (1995) Auxin transport. Davies, P. J.: Ed. *Plant hormones: Physiology, biochemistry and molecular biology*, 2nd edition, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 509-530.
- Lyndon, R.F. (1990) Plant Development. The Cellular Basis. Boston, MA. *Unwin Hyman*.
- Malamy, J.E., Benfey, P.N. (1997). Organization and cell differentiation in lateral roots of *Arabidopsis thaliana*. *Development*, **124**, 33-44.
- Macdonald, H. (1997) Auxin perception and signal transduction. *Physiol. Plant.*, **100**, 423-430.
- Marchant, A., Kargul, J., May, S.T., Muller, P., Delbarre, A., Perrot-Rechenmann, C. und Bennet, M. (1999) AUX1 regulates root gravitropism in Arabidopsis by facilitating auxin uptake within apical tissues. *The EMBO Journal*, **18**(8), 2066-2073.
- Marchant, A., Bhalerao, R., Casimiro, I., Eklöf, J., Casero, P.J., Bennett, M. und Sandberg, G. (2002) AUX1 promotes lateral root formation by facilitating Indole-3-Acetic Acid distribution between sink and source tissues in the *Arabidopsis* seedling. *The Plant Cell*, **14**, 589-597.
- Marten, I., Lohse, G. und Hedrich, R. (1991) Plant growth hormones control voltage-dependent activity of anion channels in plasma membrane of guard cells. *Nature*, **353**, 758-762.

- McNellis, T.W., Mudgett, M.B., Li, K., Aoyama, T., Horvath, D., Chua, N.-H. und Staskawicz, B.J. (1998) Glucocortical expression of a bacterial avirulence gene in transgenic *Arabidopsis* induces hypersensitive cell death. *The Plant Journal*, **14**(2), 247-257.
- Meyer, A. und Saedler, H. (1996) Homology-dependent silencing. *Annu. Rev. Plant. Phys. Plant. Mol. Bio.*, **47**, 24-48.
- Moore, I., Gälweiler, L., Grosskopf, D., Schell, J. und Palme, K. (1998) A transcription activation system for regulated gene expression in transgenic plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 376-381.
- Morris, D.A. und Thomas, F. (1978) A microautoradiographic study of auxin transport in the stem of intact pea seedlings. *J. Exp. Bot.*, **29**, 147-157.
- Morris, D.A. und Johnson, C.F. (1990) The role of auxin-efflux-carriers in the reversible loss of polar auxin transport in the pea stem. *Planta*, **181**, 117-124.
- Morris, D. A., Rubery, P. H., Jarman, J. und Sabater, M. (1991) Effects of inhibitors of protein synthesis on transmembrane auxin transport in *Cucurbita pepo* L. hypocotyl segments. *J. Exp. Bot.*, **42**, 773-784.
- Mostov, K.E. und Cardone, M.H. (1995) Regulation of protein traffic in polarized epithelial cells. *BioEssays*, **17**, 129-138.
- Muday, G. K. and P. Haworth (1994) Tomato root growth, gravitropism, and lateral development: Correlation with auxin transport. *Plant Physiology and Biochemistry* **32**(2): 193-203.
- Muday, G. K. (2002) An emerging model of auxin transport regulation. *The Plant Cell*, **14**, 293-299.
- Müller, A., Guan, C., Gälweiler, L., Tänzler, P., Huijser, P., Marchant, A., Parry, G., Bennett, M., Wisman, E. und Palme, K. (1998) AtPIN2 defines a locus of *Arabidopsis* for root gravitropism control. *EMBO J.*, **17**, 6903-6911.
- Neuhoff, V., Stamm, R. und Eibl, H.J. (1985) Clear background and high sensitive protein staining with Coomassie Blue dyes in polyacrylamide gels: a systematic analysis. *Electrophoresis*, **6**, 427-448.
- Noh, B., Murphy, A.S. Spalding, E.P. (2001) Multidrug resistance-like genes of *Arabidopsis* required for auxin transport and auxin-mediated development. *Plant Cell*, **13**, 2441-2454.
- Normanley, J., Cohen, J.D., Fink, G.R. (1991) *Arabidopsis thaliana* auxotrophs reveal a tryptophan-independent biosynthetic pathway for indole-3-acetic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **90**, 10355-10359.
- Nowacki, J., Bandurski, R.S. (1980) Myo-inositol esters of indole-3-acetic acid as seed auxin precursors of *Zea mays* L. *Plant Physiol.* **65**, 422-427.

- Ohwaki, Y. und Tsurumi, S. (1976) Auxin transport and growth in intact roots of *vicia faba*. *Plant Cell Physiol.*, **17**, 1329-1342.
- Okada, K., Ueda, J., Komaki, M. K., Bell, C. J. und Shimura, Y. (1991) Requirement of the auxin polar transport system in early stages of *Arabidopsis* floral bud formation. *Plant Cell*, **3**, 677-684.
- Ottenschläger, I. (2002) Gravity induced differential transport in *A. thaliana* roots and the search for interaction partners of AtPIN1. Doktorarbeit. *Universität zu Köln*.
- Ouellet, F., Overvoorde, P.J. und Theologis, A. (2001) IAA17/AXR3: biochemical insight into an auxin mutant phenotype. *Plant Cell*, **13**, 829-842.
- Palme, K. und Gälweiler, L. (1999) PIN-pointing the molecular basis of auxin transport. *Current Opinion in Plant Biology*, **2**, 375-381.
- Palme, K., Hesse, T., Campos, N., Garbers, C., Yanofsky, M. F. und Schell, J. (1992) Molecular analysis of an auxin binding protein gene located on chromosome 4 of *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **4**, 193-201.
- Palme, K. (1993) From binding proteins to hormone receptors? *J. Plant Growth Reg.* **12**, 171-178.
- Pao, S., Paulsen I., and Saier M.H. Jr. (1998) Major Facilitator Superfamily. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **62**, 1-34.
- Parry, G., Delbarre, A., Marchant, A., Swarup, R., Napier, R., Perrot-Rechenmann, C. und Bennet, M. (2001). Novel auxin inhibitors phenocopy the auxin influx mutation *aux1*. *Plant Journal*, **25**, 399-406.
- Pelham, H. R. B. (1988) Evidence that luminal ER proteins are sorted from secreted proteins in a post-ER compartment. *EMBO J.*, **7**, 913-918.
- Phizicky, E. M. und Fields, S. (1995) Protein-protein interactions: Methods for detection and analysis. *Microbiol. Rev.*, **59**, 94-123.
- Przemeck, G. K. H., J. Mattsson, et al. (1996) Studies on the role of the *Arabidopsis* gene *Monopteros* in vascular development and plant cell axialization. *Planta* **200**(2): 229-237.
- Rashotte, A.M., Brady, S. R., Reed, R. C., Ante, S. J. und Muday, G. K. (2000) Basipetal auxin transport is required for gravitropism in roots of *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, **122**, 481-490.
- Rashotte, A.M., DeLong, A. und Muday, G. K. (2001) Genetic and chemical reductions in protein phosphatase activity alter auxin transport, gravity response and lateral root growth. *Plant Cell*, **13**, 1683-1697.
- Ratcliff, O.J., Riechmann, J.L. und Zhang, J.Z. (2000) *IFL1* is the same gene as *REVOLUTA*. *Plant Cell*, **12**, 315-317.

- Ray, P. M. (1977) Specificity of auxin-binding sites on maize coleoptile membranes as possible receptor sites of auxin action. *Plant Physiol.*, **60**, 585.
- Ray, P. M. und Dohrmann U. (1977) Characterization of naphthaleneacetic acid binding to receptor sites on cellular membranes of maize coleoptile Tissue. *Plant Physiol.*, **59**, 357-364.
- Reed, C.R., Brady S.R., Muday G.K. (1998). Inhibition of auxin movement from shoot into the root inhibits lateral root development in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.*, **118**, 1369-1378.
- Reinhardt, D., Mandel, T., Kuhlemeier, C. (2000) Auxin regulates the initiation and radial position of plant lateral organs. *Plant Cell*, **12**, 507-18.
- Rubery, P.H. und Sheldrake, A.R. (1974) Carrier-mediated auxin transport. *Planta*, **118**, 101-121.
- Rubery, P. H. (1987) Auxin Transport. Davies, P. J.: Ed. *Plant hormones and their role in plant growth and development*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 90-247.
- Ruegger, M., Dewey, E., Hobbie, L., Brown, D., Bernasconi, P., Turner, J., Muday, G. und Estelle, M. (1997) Reduced naphthylphthalamic acid binding in the *tir3* mutant of *Arabidopsis* is associated with a reduction in polar auxin transport and diverse morphological defects. *Plant Cell*, **9**, 745-757.
- Ruegger, M., Dewey, E., Gray, W.M., Hobbie, L., Turner, J., Estelle, M. (1998) The TIR1 protein of *Arabidopsis* functions in auxin response and is related to human SKP2 and yeast *grr1p*. *Genes Dev.*, **12**, 198-207.
- Sabatini, S., Beis, D., Wolkenfelt, H., Murfett, J., Guilfoyle, T., Malamy, J., Benfey, P., Leyser, O., Bechtold, N., Weisbeek, P., Scheres, B. (1999) An auxin-dependent distal organizer of pattern and polarity in the *Arabidopsis* root. *Cell*, **99**, 463-472.
- Sachs, T. (1968) The role of root in the induction of xylem differentiation in pea. *Ann. Bot.* **32**, 391-399
- Sachs, T. (1981) The control of patterned differentiation of vascular tissue. *Adv. Bot. Res.*, **9**, 152-255.
- Sachs, T. (1991) Pattern Formation in plant tissues. *Cambridge University Press*, Cambridge.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T. Mullis, K. B. und Erlich, H. A. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, **239**, 487-491.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. und Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning – a laboratory manual*. Cold Spring Harbour Press, New York.
- Sanger, F., Nicklen, S. und Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 5463-5467.

- Santoni, V., Vansuyt, G. und Rossignol, M. (1990) Differential auxin sensitivity of proton translocation by plasma membrane proton-ATPase from tobacco leaves. *Plant Sci.*, **68**, 33-38.
- Sieberer, T., Seifert, G.J., Hauser M.T., Grisafi, P., Fink G.R. und Luschnig, C. (2000) Post-transcriptional control of the *Arabidopsis* auxin efflux carrier EIR1 requires AXR1. *Current Biology*, **10**, 1595-1598.
- Sijen, T. und Kooter, J.M. (2000) Post-transcriptional gene-silencing: RNAs on the attack or on the defense ? *BioEssays*, **22**, 520-531.
- Simons, K. und Ikonen, E. (1997) Functional rafts in cell membranes. *Nature*, **387**, 569-572.
- Simons, M, Ikonen, P., Tienari, A., Cid-Arregui, K., Mönning, K., Beyreuther, C. und Dotti, G. (1995) The intracellular routing for human APP: axonal delivery followed by transport to the dendrites. *Journal of Neuroscience Research*, **41**, 121-128.
- Sitbon, F., Hennion, S., Sundberg, B., Little, C.H.A., Olsson, O und Sandberg, G. (1992) Transgenic tobacco plants co-expressing the *Agrobacterium tumefaciens* *iaaM* and *iaaH* genes display altered growth and indolacetic acid metabolism. *Plant Physiology*, **99**, 1062-1069.
- Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J. und Klenk, D. C. (1985) Measurement of protein using bicinchoninic-acid. *Anal. Biochem.*, **150**, 76-85.
- Steinmann, T., Geldner, N., Grebe, M., Mangold, S., Jackson, C.L., Paris, S., Gälweiler, L., Palme, K. und Jürgens, G. (1999) Coordinated polar localisation of auxin efflux carrier PIN1 by GNOM ARF GEF. *Science*, **286**, 316-318.
- Steffens, B., Feckler, C., Palme, K., Christian, M., Böttger, M. und Lüthen, H. (2000) The auxin signal for protoplast swelling is perceived by extracellular ABP1. *Plant Journal*, **13**, 247-258.
- Stiefel, V., Lopez, E., Roca, R., Bastida, M., Jahrman, T. Graziano, E. und Puigdomenech, P. (1999) TM20, a gene coding for a new class of transmembrane proteins expressed in the meristematic tissues of Maize. *Journal of Biological Chemistry*, **274**(39), 27734-27739.
- Swarup, R., Friml, J., Marchant, A., Ljung, K., Sandberg, G., Palme K. und Bennett, M. (2001) Localisation of the auxin permease AUX1 suggests two functionally distinct hormone transport pathways operate in *Arabidopsis* root apex. *Genes and Development*, **15**, 2648-2653.
- Sze, H., Li, X. und Palmgren, M. G. (1999) Energization of plant cell membranes by H⁺-pumping ATPases: regulation and biosynthesis. *Plant Cell*, **11**, 677-689.
- Thiel, G., Blatt, M. R., Fricker, M. D., White, I. R. und Millner, P. (1993) Modulation of K⁺ channels in *Vicia* stomatal guard cells by peptide homologs to the auxin-binding protein C terminus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 11493-11497.

- Tietz, O. (1997) Untersuchungen zur Identifizierung und Charakterisierung von Komponenten des pflanzlichen Auxintransportsystems, *Diplomarbeit*, Universität zu Köln.
- Towbin, H., Staehelin, T. und Gordon, J. (1979) Electrophoretical transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 4350-4354.
- Trewavas, A.J. (1992) What remains of the Cholodny-Went theory ? *Plant Cell Environment*, **15**, 759-794.
- Tsurumi, S. und Ohwaki, Y. (1978) Transport of ¹⁴C-labeled indoleacetic acid in *Vicia* root segments. *Plant Cell Physiol.*, **19**, 1195-1206.
- Ulmasov, T., Hagen, G. und Guilfoyle, T. J. (1997a) ARF1, a transcription factor that binds to auxin response elements. *Science*, **276**, 1865-1868.
- Ulmasov, T., Murfett, J., Hagen, G. und Guilfoyle Tom, J. (1997b) Aux/IAA proteins repress expression of reporter genes containing natural and highly active synthetic auxin response elements. *Plant Cell*, **9**, 1963-1971.
- Uggla, C., Moritz, T., Sandberg, G. und Sundberg, B. (1996) Auxin as a positional Signal in pattern formation in plants. *PNAS*, **93**, 9282-9286.
- Vaucheret, H., Nussaume, L., Paluqui, J.C., Quillere, I. und Elmayan, T. (1997) Atranscriptional active state is required for post-transcriptional silencing (co-suppression) of nitrate reductase host genes and transgenes. *Plant Cell*, **9**, 1495-1504.
- Vaucheret, H., Becli, C., Elmayan, T., Feuerbach, F., Godon, C., Morel, J.B., Mourrain, P., Paluqui, J.C. und Vernhettes, S. (1998) Transgene-induced gene silencing in plants. *Plant Journal*, **16**(6), 651-659.
- Venis, M. A., Thomas, E. W., Barbier Brygoo, H., Ephritikhine, G. und Guern, J. (1990) Impermeant Auxin Analogues Have Auxin Activity. *Planta*, **182**, 232-235.
- Venis, M. A., Napier, R. M., Barbier Brygoo, H., Maurel, C., Perrot Rechenmann, C. und Guern, J. (1992) Antibodies to a peptide from the maize auxin-binding protein have auxin agonist activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 7208-7212.
- Venis, A. M. und Napier, R. M. (1995), Auxin receptors and auxin binding proteins. *Crit. Rev. Plant Sci.*, **14**, 27-47.
- Vesper, M. J. und Kuss, C. L. (1990) Physiological evidence that the primary site of auxin action in maize coleoptiles is an intracellular site. *Planta*, **182**, 486-491.
- Vernoux, T., Kronenberger, J., Grandjean, O., Laufs, P. und Trass, J. (2000) PIN-Formed 1 regulates cell fate at the periphery of the shoot apical meristem. *Development*, **127**, 5157-5165.
- Went, F. W. (1928) Wuchsstoff und Wachstum. *Rec. Trav. Bot. Néerl.*, **25**, 1-116.

- Went, F. W. und Thiemann, K. V. (1937) *Phytohormones*. New York, McMillan.
- Went, F.W. (1974) Reflectations and speculations. *Annu. Rev. Plant Phys.*, **25**, 1-26.
- Woo, E.-J., Marshall, J., Baulry, J., Chen, G.-J., Venis, M, Napier, R.M. und Pickersgill, R.W.(2002) Crystal structure of auxin-binding protein 1 in complex with auxin. *EMBO*, **21**(12), 2877-2885.
- Yang, S.F. und Hoffmann, N.E. (1984) Ethylene Biosynthesis and its regulation in higher plants. *Annual Reviews Plant Physiology*, **35**, 155-189.
- Yanish-Perron, C., Viera, J., Messing, J. (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: Nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene*, **33**, 103-119.
- Young, L.M., Evans, M.L. und Hertel, R. (1990) Correlations between gravitropic curvature and auxin movement across gravistimulated roots of *Zea mays*. *Plant Physiology*, **92**, 792-796.
- Zhong, R., Taylor, J.J. und Ye, Z.H. (1997) Disruption of interfascicular fiber differentiation in an *Arabidopsis* mutant. *Plant Cell*, **9**, 2159-2170.
- Zhong, R. und Ye, Z.H. (1999) IFL1, a gene regulating interfascicular fiber differentiation in *Arabidopsis*, encodes a homeodomain-leucine zipper protein. *Plant Cell*, **11**, 2139-2152.
- Zhong, R. und Ye, Z.H. (2001) Alteration of auxin polar transport in the *Arabidopsis ifl1* mutants. *Plant Physiology*, **126**, 549-563.

Kurzzusammenfassung

Die *AtPIN1*-cDNA wurde unter der Kontrolle des CaMV35S-Promotors in *A. thaliana* exprimiert. In transgenen Pflanzen wurde in Western-Blot Analysen eine erhöhte AtPIN1-Menge in Wurzeln nachgewiesen. Immunocytochemisch wurde ectopisch exprimiertes AtPIN1 in Wurzelspitzen und Sproßachsen, genauso wie endogenes AtPIN1 polar, an basalen Zellenden nachgewiesen. Keimlinge von stark AtPIN1-überexprimierende Linien zeigten gravitrop gestörtes Wurzelwachstum und eine erhöhte Anzahl von Seitenwurzeln. Weiterhin wurde bei diesen Linien in Wurzelspitzen qualitativ eine verstärkte- und ectopische Aktivität des Auxin-sensitiven *DR5*-Promotorelements festgestellt. In Sproßachsen von AtPIN1-überexprimierenden Pflanzen wurde eine konzentrationsabhängig verringerte Sensitivität des polaren Auxintransports gegenüber dem spezifischen Inhibitor NPA gemessen. Weiterhin wurde AtPIN1 unter der Kontrolle eines Glucocorticoid-induzierbaren Promotors in *A. thaliana* exprimiert in Western-Blot-Analysen auf Blättern wurde eine induzierbare AtPIN1-Expression nachgewiesen. Mit Glucocorticoid behandelte Pflanzen zeigten hyponastisches Blattwachstum. Von diesen Pflanzen wurde eine Suspensionskultur angelegt und mittels Tritium-markiertem Auxin in Kompetitionsanalysen mit überschüssigem Auxin der saturierbare Auxinefflux gemessen, wobei die AtPIN1-überexprimierende Suspensionkultur einen erhöhten Efflux aufwies. Die Inhibierbarkeit durch NPA war durch AtPIN1-Überexpression in konzentrationsabhängiger Weise verringert. In Wurzelspitzen von *A. thaliana*, welche die Serin/Threonin-Kinase PINOID überexprimieren, wurde immunocytochemisch die Lokalisierung von AtPIN1, 2 und 4 untersucht. In polarisierten Zellen waren im Wildtyp apikal lokalisierte AtPIN-Proteine in diesen Pflanzen am basalen Zellende lokalisiert. In Sproßachsen wurde eine revertierte AtPIN1-Lokalisierung festgestellt, wobei der polare Auxintransport nicht verändert war.

Abstract

AtPIN1-cDNA was expressed under control of CaMV35S promoter in *A. thaliana*. An increased amount of AtPIN1 in roots of transgenic plants was detected by western-blot analysis. Ectopically expressed AtPIN1 was detected in immunolocalisation experiments in root tips and inflorescence axes, similar to endogenous AtPIN1, at the lower side of cells. Highly AtPIN1 overexpressing seedlings showed agravitropic root growth and an increased number of lateral roots. Furthermore an enhanced and ectopic activity of the auxin-inducible promoter *DR5* was observed in root tips of these seedlings. The polar auxin transport in inflorescence axes of AtPIN1 overexpressing plants showed a concentration dependent decreased sensitivity against the specific inhibitor NPA. Further on AtPIN1 was expressed under control of a Glucocorticoid inducible promoter. Inducible AtPIN1-expression in leaves was detected by western-blot analysis. Glucocorticoid treated plants showed hyponastic leaves. A suspension culture was prepared from these plants. Auxin-Efflux was measured in competition analysis with tritium labelled Auxin, whereby AtPIN1-overexpressing suspension culture had a larger saturable Auxin-Efflux. The sensitivity of Auxin-Efflux in AtPIN1 overexpressing suspension culture against NPA was reduced in a concentration dependent manner. In immunolocalisation studies in root tips of serine/threonine-kinase PINOID overexpressing *A. thaliana* the localisation of AtPIN1,2 and 4 was analysed. In wildtype plants at apical end of cell localised AtPIN-proteines showed in these plants a basal localisation. In inflorescence axes there was also a reverted localisation of AtPIN1 observed, whereby the polar auxin transport was not altered.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Olaf Tietz
Geburtsdatum: 29. November 1969
Geburtsort: Köln
Familienstand: ledig

Ausbildung

1976-1980: Bodelschwing Grundschule Hürth
1980-1989: Gymnasium Sudetenstraße Hürth, Abitur
1989-1990: Grundwehrdienst in der Bundesluftwaffe
1990-1997: Studium der Chemie an der Universität zu Köln
Abschluß: Diplom-Chemiker
März 1997 - Dez. 1997: Diplomarbeit am Max-Dellbrück-Laboratorium
der Max-Planck-Gesellschaft in Köln in der Arbeits-
gruppe von Herrn Prof Dr. Klaus Palme mit dem
Thema: "Untersuchungen zur Identifizierung und
Charakterisierung von Komponenten des pflanzlichen
Auxintransportsystems"
1998-2002: Promotionsstudium an der Universität zu Köln, betreut
von Frau PD Dr. Sabine Waffenschmidt am Institut für
Biochemie. Anfertigung der vorliegenden Dissertation am
Max-Dellbrück-Laboratorium in der Max-Planck-
Gesellschaft in Köln in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof.
Dr. Klaus Palme mit dem Thema: "Funktionelle
Charakterisierung des AtPIN1-Proteins aus
Arabidopsis thaliana"

Köln, den 14.8.2002

Ich versichere, daß ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit - einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen -, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; daß diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; daß sie - abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen - noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, daß ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluß des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt.

Die von mir vorgelegte Dissertation ist von PD Dr. S. Waffenschmidt betreut worden.

Es liegen keine Teilpublikationen vor.

Ich versichere, daß ich alle Angaben wahrheitsgemäß nach bestem Wissen und Gewissen gemacht habe und verpflichte mich, jedmögliche, die obigen Angaben betreffenden Veränderungen dem Dekanat unverzüglich mitzuteilen.

Köln, den 14.8.2002

(Olaf Tietz)

Danke

Hier möchte ich allen danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben

Herrn Prof. Dr. Klaus Palme danke ich für das interessante Thema und die exzellenten Arbeitsbedingungen. Sowohl seine wissenschaftliche Anleitung, seine Anregungen als auch der zugestandene Freiraum waren sehr förderlich für diese Arbeit.

Frau Priv.-Doz. Dr. Sabine Waffenschmidt danke ich sehr für die offizielle Betreuung dieser Arbeit. Herrn Prof. Dr. Ulf-Ingo Flügge danke ich für die Bereitschaft die zweite Begutachtung durchzuführen, Herrn Prof. Dr. Reinhard Strey danke ich dafür den Vorsitz der Disputation zu übernehmen.

Allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe danke ich für die Hilfsbereitschaft, das angenehme Arbeitsklima und die gute Zusammenarbeit. Besonders möchte ich mich bei Leo Gälweiler, und Filipa Santos und Thomas Teichmann bedanken.

Für die kritische und genaue Durchsicht dieser Dissertation möchte ich mich bei Alexander Szyroki, Mathias Godde, Patrizia Wolff und Iris Ottenschläger sehr herzlich bedanken.

Tinka Eneva und Elisabeth Luley möchte ich für die Unterstützung bei den Suspensionskulturarbeiten danken.

Iris Ottenschläger und Remko Offringa gebühren Dank für die zur Verfügung gestellten Pflanzen.

Alain Delbarre, Philip Muller und Prof. Catherine Perrot-Rechenmann danke ich für die Kooperation bezüglich der Auxintransport-Studien auf Suspensionskulturen.

Chris Wolverton und Prof. Micheal Evans danke ich für die Unterstützung bei den Gravitropismus-Experimenten.

Bei Dirk Becker und Prof. Reiner Hedrich möchte ich mich bedanken, daß ich die *Xenopus* Oozyten-Experimente bei ihnen durchführen konnte.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft und der Max-Planck-Gesellschaft möchte ich für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit danken.

Schließlich danke ich meinen Freunden, die mir den nötigen Ausgleich während dieser Arbeit gaben.

Am meisten Dank gebührt meinen Eltern, die mir immer den nötigen Rückhalt gegeben haben und insbesondere meiner Mutter, die die Fertigstellung der Dissertation nicht mehr miterleben konnte.