

**Funktionelle Charakterisierung des
Auxin-bindenden Proteins 1**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

Renate Irmgard Dahlke

aus Berlin

Kiel, Oktober 2007

Referentin: Prof. Dr. Margret Sauter

Koreferent: PD Dr. Christoph Plieth

Tag der mündlichen Prüfung: 07.12.2007

Zum Druck genehmigt:

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	4
Summary	6
1. Einleitung	7
1.1. Phytohormonrezeptoren	7
1.2. Auxin – Synthese, Transport und Wirkung	11
1.3. Die F-Box Auxinrezeptor-Familie	15
1.4. Das Auxin-bindende Protein 1	16
1.5. Zielsetzung	20
2. Material und Methoden	22
2.1. Materialien	22
2.2. Pflanzenmaterial und Anzucht	22
2.2.1. <i>Arabidopsis thaliana</i> (L.)	22
2.2.2. Anzucht von <i>Arabidopsis thaliana</i> in Zellkultur	23
2.2.3. Anzucht von <i>Zea mays</i> (L.)	23
2.2.4. Anzucht von <i>Oryza sativa ssp indica</i> (L.)	23
2.3. Anzucht von Bakterienstämmen	23
2.4. Molekularbiologische Methoden	24
2.4.1. Isolierung von DNA	24
2.4.2. Isolierung von Gesamt-RNA aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	25
2.4.3. Bestimmung von DNA- und RNA-Konzentrationen	25
2.4.4. DNA-Sequenzierungen	26
2.4.5. Polymerasekettenreaktion (PCR)	26
2.4.6. Reverse Transkription-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)	27
2.4.7. Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA	28
2.4.8. Herstellung des Chitinase-Strep-tag II-ABP1-Konstruktes	28
2.4.9. Transformation von Bakterien	29
2.4.10. Transformation von Arabidopsis-Pflanzen	31
2.4.11. Transformation von Arabidopsis-Zellkulturen nach der Tropf-Methode	32
2.5. Methoden zur Proteinanalyse	32
2.5.1. Herstellung von Proteinfractionen aus Pflanzenmaterial	32

2.5.2.	Konzentrationsbestimmung nach Bradford	33
2.5.3.	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	33
2.5.4.	Proteinfärbemethoden	34
2.5.5.	Western-Blot-Analyse	35
2.5.6.	Methoden zur Immunodetektion	36
2.5.7.	Methoden zur Affinitätschromatographie	38
2.6.	Funktionelle Analysen von ABP1	40
2.6.1.	Volumenänderung von Protoplasten	40
2.6.2.	Untersuchungen zum Zyklieren der Plasmamembran	41
2.6.3.	Phänotypische Untersuchungen von Zellkulturen	43
2.6.4.	P _{AtABP1} :GUS Expressionsanalysen	44
2.7.	Verwendete Computerprogramme und Datenbankrecherchen	45
3.	Ergebnisse	46
3.1.	P_{AtABP1}:GUS Expressionsanalysen	46
3.2.	Identifizierung von Proteinen, die mit ABP1 interagieren	51
3.2.1.	Nachweis von ZmABP1 in Maiskoleoptilen	51
3.2.2.	Identifizierung von ABP1-Interaktionspartnern über das C-terminale Peptid von ZmABP1 als Interaktionsdomäne	52
3.2.3.	Überexpression und Identifizierung von Strep-ABP1 bindenden Proteinen	59
3.3.	Auxinwirkung auf Protoplasten und ABP1 als Signalvermittler	68
3.3.1.	IAA und IAN, aber nicht 2-NAA induzieren eine Volumenzunahme von Protoplasten	68
3.3.2.	PSK- α induziert eine Volumenzunahme von Protoplasten	69
3.3.3.	IAA- und PSK- α -induzierte Volumenzunahmen sind kaliumabhängig	70
3.3.4.	Das C-terminale Peptid von ZmABP1 induziert alleine eine Volumenzunahme bei Protoplasten	71
3.3.5.	Die durch das Antikörperfragment scFv12 induzierte Volumenzunahme wird durch 2-NAA verstärkt	73
3.3.6.	Effektoren, die zu einer Nettovolumenzunahme bei Protoplasten führen, verringern die Fluoreszenz von FM4-64 in der Plasmamembran	74
4.	Diskussion	78
4.1.	Phytosulfokin-α induziert kaliumabhängig die Volumenzunahme von Protoplasten	78
4.2.	ABP1 als möglicher Rezeptor für auxininduziertes Streckungswachstum	80

4.3. Das über ABP1 vermittelte Auxinsignal beeinflusst die Fluoreszenz von FM4-64 in der Plasmamembran	84
4.4. <i>AtABP1</i> wird in teilungsaktivem Gewebe exprimiert	88
4.5. ABP1 und Interaktionspartner	92
4.6. ABP1 und seine Funktion als möglicher Auxinrezeptor	97
Literatur	100
Abkürzungsverzeichnis	126
Erklärung	128
Danksagung	129
Lebenslauf	130

Zusammenfassung

Neben den bekannten Auxinrezeptoren TIR1, AFB1, AFB2 und AFB3 wird auch das Auxinbindende Protein 1 (ABP1) als Rezeptorkandidat diskutiert. *ABP1* wurde in allen darauf untersuchten Pflanzen nachgewiesen. Arabidopsis-Nullmutanten von *ABP1* sind embryonal. ABP1 besitzt also eine essentielle Funktion. Die Auxinbindung an ABP1 erfolgt möglicherweise über eine hochkonservierte Auxinbindetasche mit den Boxen a und c.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass neben den Aminosäuren der Box a von ABP1 auch die der Box c wichtig bei der Auxinbindung und dessen Wirkung sind. Eine bekannte Wirkung von ABP1 ist die Vermittlung des Auxinsignals bei der Volumenzunahme von Protoplasten. Auch das disulfatierte Pentapeptid Phytosulfokin- α (PSK- α) induzierte eine Volumenzunahme bei Protoplasten, die mit der von Auxin vergleichbar war. Bei beiden war die Wirkung kaliumabhängig. In Protoplasten aus Koleoptilen wurde die Fluoreszenz des Membranfarbstoffes FM4-64 in der Plasmamembran durch Indol-3-Essigsäure verringert. Ebenso wurde die Fluoreszenz der Plasmamembran ABP1-vermittelt vermindert. Auch PSK- α verringerte die Fluoreszenz entsprechend der Auxinwirkung. Die Versuche deuten darauf hin, dass ABP1 und auch PSK- α einen Einfluss auf das Zyklieren der Plasmamembran besitzen könnten.

Über Promotor-GUS-Analysen wurde die Expression von *AtABP1* untersucht und mit der von DR5-GUS-Pflanzen verglichen. DR5 ist ein synthetisches auxinresponsives Promotorelement, welches aus früh auxininduzierten Genen abgeleitet wurde. Die Expression von P_{AtABP1} :GUS und P_{DR5} :GUS in Pflanzen unterschieden sich deutlich. So zeigte sich eine P_{AtABP1} :GUS-Aktivität in den Kotyledonen, wobei der Bereich der Hydathoden ausgespart war. Die P_{DR5} :GUS-Aktivität war dagegen vor allem im Bereich der Hydathoden zu beobachten. P_{AtABP1} :GUS-Aktivität wurde auch in jungen, teilungsaktiven Blättern gezeigt. Dies deutet auf eine mögliche Funktion von ABP1 bei der Zellteilung hin. Die postulierte Verbindung von ABP1 und Streckungswachstum konnte in der Arbeit nicht bestätigt werden. In sich streckendem Gewebe wurde keine P_{AtABP1} :GUS-Aktivität beobachtet. Es besteht die Möglichkeit, dass neben dem ausgewählten Promotorbereich zusätzliche regulatorische Elemente wichtig für die Aktivität von *AtABP1* sind, wodurch sich ein modifiziertes Expressionmuster ergeben könnte.

Mögliche Interaktionspartner von ABP1 können einen Hinweis auf seine Funktion geben. Über die Bindung an den C-Terminus von ABP1 wurden fünf Proteine identifiziert: das peroxisomale Fettsäure β -Oxidationsprotein, die putative Formate-Tetrahydrofolat Ligase, die putative ATP-Citratlyase α Untereinheit, das putative Auxin- und Ethylen-regulierte Protein AER (*auxin and ethylene regulated*) und die putative 12-Oxophytodienoat Reduktase. Um eindeutige Aussagen über eine Interaktion mit ABP1 machen zu können,

müssen jedoch noch Bindungsstudien vorgenommen werden. Ebenso sollten über ektopisch exprimiertes Gesamtprotein ABP1-interagierende Proteine aufgereinigt werden. Hierzu wurde AtABP1 an den Strep-tag II gekoppelt und in Suspensionszellen von Arabidopsis überexprimiert. Diese zeigten mit vergrößerten Zellen und Zellkernen einen Phänotyp, der ZmABP1 überexprimierenden Tabakzellen glich. In diesem Ansatz konnte jedoch kein ABP1 mit Strep-tag II aufgereinigt und dementsprechend auch keine interagierenden Proteine identifiziert werden.

Summary

In addition to the auxin receptors TIR1, AFB1, AFB2 and AFB3, the auxin-binding protein 1 (ABP1) is discussed as a receptor involved in auxin signalling. *ABP1* genes were detected in all plant species analysed. *Arabidopsis* knock out mutants of *ABP1* are embryo-lethal, indicating that ABP1 is essential for plant development. It was suggested that auxin interacts with ABP1 at a highly conserved auxin binding motif that includes the so-called boxes a, b and c.

It was described previously that ABP1 plays a role in auxin induced protoplast swelling. In this study, it was shown that the amino residues of boxes a and c of ABP1 are required for auxin signalling of protoplast expansion. Furthermore, the disulfated pentapeptid phyto-sulfokine- α (PSK- α) induced protoplast swelling similar to auxin. Effects of auxin and PSK- α were both potassium-dependent. In addition the fluorescence of the membrane dye FM4-64 was reduced by indole-3-acetic acid in an ABP1-dependent manner and was also reduced by PSK- α . These results indicated that both, ABP1 and PSK- α , might have an influence on the cycling of the plasma membrane and may act through common signalling components.

Promoter-GUS-analysis was used to study expression of *AtABP1* which was compared to expression of the auxin-responsive promoter element DR5. Activities of P_{AtABP1} :GUS and P_{DR5} :GUS were found to be different. P_{AtABP1} :GUS activity was detected in cotyledons except in the hydathode region whereas P_{DR5} :GUS was exclusively expressed in hydathodes. P_{AtABP1} :GUS activity was further detected in young leaves with high mitotic activity. These results indicated that ABP1 might be involved in cell division. Expression did not confirm a role for ABP1 in elongation since P_{AtABP1} :GUS activity was absent from elongating tissue. It is however possible that promoter elements other than those present in the promoter region selected are important for regulation of *AtABP1* expression which turn on *ABP1* in elongating cells.

Affinity chromatography was used to identify proteins that interact with ABP1. Two approaches were chosen. First, the C-terminus was used to bind interacting proteins. Five proteins were identified: a peroxisomal fatty acid β -oxidation protein, a putative formate-tetrahydrofolate ligase, a putative ATP citrate lyase a subunit, a putative auxin and ethylene regulated protein and a putative 12-oxophytodienoate reductase. To verify interaction with ABP1 *in situ* additional binding studies will have to be done. In a second approach, it was attempted to identify ABP1 interacting proteins using ectopically expressed strep-tag II-tagged ABP1. *Arabidopsis* suspension cells were transformed with a construct designed to ectopically overexpress strep-tag II-ABP1 fusion protein. Transformed cells showed enlarged cells and nuclei similar to the phenotype observed in tobacco cells overexpressing maize ABP1. However, it was not possible to isolate ABP1 or ABP1 binding proteins with this approach. Possible reasons for that are discussed.

1. Einleitung

1.1. Phytohormonrezeptoren

Der Entdeckung von Phytohormonen folgte die Identifizierung und Charakterisierung von für die Perzeption wichtiger Rezeptoren. Rezeptoren für Abscisinsäure (ABA), Auxin, Brassinosteroid, Cytokinin, Ethylen, Gibberellinsäure (GA), Phytosulfokin- α (PSK- α) und Systemin wurden identifiziert. Sie lassen sich in verschiedene Rezeptortypen einteilen, die nachfolgend besprochen werden.

Als Phytohormonrezeptoren sind solche des Zweikomponentensystems bekannt. Sie sind membranständig und übermitteln als Dimer durch die Übertragung eines Phosphatrestes Signale über die Membran in ein angrenzendes Kompartiment (Klump und Krieglstein, 2002). Das in Bakterien beschriebene Zweikomponentensystem besteht aus einem Sensorprotein mit Histidinkinaseaktivität und einem Antwortregulatorprotein, auf das eine Phosphatgruppe des Sensorproteins übertragen wird. Durch die Phosphorylierung wird der Antwortregulator aktiviert und fungiert als Transkriptionsfaktor (Weiler, 2003). Pflanzen besitzen meist ein mehrstufiges Zweikomponentensystem bei dem das Sensorprotein und der Antwortregulator in einem Protein vereint sind und weitere nachgeschaltete Proteine über Phosphorylierung aktiviert werden (Hwang *et al.*, 2002; Weiler, 2003).

Die bekannten Ethylenrezeptoren, wie ETR1, ETR2 (*ethylene response*), ERS1, ERS2 (*ethylene response sensor*) und EIN4 (*ethylene insensitive*) in *Arabidopsis* basieren auf diesem Zweikomponentensystem (Bleecker *et al.*, 1988; Chang *et al.*, 1993; Hua *et al.*, 1995). Alle sind an der Membran des Endoplasmatischen Retikulums (ER) lokalisiert (Chen *et al.*, 2002, 2005). Es lassen sich zwei Typen unterscheiden. Die Typ I-Rezeptoren ETR1 und ERS1 besitzen eine Histidinkinaseaktivität und entsprechen dem mehrstufigen Zweikomponentensystem. ETR2, ERS2 und EIN4, den Typ II-Ethylenrezeptoren, fehlt die Histidinkinaseaktivität (Chang *et al.*, 1993; Hua *et al.*, 1995). Ethylenrezeptoren bilden einen Komplex mit der Serin/Threonin Proteinkinase CTR1 (*constitutive triple response*; Clark *et al.*, 1998; Cancel und Larsen, 2002; Gao *et al.*, 2003), einer MAPKKK (mitogenaktivierte Proteinkinase-Kinase-Kinase), die als negativer Regulator wirkt (Kieber *et al.*, 1993; Huang *et al.*, 2003). Bindet Ethylen an die Ethylenrezeptoren werden diese und CTR1 inaktiviert und eine MAP-Kinase-Kaskade aktiviert. Dies wurde für *Medicago truncatula* und *Arabidopsis thaliana* gezeigt (Ouaked *et al.*, 2003). EIN2, ein membranständiger Metalltransporter, ist das nächste bekannte Glied in der Ethylensignalkette (Alonso *et al.*, 1999). Durch die aktive MAP-Kinase-Kaskade ist auch EIN2 aktiv und wirkt als Positivregulator (Alonso *et al.*, 1999) in dem es den Abbau des Transkriptionsfaktors EIN3 verhindert. EIN3 ist ein Aktivator für ethyleninduzierte Gene (Guo und Ecker, 2003; Potuschak *et al.*, 2003), die darauf hin

transkribiert werden. Ohne Ethylen ist das an die Ethylenrezeptoren gebundene CTR1 aktiv und die MAP-Kinase-Kaskade wird nicht aktiviert (Kieber *et al.*, 1993; Ouaked *et al.*, 2003). EIN2 wird gehemmt und der Transkriptionsfaktor EIN3 wird über den *Skp1/Cullin/F-box* (SCF)-Komplex, einer E3 Ubiquitin Protein Ligase abgebaut, so dass eine Transkription unterbunden wird (Guo und Ecker, 2003; Potuschak *et al.*, 2003). Die Beteiligung von CTR1 am Ethylensignalweg wurde über Mutantenanalysen gezeigt. Wurde die Kinaseaktivität von CTR1 (Kieber *et al.*, 1993) oder die Bindung von CTR1 an den Ethylenrezeptor (Gao *et al.*, 2003; Huang *et al.*, 2003) gestört, zeigte sich die Wirkung von CTR1 als Negativregulator. Die Mutanten zeigten ohne Ethylenbehandlung die sogenannte Dreifachantwort mit einem verdickten, gestauchten Hypokotyl und der Ausbildung eines apikalen Hakens. Sie besaßen den gleichen Phänotyp wie mit Ethylen behandelte Keimlinge.

Auch die Cytokininrezeptoren der CRE-Rezeptorfamilie mit CRE1/AHK4 (*cytokinin response/arabidopsis histidine kinase*), AHK2 und AHK3 gehören zu den Zweikomponentenrezeptoren (Inoue *et al.*, 2001; Suzuki *et al.*, 2001; Yamada *et al.*, 2001; Higuchi *et al.*, 2004). Durch die Bindung von Cytokinin wird eine Phosphatgruppe der Histidinkinase des Rezeptors auf dessen Antwortregulatordomäne und anschließend auf ein Phosphotransferprotein übertragen (Suzuki *et al.*, 2002; Ferreira und Kieber, 2005). Diese AHPs (*arabidopsis histidine phosphotransferase protein*) phosphorylieren Transkriptionsfaktoren, ARRs (*arabidopsis response regulator*), über die die cytokinininduzierte Genexpression gesteuert wird. Es gibt zwei Typen von ARRs. Typ-B ARRs besitzen eine DNA-Bindedomäne und wirken als Aktivator, wohingegen Typ-A ARRs, denen die DNA-Bindedomäne fehlt, als Negativregulator fungieren (Sakai *et al.*, 2000, 2001; Hwang und Sheen, 2001).

In Pflanzen wurden daneben transmembrane LRR-RKs (*leucine rich repeat receptor kinase*) als Phytohormonrezeptoren identifiziert. Sie setzen sich aus einer extrazellulären LRR-Domäne (Kobe und Kajava, 2001) und einer intrazellulären Kinasedomäne zusammen, welche durch die Bindung eines Signalmoleküls phosphoryliert wird (Shin und Bleecker, 2001). In Tomate wurde der plasmamembranständige Brassinosteroidrezeptor BRI1 (*brassinosteroid insensitive*) entdeckt und als eine LRR-Rezeptorkinase identifiziert (Li und Chory 1997; Cano-Delgado *et al.*, 2004). Eine Mutation von *BRI1* führt zu zwergwüchsigen Pflanzen. Der Phänotyp entspricht Pflanzen, denen Brassinolid fehlt (Clouse *et al.*, 1996; Holton *et al.*, 2007). BRI1 besitzt in der LRR-Domäne eine 70 Aminosäure lange Inseleldomäne, an die das Brassinosteroid bindet (Li und Chory, 1997; Friedrichsen *et al.*, 2000; Kinoshita *et al.*, 2005). BRI1 interagiert mit BAK1 (*BRI1 associated receptor kinase*), einer LRR-RLK (*leucine rich repeat receptor-like kinase*), die jedoch keine Inseleldomäne und somit keine Brassinosteroidbindestelle besitzt (Nam und Li, 2002; Russinova *et al.*, 2004). Durch die Bindung des Brassinosteroids an BRI1

phosphorylieren sich beide gegenseitig (Wang *et al.*, 2001, 2005). Dies führt über einen noch unbekanntem Weg zur Dephosphorylierung und Aktivierung von BRZ1 (*brassinazole resistant*) und BES1 (*bri1 EMS suppressor*; Wang *et al.*, 2002; Yin *et al.*, 2002). Beide Proteine sind im Kern lokalisiert und regulieren die brassinosteroidinduzierte Genexpression. Dabei fungiert BRZ1 als Repressor und BES1 als Aktivator (He *et al.*, 2005; Yin *et al.*, 2005).

BRI1 fungiert auch als Rezeptor für Systemin (Montoya *et al.*, 2002, Scheer und Ryan, 2002; Scheer *et al.*, 2003), wobei Brassinosteroid und Systemin unterschiedliche Bindedomänen besitzen (Scheer *et al.*, 2003). Nicht alle systemininduzierten Signalwege sind BRI1-abhängig (Holton *et al.*, 2007). Die systemininduzierte Synthese von Proteinaseinhibitoren (Orozco-Cárdenas *et al.*, 1993; Holton *et al.*, 2007) und die bei Zellkulturen induzierte Alkalisierung des Mediums (Meindl *et al.*, 1998) werden nicht über BRI1 gesteuert (Holton *et al.*, 2007). Das systemininduzierte Wachstum von Wurzeln ist hingegen BRI1-abhängig (Holton *et al.*, 2007).

Die Perzeption des disulfatierten Pentapeptids Phytosulfokin- α (PSK- α) erfolgt ebenfalls über eine membranständige LRR-Rezeptorkinase (Yang *et al.*, 2000; Matsubayashi *et al.*, 2006). PSK- α ist wie Systemin ein Peptid, welches über ein Präproprotein synthetisiert wird (Yang *et al.*, 1999; Lorbiecke und Sauter, 2002). Die Sulfatierung ist entscheidend für seine Wirkung (Matsubayashi und Sakagami, 1996). PSK- α kommt in konditioniertem Medium von Suspensionzellen vor und bewirkt, dass sich Zellen in geringer Dichte häufiger teilen (Matsubayashi und Sakagami, 1996; Yang *et al.*, 2000). Ebenso verstärkt es die Keimung von Tabakpollen in geringer Dichte (Chen *et al.*, 2000). *In vitro* induziert PSK- α die Differenzierung von *Zinnia elegans* Mesophyllzellen zu Tracheen (Matsubayashi *et al.*, 1999b), sowie somatische Embryogenese bei *Daucus carota*, *Cryptomeria japonica*, *Larix leptolepis* und *Zea mays* (Hanai *et al.*, 2000; Igasaki *et al.*, 2003; Umehara *et al.*, 2005; Ahmadabadi *et al.*, 2007). LRR-RKs wurden in *Daucus carota* (Matsubayashi *et al.*, 2002) und *Arabidopsis thaliana* (Matsubayashi *et al.*, 2006) als die PSK- α -Rezeptoren DcPSKR1 und AtPSKR1 identifiziert. Mutationen im PSK- α -Rezeptor *AtPSKR1* führten zu Veränderungen bei Zellkulturen. Blätter von *Atpskr1*-Mutanten verlieren anders als Wildtypblätter mit dem Älterwerden die Fähigkeit zur Kallusbildung. Zellkulturen von jungen Blättern von *Atpskr1*-Mutanten reagieren nicht mehr wie Wildtypzellkulturen auf PSK- α . Die *Atpskr1*-Mutante kann durch die Expression von *DcPSKR1* oder *AtPSKR1* restauriert werden (Matsubayashi *et al.*, 2006).

Für Abscisinsäure (ABA) wurden drei verschiedene Rezeptoren in *Arabidopsis* identifiziert. Als intrazellulärer ABA-Rezeptor wurde das RNA-bindende Protein FCA ermittelt, welches bei der Blühregulation wichtig ist (Razem *et al.*, 2006). FCA alleine inhibiert die Akkumulation der mRNA des MADS-Box-Transkriptionsfaktors *FLC* (*flowering locus C*), einem Repressor der Blühinduktion (Michaels und Amasino, 1999; Sheldon *et al.*, 2000).

Ohne den Repressor wird die Blütenbildung induziert (Razem *et al.*, 2006). Durch die Bindung von ABA an FCA wird die Blütenbildung verzögert, da die mRNA von *FLC* akkumuliert und der Transkriptionsfaktor als Repressor wirken kann. *fca*-Mutanten zeigten auch ohne ABA-Behandlung eine verzögerte Blühinduktion. Der ABA-Rezeptor FCA besitzt jedoch keinen Einfluss auf ABA-Effekte wie Samenruhe, Embryoentwicklung und Stomataregulation (Razem *et al.*, 2006). ABAR (*abscisic acid receptor*), ein multifunktionales Protein, welches der Untereinheit der Magnesiumprotoporphyrin-IX-Chelatase im Chloroplasten entspricht, ist ebenfalls ein ABA-Rezeptor (Shen *et al.*, 2006). Er besitzt eine spezifische Bindungsaffinität zu ABA. Das durch ABA induzierte Schließen der Stomata und das Inhibieren des Öffnens ist bei *ABAR* überexprimierenden Linien verstärkt. Sie sind hypersensitiv gegenüber ABA. Die Stomata von RNAi-Linien (*RNA interference*) können dagegen auch durch ABA-Behandlung nicht geschlossen werden. Die RNAi-Linien sind insensitiv gegenüber ABA. *abar*-Mutanten entwickeln unreife Samen, deren Embryonen letal sind (Shen *et al.*, 2006). Der ABA-Rezeptor ABAR ist wichtig bei der Embryoentwicklung und bei der ABA-induzierten Stomataregulation. Die Signalweiterleitung ist noch nicht bekannt (Shen *et al.*, 2006). GCR2 (*G protein-coupled receptor*) ist ein plasmamembranständiger extrazellulärer G-Protein gekoppelter ABA-Rezeptor (Liu *et al.*, 2007). *GCR2*-Überexpressionslinien besitzen einen hypersensitiven Phänotyp gegenüber ABA. Samen von *gcr2*-Mutanten zeigten keine Samenruhe, auch war die ABA-vermittelte Stomataregulation gestört. Um Stomata zu schließen und geschlossen zu halten, wird der Kaliumeinstrom durch ABA inhibiert (Ward *et al.*, 1995; Wang *et al.*, 2001). In *gcr2*-Mutanten wird der Kaliumeinstrom durch ABA nicht vermindert (Liu *et al.*, 2007). *gcr2*-Mutanten sind demnach insensitiv gegenüber ABA. GCR2 interagiert mit einem heterotrimeren G-Protein. Nach einem Modell von Liu *et al.* (2007) löst sich durch die Bindung von ABA das G-Protein von GCR2 und der heteromere Komplex dissoziiert zu $G\alpha$ und $G\beta\gamma$, die das Signal über einen noch unbekanntem Weg weiterleiten und den ABA-Effekt induzieren.

Der Gibberellin-Signalweg (GA) wird über einen SCF-Komplex reguliert. In Reis und Arabidopsis wurde gezeigt, dass GID1 (*gibberellin insensitive dwarf*), eine hormonsensitive Lipase, als GA-Rezeptor fungiert und den SCF-Komplex-abhängigen Proteinabbau der DELLA-Proteine induziert (Griffiths *et al.*, 2007). DELLA-Proteine sind Repressoren im GA-Signalweg (Ueguchi-Tanaka *et al.*, 2005; Nakajima *et al.*, 2006). In Arabidopsis sind drei Homologe von GID1 bekannt, AtGID1a, b und c (Nakajima *et al.*, 2006; Griffiths *et al.*, 2007). Eine *gid1a/gid1b/gid1c* Dreifachmutante reagierte nicht auf GA und zeigte einen starken Zwergwuchs (Griffiths *et al.*, 2007; Willige *et al.*, 2007). Zwergwuchs ist typisch für Mutanten, die in der GA-Biosynthese gestört sind. Zum Beispiel enthält die *ga1-3* Mutante nur noch 1% des in Arabidopsis-Wildtyp gemessenen GA-Gehaltes (Zeevaart und Talon, 1992; Silverstone *et al.*, 2001) und ist stark in Blatt-, Stängel- und Wurzelwachstum inhibiert. Auch

wurde in der Tripelmutante eine Akkumulation des DELLA-Proteins RGA (*repressor of ga1-3*) beobachtet (Cao *et al.*, 2006; Griffiths *et al.*, 2007). Es wurde gezeigt, dass die DELLA-Proteine RGA und GAI (*GA insensitive*) direkt mit den GID1-Proteinen interagieren (Griffiths *et al.*, 2007; Willige *et al.*, 2007). Sie werden GID1-vermittelt dem SCF-Komplex zum Proteinabbau zugeführt (Nakajima *et al.*, 2006).

Auch für Auxin ist ein Signalweg über den SCF-Komplex-vermittelten Proteinabbau bekannt. Die F-Box Proteine TIR1 (*transport inhibitor response*) und AFB1, AFB2 und AFB3 (*auxin signalling F-box protein*) sind Auxinrezeptoren (Dharmasiri *et al.*, 2005a, b; Kepinski und Leyser, 2005). Ihre Funktion wird unter 1.3. genauer beschrieben. Für Auxin ist neben der F-Box Rezeptorfamilie ein weiteres Protein bekannt, das Auxin bindet, das Auxin-bindende Protein 1 (ABP1; Löbner und Klämbt, 1985; Shimomura *et al.*, 1986; Palme *et al.*, 1992; Napier, 1992; Diekmann *et al.*, 1995). Auf welchem Weg die Signaltransduktion von ABP1 aus erfolgt, ist noch nicht bekannt. ABP1 wird genauer unter 1.4. behandelt.

1.2. Auxin – Synthese, Transport und Wirkung

Bioaktive Auxine zeichnen sich durch ein planares, aromatisches Ringsystem und eine Carboxylgruppe aus. In Pflanzen ist Indol-3-Essigsäure (*indole-3-acetic acid*, IAA) das häufigste und physiologisch wichtigste Auxin. IAA wird über einen Tryptophan-abhängigen Weg über verschiedene Vorläufermoleküle und Enzyme synthetisiert (Abbildung 1; Woodward und Bartel, 2005). In Arabidopsiskeimlingen wurde das IAA-Vorläufermolekül Indol-3-Acetamid nachgewiesen (Pollmann *et al.*, 2002), welches *in vitro* durch die Amidohydrolase in IAA umgewandelt wird (Pollmann *et al.*, 2003). Ebenso wurde gezeigt, dass Indol-3-Acetonitril in Arabidopsis (Normanly *et al.*, 1993; Ilić *et al.*, 1996) und in Mais (Park *et al.*, 2003) vorkommt und über Nitrilasen in IAA umgewandelt wird (Park *et al.*, 2003). Ebenso wird auch ein Tryptophan-unabhängiger Weg beschrieben, in dem IAA aus Indol synthetisiert wird. Dieser Weg könnte wichtig für die Grundversorgung an IAA sein (Normanly *et al.*, 1993; Ribnicky *et al.*, 2002; Szein *et al.*, 2002; Ilić und Cohen, 2004). Neben den unterschiedlichen Synthesewegen wurde gezeigt, dass IAA nur zu einem Prozent aktiv in der Pflanze vorliegt (Normanly *et al.*, 1993; Tam *et al.*, 2000). Bis zu 90% der IAA kommen als Aminosäure-Konjugate vor. IAA-Alanin ist hauptsächlich in der Wurzel, IAA-Leuzin im Spross, IAA-Aspartat und IAA-Glutamat in Blättern lokalisiert (Tam *et al.*, 2000; Kowalczyk und Sandberg, 2001). Ebenso ist ein 35 kDa Protein aus *Phaseolus vulgaris* als IAA-Speicherprotein bekannt (Ljung *et al.*, 2002; Walz *et al.*, 2002). In dieses Protein sind IAA-konjugierte Aminosäuren eingebaut und es besitzt eine Protein/IAA-Korrelation von 2/1 (Walz *et al.*, 2002). Es kommt als Speicherprotein in Samen vor (Cohen *et al.*, 1988; Walz *et al.*, 2002) und wurde in der Endomembranfraktion nachgewiesen (Seidel *et al.*, 2005). Bis zu 10% der gesamten IAA liegen als IAA-Glukose vor (Tam *et al.*, 2000; Jakubowska und

Kowalczyk, 2004). Ein vereinfachtes Modell des IAA-Metabolismus ist in Abbildung 1 gezeigt.

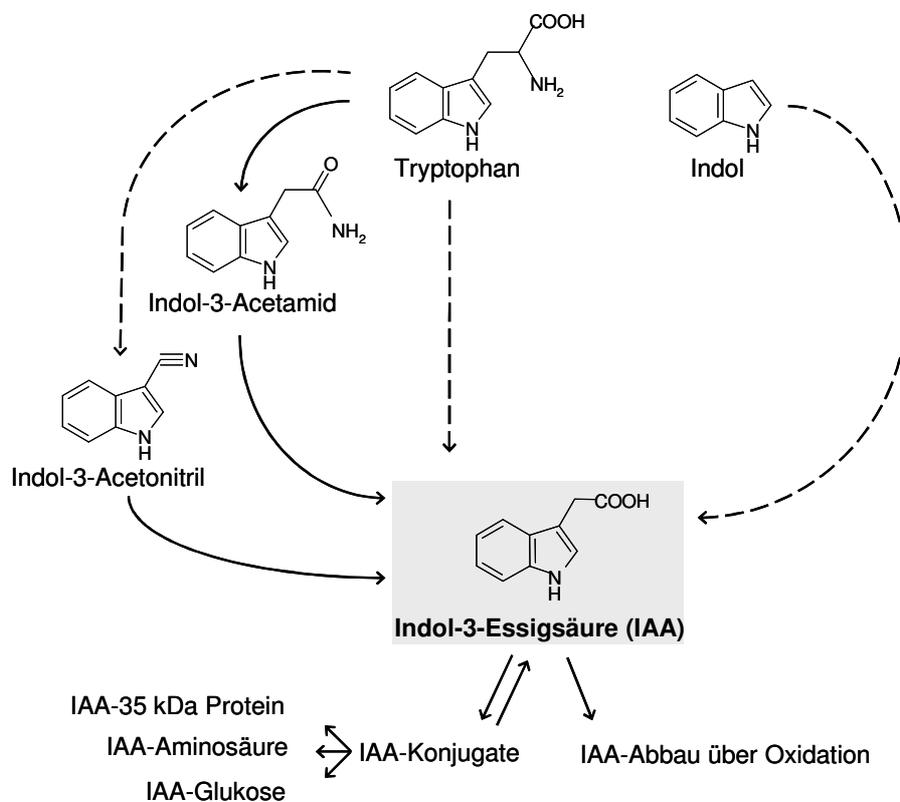


Abbildung 1: Vereinfachtes Modell des IAA-Metabolismus von Arabidopsis. IAA kann Tryptophan-unabhängig aus Indol oder Tryptophan-abhängig aus Tryptophan über verschiedene Zwischenstufen gebildet werden. Gestrichelte Pfeile markieren Wege über mehrere Enzyme, durchgehende Pfeile entsprechen einem enzymatischen Syntheseschritt. IAA kann über Aminosäure- und Glukose-Konjugate oder als IAA-35 kDa Protein vorübergehend inaktiviert und gespeichert werden. Über die Oxidation des Indolringes wird IAA inaktiviert und abgebaut (modifiziert nach Woodward und Bartel, 2005).

Eine Besonderheit des Phytohormons IAA ist sein polarer Transport vom apikalen Bildungsort zum basalen Wirkort wie der Wurzel. Der Transport von IAA kann über Diffusion oder vermittelt über Carrier erfolgen. Proteine der AUX1-Familie (*auxin-resistant1*) sind Influx-Carrier von IAA (Lomax *et al.*, 1995; Bennett *et al.*, 1996; Swarup und Bennett, 2003; Kleine-Vehn *et al.*, 2006). Sie sind asymmetrisch über die Plasmamembran verteilt und erleichtern den directionalen Auxintransport (Swarup *et al.*, 2001, 2004). PIN-Proteine (*pin-formed*; Gälweiler *et al.*, 1998; Palme und Gälweiler, 1999) vermitteln aktiven und polaren Transport von Auxin als Efflux-Carrier. In Arabidopsis sind acht *PIN*-Gene bekannt (Gälweiler *et al.*, 1998; Paponov *et al.*, 2005), die individuell in verschiedenen Geweben und Zellen in unterschiedlichen Entwicklungsstadien exprimiert werden (Gälweiler *et al.*, 1998; Friml *et al.*,

2002). PIN1, 2, 3, 4, 6 und 7 sind an der Plasmamembran aktiv (Blilou *et al.*, 2005), wohingegen PIN5 und PIN8 Auxin in das ER transportieren (Jiří Friml, Universität Gent, Belgien, unveröffentlicht). P-Glykoproteine sind ABC-Transporter und dienen als Efflux- (PGP1 und PGP19) und Influx-Transporter (PGP4) von IAA an der Plasmamembran (Noh *et al.*, 2001; Geisler *et al.*, 2003; 2005; Terasaka *et al.*, 2005; Geisler und Murphy, 2005). Die Aktivität von PIN-Proteinen (Geldner *et al.*, 2001, 2003; Friml, 2003; Paciorek *et al.*, 2005) und P-Glykoproteinen (Murphy *et al.*, 2002; Geisler *et al.*, 2003) wird über endozytotisches Zyklieren der Plasmamembran reguliert. Für PIN-Proteine ist gezeigt worden, dass sie von Endosomen in Vesikeln zur Plasmamembran und in partiell ummantelten Vesikeln zurück zu Endosomen zyklieren (Geldner *et al.*, 2001; Peer *et al.*, 2004). GNOM, ein GDP/GTP Austauschfaktor (Busch *et al.*, 1996; Steinmann *et al.*, 1999) markiert Vesikel, mit denen PIN-Proteine transportiert werden. Wie diese Markierung funktioniert ist noch nicht bekannt (Donaldson und Jackson, 2000; Geldner *et al.*, 2003). PID (*pinoid*), eine Serin/Threonin Proteinkinase (Bennett *et al.*, 1995; Christensen *et al.*, 2000; Benjaminis *et al.*, 2001) kontrolliert die polare Lokalisation der jeweiligen PIN-Proteine (Friml *et al.*, 2004). Auxin selbst reguliert das Zyklieren der PIN-Proteine. Durch Auxin wird die Endozytose von PIN-Proteinen inhibiert. Als Folge akkumulieren PIN-Proteine an der Plasmamembran und Auxin wird verstärkt polar transportiert (Paciorek *et al.*, 2005).

Polarer Auxintransport und die daraus resultierenden Auxingradienten sind entscheidend für Organogenese und Differenzierung. PIN-Proteine vermitteln zum Beispiel die Differenzierung von Wurzel- und Sprossmeristemen im Embryo (Friml *et al.*, 2003). Im Zweizellstadium wird durch PIN7 Auxin in die embryonalen Zellen transportiert, wodurch diese als apikale Zellen markiert werden. Im globulären Stadium sind PIN1 und PIN4 an der basalen Seite im Inneren des Embryos lokalisiert. Durch den gerichteten Auxintransport zum Suspensor wird im basalen Bereich das Wurzelmeristem angelegt. Im Herzstadium wird durch PIN1 verstärkt Auxin in zwei seitlich apikale Bereiche transportiert und die erhöhte Auxinkonzentration definiert dadurch den Bildungsort der Kotyledonen (Friml *et al.*, 2003). Auch die Lage der Blattprimordien im Apikalmeristem wird durch den PIN-induzierten Auxingradienten bestimmt (Heisler *et al.*, 2005). Weitere Auxin-vermittelte Effekte sind die Apikaldominanz der Sprosse, die Ausbildung von Seitenwurzeln, der Blattfall, die Fruchtreife, die Embryogenese, die mit Photo- und Gravitropismus verbundene Förderung des Streckungswachstums von Sprossen und die Hemmung des Längenwachstums von Wurzeln.

Als klassischer Auxineffekt wird die Förderung des Streckungswachstums von Koleoptilen betrachtet (Hager *et al.*, 1971; Rayle, 1973; Rayle und Cleland, 1977, 1992). Während der Streckung einer Zelle erfolgt zuerst eine transiente auxininduzierte Depolarisation der Plasmamembran (Felle *et al.*, 1991). Auxin aktiviert

plasmamembranständige Protonenpumpen (Marrè *et al.*, 1974; Haschke und Lüttge, 1975; Cleland, 1976; Hager *et al.*, 1991). Der verstärkte Efflux von Protonen hat eine Hyperpolarisation der Plasmamembran und die Ansäuerung des Apoplasten zur Folge. Ein gesteigerter Kaliumimport über Kaliumkanäle sorgt für einen Ladungsausgleich (Haschke und Lüttge, 1975). Das osmotisch aufgenommene Wasser führt zum Turgoranstieg in der Zelle. Durch die Ansäuerung des Apoplasten werden Expansine aktiviert (McQueen-Mason *et al.*, 1992), welche nicht-kovalente Bindungen zwischen Zellulosen und Xyloglukanen lösen. Die Zellwand dehnt sich, was zur Zellstreckung führt (Cosgrove *et al.*, 2002). Die Aktivität der plasmamembranständigen H⁺-ATPasen wird über endozytotisches Zyklieren reguliert (Geldner *et al.*, 2001; Baluška *et al.*, 2002). Für Kaliumkanäle wird das gleiche diskutiert (Hurst *et al.*, 2004; Fuchs *et al.*, 2006).

Viele der auxininduzierten physiologischen Effekte werden über auxinvermittelte Genexpression gesteuert. Auxin induziert die Akkumulation von Transkripten dreier Genfamilien. *SAURs* (*small auxin-up RNAs*) gehören zu den schnell auxininduzierten Genen (Walker und Key, 1982; McClure und Guilfoyle, 1987; Gil *et al.*, 1994; Johnson *et al.*, 2000). *AAM1* (*abolished apical hook maintenance*), ein *SAUR*-Gen aus Arabidopsis, wird in der inneren Seite des apikalen Hakens von etiolierten Keimlingen exprimiert. Bei einer *AAM1* Überexpression wird kein apikaler Haken mehr gebildet. *AAM1* scheint somit in die Entwicklung des apikalen Hakens involviert zu sein (Park *et al.*, 2007). Die Akkumulation der *GH3* (Gretchen Hagen) und *GH3*-ähnlichen Transkripte wird ebenfalls durch Auxin induziert (Hagen *et al.*, 1984; Staswick *et al.*, 2005). Einige der *GH3*-Gene kodieren für IAA-Amidosynthetasen und bilden IAA-Aminosäure-Konjugate. Zum Beispiel bildet GH3.6 das IAA-Konjugat IAA-Aspartat (Staswick *et al.*, 2005). Für andere GH3s ist kein Zusammenspiel mit Auxin bekannt. Sie sind an der Konjugation oder Adenylierung von Aminosäuren mit anderen Molekülen, wie zum Beispiel Jasmonsäure beteiligt (Straswick *et al.*, 2002; Straswick und Tiryoki, 2004). *Aux/IAAs* (*auxin/indole-3-acetic acid proteins*) gehören ebenfalls zu den schnell auxininduzierten Genen. In Arabidopsis sind 29 *Aux/IAAs* bekannt (Liscum und Reed, 2002; Remington *et al.*, 2004). Alle besitzen 4 konservierte Domänen, die für ihre Wirkung als Repressor (Tiwari *et al.*, 2004), ihre Stabilität (Worley *et al.*, 2000; Gray *et al.*, 2001; Ouellet *et al.*, 2001; Ramos *et al.*, 2001), sowie die Bildung von Homo- oder Heterodimeren mit ARFs (*auxin response factor*) entscheidend sind (Kim *et al.*, 1997; Ulmasov *et al.*, 1999; Hardtke *et al.*, 2004). Die unterschiedlichen *Aux/IAA* Homo- und Heterodimere sind in verschiedenen Entwicklungsstadien wichtig. So ist zum Beispiel *BDL/IAA12* (Bodenlos) in die Embryonalentwicklung involviert (Hamann *et al.*, 1999, 2002). *bdl/iaa12*-Mutanten zeigen Deformationen im Wurzelmeristem. Homozygote Keimlinge entwickeln keine Wurzel (Hamann *et al.*, 2002). *Aux/IAAs* wirken als Repressoren für auxininduzierte Gene (Abbildung 2). *Aux/IAA*-Proteine binden an ARFs (Abel *et al.*, 1994;

1995; Ulmasov *et al.*, 1997), die wiederum als Repressor oder Aktivator für auxininduzierte Gene fungieren (Ulmasov *et al.*, 1999; Tiwari *et al.*, 2003). Aux/IAAs werden auxinrezeptorvermittelt abgebaut, wodurch eine auxininduzierte Genexpression möglich wird (Abbildung 2).

1.3. Die F-Box Auxinrezeptor-Familie

Erst vor kurzer Zeit konnte gezeigt werden, dass es sich bei dem F-Box Protein TIR1 um einen Auxinrezeptor handelt (Dharmasiri *et al.*, 2005a; Kepinski und Leyser, 2005). TIR1 als F-Box Protein ist Bestandteil eines SCF-Komplexes. Es sind weitere Homologe von TIR1, die Auxin-F-Box Proteine 1 bis 3 (AFB1 bis 3) bekannt (Dharmasiri *et al.*, 2005b). TIR1 vermittelt die Auxinantwort über den Abbau von spezifischen Transkriptionsfaktoren (Abbildung 2).

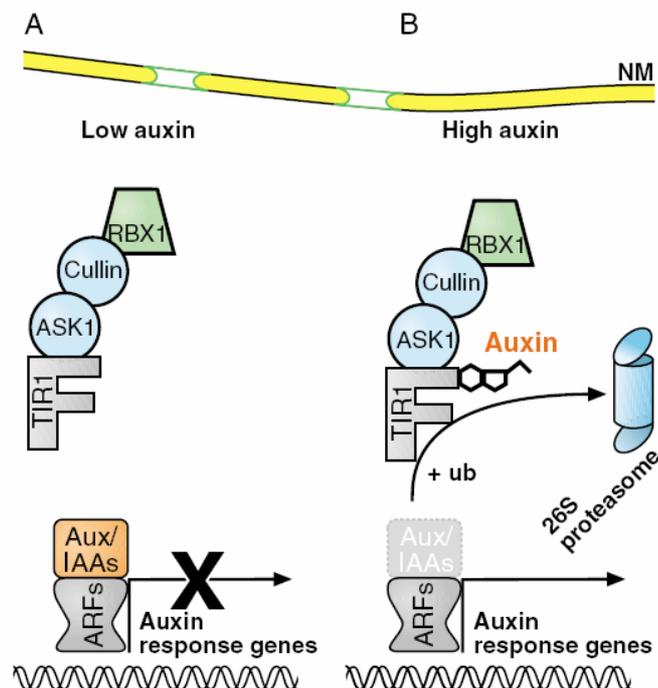


Abbildung 2: Modell des Auxinsignalweges über den SCF^{TIR1}-Komplex als Auxinrezeptor in *Arabidopsis thaliana*. **A** Die Transkription von auxinregulierten Genen über ARFs wird bei geringen Auxinkonzentrationen durch Aux/IAA Proteine blockiert. **B** Bei hohen Auxinkonzentrationen bindet Auxin an das F-Box Protein TIR1. Durch die Auxinbindung bindet der SCF^{TIR1}-Komplex an Aux/IAA und induziert deren Ubiquitinierung und somit den Abbau des Proteins über das 26S Proteasom. Die über ARFs-regulierten Gene werden transkribiert. NM: Kernmembran (aus Bishopp *et al.*, 2006).

Der SCF^{TIR1}-Komplex bindet spezifisch an Aux/IAA Proteine (Dharmasiri *et al.*, 2005a;

Kepinski und Leyser, 2005), die als Repressoren für ARFs wirken. ARFs sind wiederum Repressoren oder Aktivatoren für auxinregulierte Gene (Ulmasov *et al.*, 1997, 1999). Die Bindung des SCF^{TIR1}-Komplexes an Aux/IAA Proteine ist auxinabhängig (Dharmasiri *et al.*, 2005a; Kepinski und Leyser, 2005). Auxin wirkt als eine Art „*molecular glue*“ (Tan *et al.*, 2007) zwischen TIR1 und Aux/IAA Proteinen, indem es eine polare Tasche von TIR1 verschließt und dadurch die Interaktion begünstigt (Tan *et al.*, 2007). Aux/IAA Proteine interagieren mit TIR1 über die *Degron*-Region. Die *Degron*-Region markiert Proteine für den Proteinabbau (Varshawsky *et al.*, 1991). Alle 29 Aux/IAA Proteine besitzen diese hoch konservierte *Degron*-Region (Ramos *et al.*, 2003). TIR1 besitzt zusätzlich den Kofaktor Inositol-Hexakisphosphat, welcher stabilisierend auf die Tertiärstruktur wirkt (Tan *et al.*, 2007). Nachdem das Aux/IAA Protein gebunden wurde, wird es ubiquitiniert und so markiert, im Proteasom abgebaut. Als Folge werden auxininduzierte Gene exprimiert. Welche auxininduzierten Gene über die F-Box Auxinrezeptor-Familie reguliert werden, ist noch nicht bekannt.

Einfach- oder Doppelmutanten der F-Box Rezeptorfamilie zeigten kaum eine phänotypische Veränderung (Dharmasiri *et al.*, 2005b). Bei Tripel- und Quadrupelmutanten wurden dagegen phänotypische Veränderungen beobachtet (Dharmasiri *et al.*, 2005b). Fast die Hälfte dieser Mutanten war stark im Wachstum beeinträchtigt. Sie bildeten keine Wurzeln aus, das Hypokotyl war stark gestaucht, zum Teil wurde nur ein Kotyledon gebildet. Die Keimlinge zeigten kein Längenwachstum im Dunkeln und starben ab. Bis zu 15% der Dreifach- und Vierfachmutanten hatten verkürzte Wurzeln und Hypokotyle. Tropistische Reaktionen waren gestört. Keimlinge zeigten ebenfalls kein Längenwachstum im Dunkeln. Auch die Ausbildung des apikalen Hakens blieb aus. Später starben die Keimlinge ab. Die übrigen Keimlinge waren im Gravitropismus gestört, bildeten nur verkürzte Wurzelhaare aus und im Dunkeln bildete sich kein apikaler Haken. Diese Keimlinge entwickelten sich zu fertilen Pflanzen mit gestauchter Infloreszenz (Dharmasiri *et al.*, 2005b).

Die Auxinrezeptoren der F-Box-Familie vermitteln die Auxinantwort über Genexpression. Reaktionen über diesen Signalweg sind frühestens in Form von Transkription nach 5 Minuten zu erwarten (Badescu und Napier, 2006). Schnellere Reaktionen, wie die auxininduzierte Hyperpolarisation der Plasmamembran scheinen über einen weiteren Signalweg aktiviert zu werden.

1.4. Das Auxin-bindende Protein 1

Das Auxin-bindende Protein 1 (ABP1) wurde erstmals in Membranfraktionen von Maiskoleoptilen beschrieben (Hertel *et al.*, 1972). Auf Grund seiner hohen Affinität zu Auxinen wurde postuliert, dass es sich bei ABP1 um einen Auxinrezeptor handeln könnte (Löbler und Klämbt, 1985; Feldwisch *et al.*, 1992; Palme *et al.*, 1992). ABP1 besitzt eine

2002). Für Box c wurde eine IAA-Bindung über photoaktivierte IAA nachgewiesen (Brown und Jones, 1994). Der hochkonservierte C-Terminus enthält das KDEL-Retentionsmotiv für das ER (Munro und Pelham, 1987; Napier *et al.*, 1992). ABP1 ist glykosyliert (Massotte *et al.*, 1995; Woo *et al.*, 2002) und für ZmABP1 wurde eine Disulfidbrücke nachgewiesen, welche wichtig für die Sekundärstruktur sein könnte. Feckler *et al.* (2001) wiesen eine Disulfidbrücke zwischen den Cysteinen 41 und 100 nach. Dagegen identifizierten Napier *et al.* (2002) und Woo *et al.* (2002) eine Disulfidbrücke zwischen den Cysteinen 41 und 193.

Über die Kristallstruktur von ZmABP1 wurde gezeigt, dass ein Zinkion in der Auxinbindetasche an der Bindung der Carboxylgruppe von 1-NAA beteiligt ist. Die zinkbindenden Aminosäuren befinden sich hauptsächlich in Box a (Abbildung 3; Woo *et al.*, 2000, 2002). ABP1 ist als Homodimer aktiv (Woo *et al.*, 2002) und gehört zu der Superfamilie der Germin, die als Speicherprotein in Samen vorkommen (Dunwell *et al.*, 2000).

ABP1 ist entsprechend dem KDEL-Retentionsmotiv hauptsächlich im ER lokalisiert (Henderson *et al.*, 1997). Auf Grund des neutralen pH-Wertes im ER (Wilson *et al.*, 1993) besitzt es hier jedoch nur eine geringe Affinität zu IAA (Tian *et al.*, 1995). Über Bindungsstudien an Plasmamembranvesikeln (Schiebl *et al.*, 1997) und Immunogoldmarkierung von ABP1 (Jones und Herman, 1993; Diekmann *et al.*, 1995) konnte das Protein auch in geringen Mengen extrazellulär an der Plasmamembran nachgewiesen werden. ABP1 besitzt seine höchste Bindungsaffinität zu IAA bei einem pH-Wert von 5,5 (Löbler und Klämbt, 1985; Edgerton *et al.*, 1994). Somit könnte ABP1 an der Plasmamembran Auxin besonders effektiv binden.

In *Arabidopsis thaliana* gibt es nur ein *ABP1*-Gen. Wurde dieses ausgeschaltet, erwiesen sich *abp1*-Mutanten als embryolethal (Chen *et al.*, 2001b). Die Embryonen entwickelten sich nur bis zum frühen globulären Stadium. *NtABP1-antisense*-Linien von BY-2-Tabakzellkulturen (*bright yellow*), die eine verringerte Menge an *ABP1* mRNA besaßen, zeigten ein reduziertes Längenwachstum. Auch reagierten die Zellen nicht mehr auf 1-NAA (Chen *et al.*, 2001a). *ZmABP1*-Überexpressionslinien von Tabakzellkulturen zeigten dagegen ein leicht erhöhtes Längenwachstum und waren oktaploid (Chen *et al.*, 2006).

Mehrere Ergebnisse deuten darauf hin, dass ABP1 als Auxinrezeptor dienen könnte. Auxin induziert eine Hyperpolarisation der Plasmamembran (Ephritikhine *et al.*, 1987). Wurde ABP1 durch einen Anti-ABP1 Antikörper inhibiert, konnte durch eine Auxinapplikation keine Hyperpolarisation mehr induziert werden (Barbier-Brygoo *et al.*, 1989). Eine Auxinapplikation führte bei Protoplasten zu einer sofortigen Nettovolumenzunahme (Steffens und Lüthen, 2000). Ein vorher applizierter Anti-ABP1 Antikörper hemmte auch hier die auxininduzierte Volumenzunahme (Steffens *et al.*, 2001). Ein Antikörper, der gegen die Box a und somit gegen Teile der Auxinbindetasche gerichtet

ist, imitierte eine Auxinbindung an ABP1. Bei Protoplasten induzierte dieser Antikörper eine auxinähnliche Hyperpolarisation (Venis *et al.*, 1992; Leblanc *et al.*, 1999a) und eine auxinähnliche Nettovolumenzunahme (Steffens *et al.*, 2001).

Die Applikation eines C-terminalen Peptids von ABP1 alleine induzierte wie Auxin eine Hyperpolarisation der Plasmamembran (Leblanc *et al.*, 1999b; David *et al.*, 2001). Das C-terminale Peptid löste ebenfalls eine Volumenzunahme von Protoplasten aus. Wurde dagegen ein Antikörper gegen den C-Terminus von ABP1 appliziert, konnte IAA keine Volumenzunahme mehr hervorrufen (Steffens *et al.*, 2001). Auxin führt durch die Aktivierung von plasmamembranständigen einwärtsgerichteten Kaliumkanälen zum Öffnen der Stomata (Thiel *et al.*, 1993). Versuche mit Stomata deuten ebenfalls auf eine Rolle von ABP1 im Auxinsignalweg hin. Das C-terminale Peptid von ABP1 bewirkte die Aktivierung von plasmamembranständigen Kaliumkanälen in Stomata (Thiel *et al.*, 1993).

Da ABP1 keine bekannte transmembrane Domäne besitzt, wurde ein *docking-protein* Modell postuliert, welches die Wirkung von ABP1 an der Plasmamembran erklären soll (Klämbt, 1990; MacDonald, 1997). Der durch IAA-Bindung exponierte C-Terminus von ABP1 interagiert mit einem Protein (Napier und Venis, 1990). Dieses Protein selbst, oder der mit ihm interagierende Proteinkomplex, soll plasmamembranassoziiert sein und das Auxinsignal weiterleiten. Für diese Hypothese sprechen die Nachweise von ABP1 an der Plasmamembran über Immunogoldmarkierung (Diekmann *et al.*, 1995) und die spezifische Bindung von ABP1 an isolierte Plasmamembranvesikel (Schiebl *et al.*, 1997). Ein möglicher Interaktionspartner von ABP1 ist ein Glykosylphosphatidylinositol-verankertes plasmamembranständiges Protein, welches über Photoaffinitätsvernetzung mit einem C-terminalen Peptid von ABP1 identifiziert wurde (Shimomura, 2006). Eine Bindung von ABP1 mit diesem Protein muss jedoch noch bestätigt werden. Es ist somit letztlich nicht geklärt, wie der Signalweg von ABP1 aussieht.

Durch die F-Box Auxinrezeptor-Familie können Auxinreaktionen, die über Genregulation erfolgen, erklärt werden. Diese Reaktionen sind abhängig von der Genexpression und der nachfolgenden Proteinsynthese. Veränderungen in der Transkriptmenge von *Aux/IAA* und *SAURs* wurde schon nach fünf Minuten gemessen (Abel und Theologis, 1996). Auch eine Steigerung der MAP-Kinaseaktivität konnte 5 Minuten nach Auxinapplikation gemessen werden (Mockaitis und Howell, 2000). Es gibt jedoch Auxinreaktionen, die schon nach ein bis zwei Minuten messbar sind, wie die Aktivierung von plasmamembranständigen H⁺-ATPasen und Kaliumkanälen sowie die Hyperpolarisation der Plasmamembran von Protoplasten. Diese Reaktionen erfolgen alle an der Plasmamembran und sind nicht über eine intrazelluläre, F-Box Auxinrezeptor-Familie-vermittelte Genexpression zu erklären. Für diese schnellen Auxinreaktionen könnte dagegen ABP1 als potentieller Auxinrezeptor in Frage kommen (Badescu und Napier, 2006).

1.5. Zielsetzung

Das Auxin-bindende Protein 1 (ABP1) wurde über seine Bindung an Auxin identifiziert (Hertel *et al.*, 1972). *ABP1* konnte in allen darauf untersuchten Pflanzen nachgewiesen werden (Napier, 2002). In *Arabidopsis* ist das Ausschalten des einzigen *ABP1*-Gens embryonal (Chen *et al.*, 2001b). Somit ist ABP1 essentiell für die Entwicklung von Pflanzen. Für ABP1 wird eine Funktion als Auxinrezeptor diskutiert (Palme *et al.*, 1992). Eine biochemische Funktion des Proteins wurde bisher jedoch noch nicht gezeigt.

In dieser Arbeit sollte die Funktion von ABP1 näher untersucht werden. Die Lokalisation eines Proteins oder des kodierenden Gens können Rückschlüsse auf dessen Funktion geben. Um mögliche Wirkorte von ABP1 in der Pflanze zu identifizieren, sollte die Expression von *AtABP1* über Promotor-GUS-Analysen in *Arabidopsis thaliana* untersucht und zellspezifisch sowie entwicklungsabhängig beobachtet werden.

Die Identifizierung von Interaktionspartnern kann ebenfalls einen Hinweis auf die Funktion eines Proteins geben. So sollte der C-Terminus von ABP1, der als mögliche Interaktionsdomäne gilt (Thiel *et al.*, 1993; Leblanc *et al.*, 1999b; Steffens *et al.*, 2001), verwendet werden, um damit interagierende Proteine aus Koleoptilen aufzureinigen. In früheren Versuchen wurde gezeigt, dass ABP1 in Koleoptilen aktiv ist, weshalb diese als Versuchsmaterial geeignet erschienen. Da weitere Interaktionsdomänen nicht auszuschließen sind, sollte in einem zweiten Ansatz das gesamte native *AtABP1* zur Aufreinigung von interagierenden Proteinen verwendet werden. Hierzu sollte *AtABP1* an Strep-tag II gekoppelt und in Zellkulturen von *Arabidopsis* überexprimiert werden. Über den Strep-tag II sollte es möglich sein, *AtABP1* als Komplex mit interagierenden Proteinen aufzureinigen. Zellkulturen wurden als Versuchsmaterial gewählt, da deren Teilung und das Wachstum auxinabhängig ist, wodurch sie als Wirkort für den potentiellen Auxinrezeptor ABP1 in Betracht kommen. Auch wurde gezeigt, dass die Überexpression von ABP1 das Wachstum von Tabakzellen verstärkt und ABP1 somit dort eine Funktion zu besitzen scheint (Chen *et al.*, 2001a).

ABP1 gilt als Signalübermittler in der von Auxin ausgelösten Volumenzunahme von Protoplasten (Steffens *et al.*, 2001). Bestimmte Aminosäuren, die sich in den hoch konservierten, als Box a und Box c bezeichneten Bereichen der Auxinbindetasche befinden, sind für die Auxinbindung wichtig (Brown und Jones, 1994; Woo *et al.*, 2002). Auch wurde über einen Antikörper, der gegen die Box a gerichtet ist, gezeigt, dass Box a von ABP1 für dessen Wirkung auf Protoplastenexpansion eine Rolle spielt (Steffens *et al.*, 2001). In dieser Arbeit sollte untersucht werden, in wie weit Box c ebenfalls an der durch ABP1-vermittelten Auxinwirkung beteiligt ist. Dazu sollte ein Antikörperfragment, das hauptsächlich an Box c bindet, verwendet werden.

Es wird vermutet, dass ABP1 als extrazellulärer Rezeptor wirken könnte (Barbier-

Brygoo *et al.*, 1989). Das disulfatierte Pentapeptid Phytosulfokin- α (PSK- α) wird über einen plasmamembranständigen Rezeptor perzipiert (Matsubayashi *et al.*, 2002, 2006). Es sollte untersucht werden, ob PSK- α eine Wirkung auf Protoplasten besitzt und deren Volumen verändert. Weiterhin sollte geprüft werden, ob diese Wirkung mit der über ABP1 vermittelten Wirkung von Auxin vergleichbar ist.

Auxin beeinflusst das Zyklieren der Plasmamembran (Paciorek *et al.*, 2005). An Protoplasten sollte das Zyklieren mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffs FM4-64 beobachtet werden. Hierbei sollte untersucht werden, ob über ABP1 oder über PSK- α das Zyklieren beeinflusst werden kann.

2. Material und Methoden

2.1. Materialien

Chemikalien, Enzyme und Kits stammten, soweit nicht anders vermerkt, von den Firmen Boehringer (Mannheim, Deutschland), Duchefa Biochemie (Haarlem, Niederlande), Eurogentec (Seraing, Belgien), GE Healthcare (Freiburg, Deutschland), Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland), MBI-Fermentas (Leon-Roth, Deutschland), Merck (Darmstadt, Deutschland), Promega (Mannheim, Deutschland), Qiagen (Hilden, Deutschland), Roche (Mannheim, Deutschland), Roth (Karlsruhe, Deutschland), Serva Electrophoresis GmbH (Heidelberg, Deutschland), Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland), VWR (Darmstadt, Deutschland).

Für alle Lösungen und Medien wurden, wenn nicht anders beschrieben, ddH₂O aus einer SG-Reinstwasser System Anlage (SG-Wasseraufbereitung und Regeneration GmbH, Hamburg, Deutschland) verwendet.

2.2. Pflanzenmaterial und Anzucht

2.2.1. *Arabidopsis thaliana* (L.)

Das Saatgut von *Arabidopsis thaliana* des Ökotyps Columbia-0 wurde ursprünglich von GABI-KAT (Max-Planck-Institut, Köln, Deutschland) bezogen. Die DR5-Promotor-GUS-Mutante wurde von Tim Ulmasov (Missouri University, Columbia, USA) zur Verfügung gestellt. Zur Transformation und Untersuchung von transformierten *Arabidopsis*-Pflanzen wurden 4 bis 5 Pflanzen pro Topf in 1:1 Sand/Humus-Gemisch angezogen. Die Samen wurden einer Stratifikation für 2 d bei 4°C unterzogen, um eine gleichmäßigere Keimung zu gewährleisten. Die Anzucht erfolgte unter Langtagbedingungen mit 16 h Licht, 70 µM Photonen/m²s und 22°C. Unter diesen Bedingungen erfolgte die Blühinduktion nach 3 bis 4 Wochen. Etiolierte Keimlinge wurden nach der Stratifikation für 10 h belichtet und anschließend dunkel bei 24°C angezogen.

Für Promotor-GUS-Analysen wurden Pflanzen auf 0,5 fachem MS-Medium (Murashige und Skoog, 1962) ohne Vitamine und Myoinositol (Duchefa Biochemie, Haarlem, Niederlande) mit 1% (w/v) Saccharose und 0,8% (w/v) Agarose steril in Petrischalen angezogen. Um Samen zu sterilisieren, wurden diese für 20 min in 2% (v/v) Natriumhypochloridlösung geschüttelt und anschließend 5 mal mit sterilem ddH₂O gewaschen. Nach einer Stratifikation für 2 d erfolgte die Anzucht unter Langtagbedingungen bei 16 h Licht, 70 µM Photonen/m²s und 22°C.

2.2.2. Anzucht von *Arabidopsis thaliana* in Zellkultur

Zur Überexpression von AtABP1 wurden Zellkulturen von *Arabidopsis* verwendet, die von Dr. Lieven De Veylder (Gent University, Gent, Belgien) zur Verfügung gestellt wurden. Die Erhaltung und Vermehrung erfolgte als Oberflächenkultur auf MSMO-Medium (Murashige und Skoog, 1962; Minimal Organic, Serva, Heidelberg, Deutschland) mit 30% (w/v) Saccharose, 0,8% (w/v) Agarose, 2,68 μM 1-NAA, 0,23 μM Kinetin bei pH 5,8 in 18-tägiger Subkultur im Dunkeln bei 25°C. Ebenso wurden von den Zellkulturen Suspensionskulturen angelegt. Die Vermehrung erfolgte in oben beschriebenem MSMO-Medium ohne Agarose in 100 ml Erlenmeyerkolben mit 15 ml Medium. Die Suspensionskulturen wuchsen im Dunkeln bei 25°C mit 120 rpm. Die Suspensionskulturen wurden wöchentlich subkultiviert.

2.2.3. Anzucht von *Zea mays* (L.)

ZmABP1 und Interaktionspartner von ZmABP1 sollten aus Proteinfractionen von Maiskoleoptilen isoliert und identifiziert werden. Um Koleoptilen zu erhalten, wurden Maiskaryopsen über Nacht in Wasser vorgequollen und für 4 d im Dunkeln auf feuchtem Filterpapier bei 25°C angezogen. Protoplasten aus Maiskoleoptilen wurden ebenfalls für Experimente zur funktionellen Analyse von ABP1 verwendet. Es wurden die Kultivare Garant (Saatenunion, Hannover, Deutschland), B73 und die aus B73 generierten Mutanten *nit1* und *nit2* (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Erich Glawischnig, TU München, Freising, Deutschland) verwendet.

2.2.4. Anzucht von *Oryza sativa ssp indica* (L.)

Aus Proteinfractionen von Reiskoleoptilen sollten mit dem C-Terminus von ZmABP1 interagierende Proteine isoliert und identifiziert werden. Das Saatgut der dafür verwendeten Reiskultivar Pin Gaew 56 stammte aus Nachzuchten vom *International Rice Research Institute* (Los Baños, Laguna, Philippines). Um Koleoptilen zu erhalten, wurden Samen auf feuchtem Filterpapier ausgelegt und im Dunkeln für 4 d bei 27°C angezogen.

2.3. Anzucht von Bakterienstämmen

Für Klonierungen wurden transformationskompetente *Escherichia coli* DH5 α Zellen verwendet. *Arabidopsis*-Pflanzen und -Zellkulturen wurden mit kompetenten Zellen des *Agrobacterium tumefaciens* Stammes GV3101::pMP90RK (Koncz und Shell, 1986) transformiert. Dieser zeichnet sich durch eine chromosomale Resistenz gegen Rifampicin

und die jeweils durch einen Ti-Plasmid vermittelte Resistenz gegen Kanamycin und Gentamycin aus. Kompetente *E. coli*- und *A. tumefaciens*-Zellen wurden bei -80°C gelagert. *E. coli* und *A. tumefaciens* wurden auf LB-Medium nach Luria-Bertani (USB Corporations, Cleveland, Ohio, USA) kultiviert. Beide Bakterienstämme wurden als Suspensionskultur bei 300 rpm und 37°C für *E. coli* oder bei 28°C für *A. tumefaciens*, und als Oberflächenkultur auf LB-Medium mit 1,5% (w/v) Agar angezogen. Zur Selektion wurden den Medien entsprechende Antibiotika hinzugefügt.

2.4. Molekularbiologische Methoden

2.4.1. Isolierung von DNA

2.4.1.1. Isolierung von genomischer DNA aus *Arabidopsis thaliana*

Zur Isolierung von genomischer DNA aus *Arabidopsis thaliana* wurde ein Blatt mit 400 µl Extraktionspuffer in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben und mit einem Minipistill gemörsert. Um Zellmaterial von der DNA-haltigen Lösung zu trennen, wurde für 5 min bei 12000 g zentrifugiert. 300 µl des Überstandes wurden 1:1 mit Isopropanol zur Fällung der DNA versetzt. Das Gemisch wurde bei 12000 g für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 70% (v/v) Ethanol gewaschen. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (5 min, 12000 g) wurde der Überstand vorsichtig entfernt und das Pellet getrocknet. Das Pellet wurde in 50 µl autoklaviertem ddH₂O gelöst und wurde für Polymerasekettenreaktionen (2.4.5.) eingesetzt.

Extraktionspuffer

200 mM Tris, pH 7,5

250 mM NaCl

25 mM EDTA

0,5% (w/v) SDS

2.4.1.2. Isolierung von DNA aus *Arabidopsis*-Zellkulturen

Zur Präparation genomischer DNA aus *Arabidopsis thaliana* Zellkulturen wurde das *DNeasy Plant Mini Kit* (Qiagen, Hilden, Deutschland) nach Herstellerangaben verwendet.

2.4.1.3. Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien

Plasmid-DNA wurde nach der Methode von Birnboim und Doly (1979), welche auf dem

Prinzip der „alkalischen Lyse“ basiert, isoliert und für Standard-Polymerasekettenreaktionen (2.4.5.) verwendet. Zur Sequenzierung klonierter DNA-Fragmente waren größere Mengen an reiner Plasmid-DNA nötig. Hierzu wurde das *Plasmid Purification MIDI JETstar Kit* (Genomed, Löhne, Deutschland) nach der Anleitung des Herstellers verwendet.

2.4.2. Isolierung von Gesamt-RNA aus *Arabidopsis thaliana*

Um Gesamt-RNA aus Pflanzenmaterial oder Zellkulturen von *Arabidopsis* zu gewinnen, wurde das Pflanzen- beziehungsweise Zellmaterial in flüssigem Stickstoff gemörsert. 100 mg Material wurden eingesetzt und mit 1 ml TRI-REAGENT™ (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) versetzt. Weitere Schritte wurden gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt. Die isolierte Gesamt-RNA konnte bei -80°C gelagert werden. Um zu gewährleisten, dass die isolierte Gesamt-RNA nicht mit DNA verunreinigt war, wurde ein DNA-Verdau wie folgt vorgenommen:

RNA	1 µg	} 1 h Inkubation bei 37°C
DNase1-Puffer	10 mM Tris, pH 7,5, 2,5 mM MgCl ₂	
DNase1	1 U	

Die Puffer und Enzyme stammten von MBI Fermentas (Leon-Roth, Deutschland). Die Gesamt-RNA wurde anschließend durch eine Phenol/Chloroform-Extraktion gereinigt. Die gelöste RNA wurde mit dem gleichen Volumen an Phenol/Chloroform Lösung gemischt und für 1 min bei RT bei 12000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde mit ½ Volumen Chloroform versetzt und 1 min bei 12000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat und 2,5 Volumen reinem Ethanol versetzt. Die Fällung der RNA wurde bei -20°C in 30 min oder über Nacht vorgenommen. Die RNA wurde durch eine Zentrifugation von 15 min bei 12000 g und 4°C pelletiert und das Pellet mit 75% (v/v) Ethanol gewaschen. Die Gesamt-RNA wurde in 20 µl autoklaviertem ddH₂O resuspendiert und bei 55°C für 10 min inkubiert. Anschließend wurde die Konzentration photometrisch bestimmt.

2.4.3. Bestimmung von DNA- und RNA-Konzentrationen

Die Quantifizierung der Nukleinsäuren erfolgte photometrisch. Es wurde die optische Dichte (OD) bei 260 und 280 nm gemessen. Nach Sambrook und Russell (2001) entspricht eine OD von 1 bei 260 nm einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA und 40 µg/ml RNA. Die Reinheit der Nukleinsäuren wurde über den Absorptionsquotienten von 260 zu 280 nm bestimmt.

2.4.4. DNA-Sequenzierungen

Zur Überprüfung der klonierten Sequenzen und um die Insertionsrichtung von klonierten DNA-Fragmenten zu bestimmen, wurden entsprechende Plasmidabschnitte sequenziert (Seqlab, Göttingen, Deutschland). Die Auswertung der Sequenzdaten erfolgte mit dem Programm BioEdit 7.0.5 (Ibis Therapeutics, Carlsbad, Kanada).

2.4.5. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Fragmente von genomischer DNA oder cDNA wurden über PCR amplifiziert (Peltier Thermalcycler von MJ Research Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland). Standard-PCRs wurden in einem Volumen von 20 μ l wie folgt durchgeführt:

3'-Oligonukleotide	0,5 μ M
5'-Oligonukleotide	0,5 μ M
dNTPs	0,4 mM
PCR-Puffer	siehe unten
Polymerase	0,04 U/ μ l
DNA	100 ng

Es wurde folgendes PCR-Programm verwendet:

Initiale Denaturierung	94 °C	für	5 min	} 25 bis 30 Zyklen
Denaturierung	94 °C	für	40 s	
Anlagerung der Oligonukleotide	T_m	für	40 s	
Strangverlängerung	72 °C	für	40 bis 90 s	
Abschluss der Elongation	72 °C	für	5 min	
Kühlung	4 °C	für	∞	

T_m ist die Anlagerungstemperatur, welche spezifisch für jedes Oligonukleotid-Paar ermittelt wurde. Die verwendeten Oligonukleotide (MWG-Biotech AG, Ebersberg, Deutschland) und ihre T_m sind in Tabelle 1 aufgelistet. Die Strangverlängerungszeit richtete sich nach der Größe des zu erwartenden DNA-Fragmentes und nach der verwendeten Polymerase. Die *Taq*-Polymerase (aus *Thermus aquaticus*, Fehlerhäufigkeit: 10^{-5} Nukleotide), die 1000 Nukleotide/min einfügen kann, wurde für Standard-PCRs um Fragmentgrößen zu überprüfen in *Taq*-Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 8,8, 50 mM KCl, 1,5 mM $MgCl_2$, 0,001% (w/v) Glycerin) verwendet. Die *Pfu*-Polymerase (aus *Pyrococcus furiosus*, Fehlerhäufigkeit: 10^{-6} Nukleotide) fügt 550 Nukleotide/min ein und wurde zur Herstellung von DNA-Fragmenten für

Klonierungen in *Pfu*-Puffer (20 mM Tris-HCl, pH 8,8, 10 mM (NH₄)₂SO₄, 10 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 0,1% Triton X-100) verwendet. Die Quantifizierung der PCR-Produkte erfolgte über die gelelektrophoretische Auftrennung (2.4.7.).

Tabelle 1: Sequenzen und T_m der verwendeten Oligonukleotide. * Eine T_m von 60°C wurde bei der Oligonukleotidpaarung AtABP1-Strep-R2 und AtChiti-F1 verwendet.

Name	Sequenz (5' → 3')	T _m [°C]
AtActin II-F1	CAAAGACCAGCTCTTCCATCG	60
AtActin II-R2	CTGTGAACGATTCCTGGACCT	60
AtABP1-R1	CTCGAGTTAAAGCTCGTCTTTTTGTG	64
AtABP1-F1	GGATCCCCTTGTCCCATCAATGGCTTG	64
AtABP1-R2	TTAAAGCTCGTCTTTTTGTGGATTCTTG	51 / 60*
AtABP1-Strep-F2	CAGTTCGAAAAACCTTGTCCCATCAATGGC	51
AtChiti-R1	CGGGTGGCTCCAGGATTCGGCCGAGGATTAA	48
AtChiti-Strep-F1	CACCATGAAGACTAATCTTTTTCTCTT	48 / 60*
AtABP1-P-F	CACCGCACGATTAGCAGCTTTCTC	58
AtABP1-P-R	CAAGCAGCTTCGTAGCTCTT	58

2.4.6. Reverse Transkription-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)

Durch die reverse Transkriptase wurde Gesamt-RNA in cDNA umgeschrieben. Es wurde nach einem modifizierten Protokoll von Murphy *et al.* (1993) gearbeitet. Für die RT-PCR wurde je Probe 200 ng Gesamt-RNA mit 0,5 mM dNTPs, 0,5 µg Oligo-dT-Oligonukleotid (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) in einem Reaktionsansatz von 10,5 µl gemischt und 5 min bei 65°C inkubiert. Anschließend wurde die Lösung 1 min auf Eis gekühlt und einem Reaktionsansatz mit 10 mM DTT (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) und 20 U RNase Inhibitor (MBI Fermentas, Leon-Roth, Deutschland) hinzugegeben. Nach 2 min Inkubation bei 42°C erfolgte die Zugabe von 100 U Revert Aid M-MuLV Reverse Transkriptase (MBI Fermentas, Leon-Roth, Deutschland), der sich eine weitere Inkubationszeit bei 42°C von 50 min anschloss. Erhitzen für 15 min bei 72°C inaktivierte die Transkriptase. Die entstandene cDNA wurde bei -20°C gelagert und für PCRs verwendet. Um die zu untersuchenden relativen Transkriptmengen verschiedener Proben vergleichen zu können, wurden gleiche RNA-Konzentrationen für die RT-PCR eingesetzt. Zusätzlich wurde bei den durchgeführten PCRs *AtActin II* als Beladungskontrolle verwendet. Die relative Transkriptmenge sollte in den

untersuchten Proben gleich sein. Zur Kontrolle der Reinheit der Gesamt-RNA wurde eine PCR mit der Gesamt-RNA nach DNase-Verdau durchgeführt (2.4.5.).

2.4.7. Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA

Über eindimensionale Gelelektrophorese erfolgte die größenabhängige Auftrennung von DNA-Fragmenten. Je nach Größe des zu erwartenden DNA-Fragmentes wurde eine Agarosekonzentration von 1 bis 2% eingesetzt. Es wurde mit 1x TAE-Puffer (40 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8 und 0,11% (v/v) Eisessig) gearbeitet. Die DNA wurde mit 1/10 Ladepuffer (0,1% (w/v) Bromphenolblau und 50% (w/v) Glycerin) versetzt und auf das Agarosegel mit 1% (v/v) Ethidiumbromid aufgetragen. Zur Größen- und Konzentrationbestimmung wurde der DNA Standard Smart Ladder (Eurogentec, Seraing, Belgien) verwendet. Es konnten Größen zwischen 200 und 10000 bp und Konzentrationen zwischen 15 und 100 ng bestimmt werden. Mit dem DNA Standard HyperLadder II (Bioline GmbH, Luckenwalde, Deutschland) wurde die Größe von DNA-Fragmenten unter 50 bp bestimmt. Sollte ein DNA-Fragment zur Ligation (2.4.9.1.) weiterverwendet werden, wurde es mit Hilfe des *QIAEX II* Kits (Qiagen, Hilden, Deutschland) nach Angaben des Herstellers aus dem Agarosegel eluiert.

2.4.8. Herstellung des Chitinase-Strep-tag II-ABP1-Konstruktes

Für die Überexpression von Strep-tag II AtABP1 (Strep-ABP1) wurde ein Konstrukt bestehend aus der N-terminalen Chitinase Signalsequenz (At3g12500), der Strep-tag II Sequenz (Skerra und Schmidt, 2000, www.iba-go.com) und der AtABP1 Sequenz ohne die ursprüngliche Signalsequenz hergestellt (Gen At4g02980). Hierzu waren mehrere PCR-Schritte nötig. Die AtChitinase Signalsequenz (Gao *et al.*, 2004) wurde freundlicherweise von Privatdozent Dr. Christoph Plieth (Zentrum für Biochemie und Molekularbiologie, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, Deutschland) zur Verfügung gestellt. Mit den Oligonukleotiden AtChiti-F1 und AtChiti-Strep-R1 wurde das 66 bp große Fragment amplifiziert. Am 5'-Ende des 5'-Oligonukleotids waren zusätzliche 12 Nukleotide angebracht, welche für die vordere Hälfte des Strep-tags kodieren. So wurde das 3'-Ende des AtChitinase Fragments um die vordere Hälfte der Strep-tag II Sequenz verlängert (Abbildung 4). Das 495 bp große Fragment von *AtABP1* wurde aus cDNA von *Arabidopsis thaliana* mit den Oligonukleotiden AtABP1-Strep-F2 und AtABP1-R2 amplifiziert. Der vordere Bereich des AtABP1-Strep-F2 Oligonukleotids bestand aus der hinteren Hälfte des Strep-tag II Sequenz. So wurde am 5'-Ende des AtABP1-Fragmentes die zweite Hälfte des Strep-tags II verlängert (Abbildung 4).

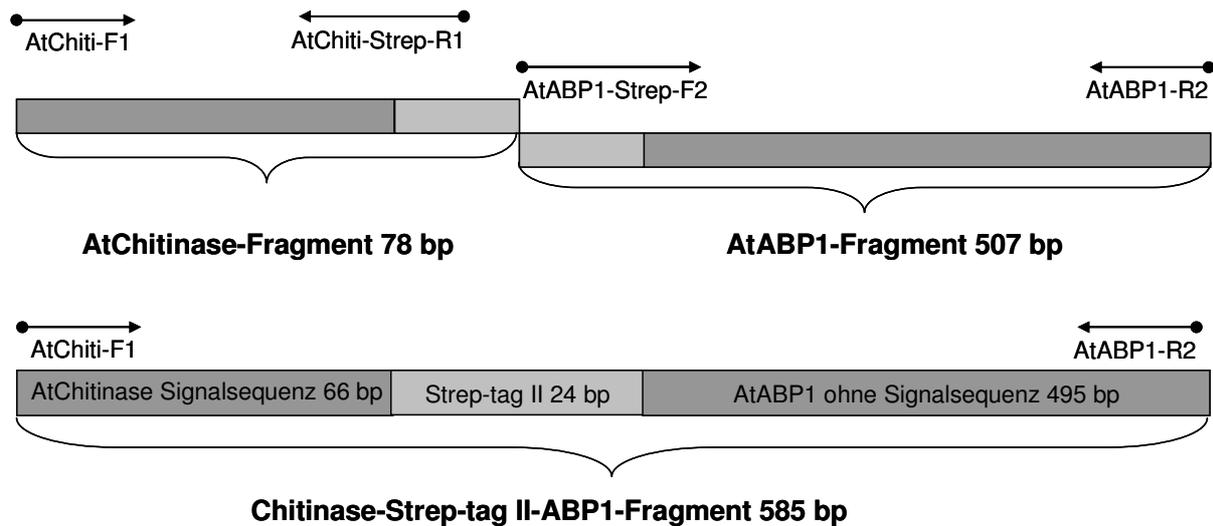


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Generierung des Chitinase-Strep-tag II-ABP1-Fragments (Strep-ABP1). Es wurde ein AtChitinase-Fragment bestehend aus der AtChitinase Signalsequenz und den 12 N-terminalen Nukleotiden des Strep-tag II und ein AtABP1-Fragment bestehend aus den 12 C-terminalen Nukleotiden des Strep-tag II und der AtABP1 Sequenz ohne der ursprünglichen Signalsequenz generiert. Über eine Ligation der beiden Fragmente wurde Strep-ABP1 hergestellt. Die dargestellten Fragmente sind nicht maßstabsgetreu.

Über eine Ligation der beiden Fragmente wurde das Chitinase-Strep-tag II-ABP1-Fragment hergestellt. 10 fMol AtABP1-Fragment wurden mit 40 fM AtChitinase-Fragment, 2 U Ligase und 1x Ligationspuffer (MBI Fermentas, Leon-Roth, Deutschland) für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Durch die Ligation der zwei Fragmente waren 10 verschiedene Fragmentpaarungen möglich. Durch eine PCR mit den Oligonukleotiden AtChiti-F1 und AtABP1-R2 wurde das gewünschte Chitinase-Strep-tag II-ABP1-Fragment amplifiziert und aufgereinigt. Zur Überexpression des Strep-ABP1 wurde dieses Fragment in einen pENTRTM/D-TOPO Vektor ligiert und anschließend über homologe Rekombination in den Überexpressionsvektor pDest/D-TOPO pH7WG2 (www.plantgenetics.rug.ac.be/gateway/index.php?NAME=pH7WG2&_app=vector&_act=construct_show) ligiert (2.4.9.). Durch die Transformation von Arabidopsis-Zellkulturen sollte Strep-ABP1 überexprimiert werden (2.4.11.).

2.4.9. Transformation von Bakterien

Zur Transformation von Bakterien wurden kompetente Zellen des *Escherichia coli* Stammes DH5 α und von *Agrobacterium tumefaciens* (2.3.) verwendet. Für Klonierungen wurde das Gateway-System (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) genutzt. Zuerst wurde das zu klonierende DNA-Fragment in den Eingangsvektor pENTRTM-Vektor ligiert. Eine gerichtete Insertion war durch einen CACC Überhang am 5'-Ende des zu klonierenden Fragments

möglich. Durch homologe Rekombination wurde vom pENTR™-Vektor in verschiedene Destinations-Vektoren (pDest/D-TOPO) ligiert. Diese wurden über *Agrobacterium tumefaciens* in den Zielorganismus eingebracht. Die verwendeten Vektoren sind in Tabelle 2 aufgeführt.

Tabelle 2: Verwendete Gateway-Vektoren mit Antibiotika-Resistenzen. Weitere Informationen zu den Vektoren sind unter www.plantgenetics.rug.ac.be/gateway zu finden.

Vektor	Verwendung	Selektions-Antibiotika
pENTR/D-TOPO®	Eingangsvektor	Kanamycin
pDest/D-TOPO pH7WG2	Destinationsvektor für 35S Promotor vermittelte Überexpression	Spectinomycin, Hygromycin
pDest/D-TOPO pBGWFS7	Destinationsvektor für Promotor-GUS Studien	Bakterien: Spectinomycin Pflanzen: BASTA

2.4.9.1. Ligation in pENTR/D-TOPO® Vektor

Zur Ligation eines Fragments in den pENTR/D-TOPO® Vektor wurde ein Verhältnis von 5:1 von Fragment:Vektor verwendet. Es wurde nach den Angaben des Herstellers vorgegangen. Ein Reaktionsansatz aus Fragment, Vektor und Salzlösung wurde bei Raumtemperatur für 1 h inkubiert. Anschließend erfolgte die Transformation in *E. coli*.

2.4.9.2. Hitzeschock-induzierte Transformation von *E. coli*

Kompetente *E. coli* DH5α Zellen wurden auf Eis aufgetaut und 2 µl des Ligationsansatzes wurden zu den kompetenten Zellen gegeben und vorsichtig umgerührt. Zur Anlagerung der Vektor-DNA an die Zellen wurden diese für 30 min auf Eis inkubiert. Während eines 42°C Hitzeschocks von 90 s wurde die Vektor-DNA aufgenommen. Nach 4 min Inkubation auf Eis wurde den Zellen 800 µl LB-Medium hinzugegeben und sie wurden bei 37°C und 130 rpm für 1 h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen bei 700 rpm für 2 min pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 200 µl LB-Medium resuspendiert. Die transformierten Zellen wurden auf festem LB-Medium mit 50 µg/ml Kanamycin ausplattiert und über Nacht bei 37°C angezogen. Am nächsten Tag wurden 10 gewachsene Kolonien selektiert, vermehrt und auf eine erfolgreiche Transformation über Plasmid-DNA-Präparation (2.4.1.3.) und PCR (2.4.5.) getestet. Ebenso wurde über Sequenzierung (2.4.4.) auf Insertionsrichtung und Sequenzfehler getestet. Um das gewünschte Fragment vom pENTR/D-TOPO® Vektor

durch homologe Rekombination in den pDest/D-TOPO Vektor zu ligieren, wurde ebenfalls nach den Angaben des Herstellers vorgegangen. Beide Vektoren wurden im Verhältnis 1:1 eingesetzt. Der Reaktionsansatz aus den Vektoren, Vektor-Puffer, Topoisomerase I, TE-Puffer (pH 8) und LR Clonase (MBI-Fermentas, Leon-Roth, Deutschland) wurde für 24 h bei RT inkubiert. Anschließend wurden, wie oben beschrieben, *E. coli* DH5 α kompetente Zellen mit 1 μ l des Reaktionsansatzes transformiert und über 100 μ g/ml Spectinomycin selektiert.

2.4.9.3. Transformation in *Agrobacterium tumefaciens*

100 μ l noch gefrorenen kompetenten Agrobakterium Zellen wurde 1 μ g pDest/D-TOPO Vektor hinzugefügt. Nachdem die Zellen auf Eis aufgetaut waren, wurden sie für 5 min bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte eine Zugabe von 1 ml LB-Medium und die Zellen wurden für 3 h bei 28°C mit 80 rpm geschüttelt. Die transformierten Zellen wurden auf LB-Medium mit 100 μ g/ml Rifampicin, 40 μ g/ml Gentamycin und 100 μ g/ml Spectinomycin ausplattiert und über Nacht bei 28°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden gewachsene Kolonien separiert, vermehrt und auf eine erfolgreiche Transformation getestet. Die transformierten Agrobakterien wurden zur Transformation von Arabidopsis-Pflanzen oder -Zellen eingesetzt.

2.4.10. Transformation von Arabidopsis-Pflanzen

Die Transformation von *Arabidopsis thaliana* erfolgte nach dem Protokoll von Clough (2005) im „floral-dip“-Verfahren. Es wurden 3 bis 4 Wochen alte Pflanzen (2.2.1.) verwendet. Zuerst wurden transformierte Agrobakterien (2.4.9.3.) in 3 ml LB-Medium mit Selektionsantibiotika bei 28°C und 300 rpm angezogen. Diese Vorkultur wurde in 100 ml Selektions-LB-Medium gegeben und unter gleichen Bedingungen kultiviert bis eine OD₆₀₀ zwischen 0,4 und 0,6 erreicht wurde. Der Bakterienlösung wurden 3% (w/v) Saccharose und 0,03% (v/v) Silwet L-77 (Lehle Seeds, USA) hinzugefügt. Die Blüten der Pflanzen wurden für 1 min unter leichtem Schwenken in die Bakterienlösung gehalten. Zum Antrocknen der Bakterien wurden die Pflanzen auf Papiertücher gelegt und anschließend wie unter 2.2.1. beschrieben, gehalten. Nach 8 bis 9 Wochen konnten Samen geerntet werden.

Zur Selektion transgener Pflanzen wurden 5 d alte Keimlinge der T₁-Generation im Abstand von 2 d mit 200 μ M BASTA (Glufosinat Ammonium, AgrEvo, Berlin, Deutschland) besprüht. Nicht resistente Pflanzen starben nach zwei bis drei Behandlungen ab. Resistente Pflanzen zeigten einen normalen Wuchs. Diese wurden selektiert und auf eine erfolgreiche Transformation getestet. Nach 6 bis 7 Wochen konnte Saatgut der T₂-Generation geerntet werden.

2.4.11. Transformation von Arabidopsis-Zellkulturen nach der Tropf-Methode

Zur Herstellung von Strep-ABP1 Überexpressionslinien (2.4.8.) wurden Arabidopsis-Zellkulturen nach der Tropf-Methode (Rahmad, 2002) transformiert. Es wurden Oberflächenkulturen der Arabidopsis-Zellkulturen (2.2.2.) eine Woche nach dem Umsetzen im Wachstumsoptimum verwendet. Für die Transformation wurden diese in circa 1 cm Durchmesser großen Zellaggregaten subkultiviert. Transformierte Agrobakterien (2.4.9.3.) wurden in 3 ml LB-Medium mit entsprechenden Selektionsantibiotika über Nacht bei 28°C und 200 rpm angezogen und dann in 15 ml Medium subkultiviert bis eine OD₆₀₀ zwischen 0,4 und 0,6 erreicht wurde. Zur Transformation der Zellkultur wurde je ein Tropfen mit 20 bis 30 µl Agrobakterium-Suspension auf ein Zellaggregat gegeben. Agrobakterien und Arabidopsis-Zellkulturen wurden bei 25°C im Dunkeln für 2 d kokultiviert. Danach wurden die Oberflächenkulturen auf MSMO-Medium mit 300 mg/l Timentin (Duchefa Biochemie, Haarlem, Niederlande) umgesetzt. Während der folgenden 10 d wurden die Agrobakterien durch das Timentin abgetötet. Anschließend wurden die Zellkulturen auf Selektionsmedium mit 5 mg/l Hygromycin B (Duchefa Biochemie, Haarlem, Niederlande) und 300 mg/l Timentin für 14 d selektiert. Transformierte Zellen wuchsen zu Zellaggregaten von 3 bis 5 mm Durchmesser. Diese wurden auf Selektionsmedium mit 7,5 mg/l Hygromycin und 300 mg/l Timentin umgesetzt. Nach 14 d wurden die Zellaggregate auf MSMO-Medium mit 300 mg/l Timentin gehalten. Die erhaltenen Linien wurden über PCRs von genetischer DNA und translaterter RNA auf Transformation getestet.

2.5. Methoden zur Proteinanalyse

2.5.1. Herstellung von Proteinfractionen aus Pflanzenmaterial

Zur Identifizierung sowie Aufreinigung von ABP1 und Interaktionspartnern von ABP1 wurden Proteinfractionen aus Koleoptilen hergestellt. Hierfür wurden Mais- oder Reiskoleoptilen (2.2.3./2.2.4.) verwendet. Von den Koleoptilen wurde 1 cm unterhalb der 3 mm dekapitierten Spitze verwendet. Die folgenden Arbeitsschritte wurden auf Eis vorgenommen. Die Koleoptilstücke wurden grob zerkleinert und in 2 ml kalten Proteinextraktionspuffer mit je 1 µg/ml Aprotinin, Leupeptin und Pepstatin (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) pro g Frischgewicht gegeben. Dieses Gemisch wurde mit einem Ultra-Turrax (Janke und Kunkel, Staufen, Deutschland) fein zerkleinert, die entstandene Flüssigkeit über ein 100 µm Sieb filtriert und bei 1000 g für 20 min zentrifugiert. Der Überstand, die Gesamtfraction (G) wurde für Versuche verwendet, oder es wurden die Fractionen P8, P100 und Ü100 nach Watanabe *et al.* (2004) hergestellt. Für P8 wurde die Gesamtfraction für 20 min bei 8000 g zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde in Proteinextraktionspuffer gelöst

und entsprach P8. P100 wurde aus dem Pellet einer 1 h Zentrifugation bei 100000 g aus dem Überstand von P8 hergestellt. Der Überstand entsprach Ü100. Die Proteinmenge der Fraktionen wurde nach Bradford (2.5.2.) bestimmt.

Proteinextraktionspuffer nach Watanabe *et al.* (2004)

50 mM Hepes-NaOH

5 mM EDTA

400 mM Saccharose

pH 6,5 oder pH 7,5

2.5.2. Konzentrationsbestimmung nach Bradford

Die Konzentrationsbestimmung der Proteinfractionen erfolgte photometrisch nach Bradford (1976). Es wurde Roti-Quant (Roth, Karlsruhe, Deutschland) nach Gebrauchsanweisung verwendet.

2.5.3. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur eindimensionalen Auftrennung von Proteinfractionen wurde ein diskontinuierliches Gelsystem nach Lämmli (1970) verwendet. Das Sammelgel besaß eine Acrylamidkonzentration von 4,8% (v/v). Das Trenngel hatte eine Acrylamidkonzentration von 12,6% (v/v). Zur Denaturierung der Proteine wurden diese mit Probenpuffer für 1 min bei 96°C erhitzt. Es wurde ein Proteinstandard *Unstained Protein Molecular Weight Marker* (116 bis 14,4 kDa) von MBI Fermentas (Leon-Roth, Deutschland) verwendet. Die Elektrophorese erfolgte bei Raumtemperatur. Folgende Lösungen wurden verwendet:

Sammelgel

0,625 mM Tris, pH 6,6

4,8% (v/v) Acrylamid

0,004% (w/v) APS

0,0012% (v/v) TEMED

Trenngel

1,875 mM Tris, pH 8,8

12,6% (v/v) Acrylamid

0,015% (w/v) APS

0,0015% (v/v) TEMED

4x Probenpuffer

250 mM Tris, pH 6,8

40% (w/v) Glycerin

20% (v/v) β -Mercaptoethanol

4% (w/v) SDS

0,01% (w/v) Bromphenolblau

Laufpuffer nach Lämmli (1970)

25 mM Tris, pH 8,3

200 mM Glycerin

0,1% (w/v) SDS

2.5.4. Proteinfärbemethoden

2.5.4.1. Coomassie-Färbung

Mit der Coomassie-Färbemethode können 200 bis 400 ng Protein nachgewiesen werden (Chen *et al.*, 1993). Zur Färbung der Proteine mit Coomassie wurde die SDS-PAGE für 15 bis 20 min in der Färbelösung inkubiert. Anschließend wurde das Gel solange in Entfärbelösung gewaschen, bis Banden sichtbar wurden beziehungsweise keine Hintergrundfärbung mehr zu sehen war. Mehrmaliges Austauschen der Entfärbelösung war nötig. Das gefärbte Gel wurde zur Dokumentation eingescannt und/oder getrocknet.

Färbelösung

50% (v/v) Methanol

7% (v/v) Essigsäure

0,25% (w/v) Coomassie R 250

Entfärbelösung

40% (v/v) Methanol

7% (v/v) Essigsäure

3% (w/v) Glycerin

2.5.4.2. Silberfärbung

Mit der Silberfärbung nach Merril *et al.* (1981) können 5 bis 30 ng Protein nachgewiesen werden. Zur Fixierung der Proteine wurden SDS-PAGEs für mindestens 1 h in Entfärbelösung (2.5.4.1.) inkubiert. Das Gel wurde danach 3 x 15 min mit 50% (v/v) Ethanol

gewaschen und anschließend 20 s in 2 mM Natriumthiosulfatlösung inkubiert. Es folgten 3 x 20 s Waschschrte in ddH₂O und eine Inkubation von 20 min in der Färbelösung. Das Gel wurde nochmals 2 x für je 20 s mit ddH₂O gewaschen und anschließend in die Entwicklerlösung gegeben. Beim Sichtbarwerden von Proteinbanden wurde die Reaktion mit Entfärbelösung (2.5.4.1.) gestoppt. Zur Dokumentation wurde das gefärbte Gel eingescannt und/oder getrocknet.

Färbelösung

12 mM AgNO₃

0,15% (v/v) Formaldehyd, 37% (v/v)

Entwicklerlösung

566 mM Na₂CO₃

0,1% (v/v) Formaldehyd, 37% (v/v)

8 μM Na₂SO₃

2.5.4.3. Ponceaurot-Färbung

Zur reversiblen Färbung von Proteinen wurde die Ponceaurot-Färbung verwendet. Die Nachweisgrenze dieser Methode ist ab 50 ng Protein (Nakamura *et al.*, 1985). Die geblottete Nitrocellulose-Membran wurde durch ddH₂O gezogen und dann für circa 1 min in Ponceaurot-Färbelösung inkubiert. Anschließend wurde die Färbelösung mit ddH₂O abgespült. Die Proteinbanden des Standards wurden markiert. Die gefärbte Nitrocellulose-Membran wurde für Western-Blot-Analysen (2.5.5.) weiterverwendet.

Ponceaurot-Färbelösung

0,1% (w/v) Ponceau S

5% (v/v) Essigsäure

2.5.5. Western-Blot-Analyse

Der Western-Blot ermöglicht es, die über eine SDS-PAGE aufgetrennten Proteine auf eine Membran zu übertragen und dort die Proteine mit Antikörpern spezifisch zu detektieren (Towbin *et al.*, 1992). Um Proteine eines Acrylamidgels auf eine Nitrocellulose-Membran zu transferieren, wurde ein Semi-Dry-Elektroblotter (PEQLAB, Erlangen, Deutschland) verwendet. 6 Lagen Filterpapier wurden mit Anodenpuffer I getränkt und in der Blot-Apparatur gestapelt. Darauf wurden 3 mit Anodenpuffer II getränkte Filterpapiere gelegt. Die Nitrocellulose-Membran wurde zum Durchfeuchten in Anodenpuffer II gegeben und auf den Filterpapierstapel gelegt. Auf die Membran wurde die vorher mit Anodenpuffer II befeuchtete

SDS-PAGE (2.5.3.) gelegt. Darauf wurden 6 Lagen mit Kathodenpuffer getränktes Filterpapier gestapelt. Um eventuelle Luftblasen zu entfernen, wurde der Transferstapel mit einem Reagenzglas überrollt. Der Proteintransfer erfolgte mit 1 mA/cm² Membran für 1 h.

Anodenpuffer I

300 mM Tris, pH 10,4

20% (v/v) Methanol

Anodenpuffer II

25 mM Tris, pH 10,4

20% (v/v) Methanol

Kathodenpuffer

25 mM Tris, pH 5,6

4 mM 6-Aminocaprinsäure

20% (v/v) Methanol

2.5.6. Methoden zur Immunodetektion

ABP1 aus Proteinfractionen sollte über spezifische Antikörper detektiert werden. Hierzu wurden die Proteinfractionen in einer SDS-PAGE (2.5.3.) aufgetrennt, auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert (2.5.5.) und diese mit Ponceaurot gefärbt (2.5.4.3.). Zum Absättigen der nicht mit Proteinen gesättigten Bereiche der Membran wurde diese für 1 h in Block-Puffer inkubiert (Blot-Puffer mit 0,3% (w/v) Magermilchpulver und 0,03% (w/v) BSA).

Blot-Puffer (TBS)

100 mM Tris, pH 7,4

150 mM NaCl

2.5.6.1. Immunodetektion von ZmABP1 nach dem NBT-BCIP Verfahren

Über NBT-BCIP (Nitroblau Tetrazolium Chlorid und 5-Bromo-4-chloro-3-indolyolphosphat) sollte ZmABP1 aus Proteinfractionen von Maiskoleoptilen (2.5.1.) nachgewiesen werden. Die Nitrocellulose-Membranen wurden wie oben beschrieben vorbereitet. Zur Detektion von ZmABP1 wurde ein Anti-ZmABP1 Antikörper (freundlicherweise zu Verfügung gestellt von Prof. Dr. Jutta Ludwig-Müller, Technische Universität Dresden, Dresden, Deutschland) in einer Verdünnung von 1:5000 eingesetzt. Die Inkubation der Nitrocellulose-Membran erfolgte über Nacht bei 4°C. Der Antikörper wurde mit 3 x 10 min Waschschritten mit Blot-Puffer

entfernt. Die Inkubation mit dem sekundären Anti-Kaninchen IgG Antikörper (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) erfolgte in einer Verdünnung von 1:10000 für 1 h bei Raumtemperatur. Der Antikörper wurde mit 2 x 5 min und 2 x 10 min Waschen entfernt. Der Blot wurde für 2 min im NBT-BCIP-Puffer inkubiert und dann in die NBT-BCIP-Reaktionslösung (NBT-BCIP-Puffer mit 0,4 mg/ml NBT und 0,19 mg/ml BCIP) gegeben. Wurden Banden sichtbar, wurde die Farbreaktion durch das Überführen des Blots in ddH₂O beendet.

NBT-BCIP-Puffer

100 mM Tris, pH 9,5

100 mM NaCl

50 mM MgCl₂

2.5.6.2. Immunodetektion von AtABP1 mit dem ECL-Plus System

Das ECL-Plus System (GE Healthcare, Freiburg, Deutschland) wurde verwendet, um AtABP1 und Strep-ABP1 zu detektieren. Nitrocellulose-Membranen wurden wie unter 2.5.6. beschrieben vorbereitet. Nach dem Absättigen der nicht mit Proteinen gesättigten Bereiche der Membran wurde der Blot 2 x für 5 min in TBS-T gewaschen. Danach wurde er für 1 h mit dem primären Antikörper bei Raumtemperatur inkubiert. Als primärer Antikörper wurde der Anti-AtABP1 Antikörper in einer Verdünnung von 1:2500 bis 1:50000 eingesetzt. Das Anti-AtABP1-Antikörper-Serum wurde mit in *E. coli* überexprimiertem AtABP1 in Kaninchen hergestellt (PSL, Heidelberg, Deutschland). Das Serum wurde über eine Protein A HyperD 20 Säule (Beckmann, Fullerton, USA) aufgereinigt, wodurch reines IgG zur Detektion von AtABP1 vorlag. Die Arbeiten zur Herstellung des IgGs gegen AtABP1 wurden in der Arbeitsgruppe von Michael Motzkus durchgeführt. Der Antikörper wurde durch 2 x 5, 1 x 10 und 3 x 5 min Waschen mit TBS-T entfernt. Die Inkubation mit dem sekundären Anti-Kaninchen IgG Antikörper (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) erfolgte in einer Verdünnung von 1:50000 zusammen mit dem S-Protein HRP (Horse-raddisch peroxidase, GE Healthcare, Freiburg, Deutschland) 1:20000 verdünnt und für 1 h bei Raumtemperatur. Durch 2 x 5 min, 1 x 10 min und 3 x 5 min Waschen mit TBS-T wurde ungebundener Antikörper und S-Protein HRP entfernt. Zur Detektion des Antikörpers wurde nach Angaben des Herstellers vorgegangen. Es wurde Hyperfilm™ (GE Healthcare, Freiburg, Deutschland) zur Detektion verwendet. Die Entwicklung des Films erfolgte mit einem automatischen Röntgenfilmentwickler (CURIX von AGFA, Köln, Deutschland). Je nach Stärke des Signals konnte ein weiterer Film für eine längere oder kürzere Zeit auf dem Blot exponiert und erneut entwickelt werden.

Sollte der Blot mit einem weiteren Antikörper behandelt werden, wurde er für 1 h in

100 mM Glyzin-Lösung, pH 2,9 inkubiert, gewaschen, erneut geblockt und mit entsprechendem Antikörper oder HRP-Strep-Tactin (2.5.6.3., IBA, Göttingen, Deutschland) wie beschrieben behandelt.

Blot-Puffer (TBS-T)

100 mM Tris, pH 7,4

150 mM NaCl

0,01% (w/v) Tween 20

2.5.6.3. Immunodetektion von Strep-tag II mit dem ECL-Plus System

Strep-ABP1 sollte auch über den Strep-tag II mit HRP-Strep-Tactin (IBA, Göttingen, Deutschland) detektiert werden. In diesem Fall wurde der vorher mit Ponceaurot gefärbte Blot (2.5.4.3.) mit 3% (w/v) BSA ohne Magermilchpulver in TBS-T (2.5.6.2.) für 1 h geblockt. Der Blot wurde anschließend 3 x 5 min mit TBS-T gewaschen. Die in Proteinfractionen von Pflanzenmaterial vorkommenden biotinylierten Proteine wurden mit 1 µg/ml Avidin (IBA, Göttingen, Deutschland) blockiert (Witte *et al.*, 2004). Zur Detektion des Strep-tag II wurde der Blot 1 h bei Raumtemperatur mit HRP-Strep-Tactin inkubiert. Dieses wurde in einer Verdünnung von 1:50000 verwendet. Durch 2 x 5 min, 1 x 10 min und 3 x 5 min Waschen mit TBS-T wurde ungebundenes HRP-Strep-Tactin entfernt. Die Detektion wurde wie unter 2.5.6.2. beschrieben mit dem ECL-PLUS System vorgenommen.

2.5.7. Methoden zur Affinitätschromatographie

Über Affinitätschromatographie können Proteine über interagierende Bereiche an eine Matrix gekoppelt, somit aus einer Proteinfraction isoliert und anschließend durch Elution aufgereinigt werden. Die interagierenden Bereiche können Bestandteil der Matrix sein oder der Matrix nachträglich angefügt werden. Beide Varianten wurden verwendet.

2.5.7.1. Aufreinigung von ZmABP1 C-Terminus-bindenden Proteinen

Zur Aufreinigung von mit dem C-Terminus von ZmABP1 interagierenden Proteinen wurden die letzten 15 Aminosäuren von ZmABP1 mit der Sequenz FVWDEDCEFAAKDEL synthetisiert (PSL, Heidelberg, Deutschland) und als Interaktionsdomäne an eine Matrix gebunden (C-Terminus Säule). Es wurde Toyoperl AF-Tresyl 650 M (TosoHaas, Stuttgart, Deutschland) als Säulenmaterial verwendet. Dieses geht spezifische Bindungen mit freien Amino- und Thiogruppen ein und hat eine Ligandenbindungskapazität von 80 µMol pro g Trockengewicht.

Es wurden 250 mg Säulenmaterial mit 5 mg C-terminalem Peptid gekoppelt. Hierzu wurde nach dem Protokoll des Herstellers vorgegangen. Zusätzlich wurde eine Kontrollsäule ohne gebundenes C-terminales Peptid hergestellt. So konnte zwischen Proteinen, die an das Säulenmaterial und Proteinen, die an den C-Terminus banden, unterschieden werden. An den C-Terminus bindende Proteine sollten aus Proteinfraktionen von Mais-beziehungsweise Reiskoleoptilen isoliert werden (2.5.1.). Es wurde die Gesamtfraction verwendet. 1 bis 2 mg Protein wurden pro Säule aufgetragen und für 4 h auf einem Überkopfschüttler (5 rpm, 120° Neigungswinkel) bei Raumtemperatur inkubiert. Ungebundene Proteine wurden mit 20 ml Waschpuffer-W (Watanabe *et al.*, 2004) entfernt. Zur Elution der interagierenden Proteine wurde ein Salz-Sprung (Waschpuffer-W mit 1 M NaCl) und ein pH-Sprung (pH-Sprung-Elutionspuffer mit 0,1 M Glycin, pH 2,5 und Neutralisationspuffer mit 1 M Tris, pH 9,5) verwendet. Für eine bessere Auftrennung der interagierenden Proteine wurde ein Salzgradient verwendet. Durch die sukzessive Zugabe von 50, 100, 200, 500 und 1000 mM NaCl zu Waschpuffer-W wurde ein aufsteigender Salzgradient aus fünf Schritten hergestellt. Wasch- und Elutionsschritte wurden aufgefangen und mit Zentrifugalkonzentratoren (Vivaspin 0,5 ml, 5 MWCO, VIVASCIENCE, Hannover, Deutschland) auf ein Volumen von 50 µl eingengt. Zur Identifizierung der Proteine, die an die Kontrollsäule banden, wurden Salzgradienten von 50 und 1000 mM NaCl eingesetzt. Die eluierten Proteine wurden über eine SDS-PAGE (2.5.3.) aufgetrennt. Die Gele wurden mit Coomassie (2.5.4.1.) oder Silber (2.5.4.2.) gefärbt. In einer Kooperation mit Prof. Dr. Karsten Niehaus (Universität Bielefeld, Bielefeld, Deutschland) wurden ausgesuchte Proteinbanden über Massenspektrometrie analysiert und Proteine identifiziert.

Waschpuffer-W nach Watanabe *et al.* (2004)

50 mM Hepes-NaOH

5 mM EDTA

0,4 M Saccharose

pH 7,5

2.5.7.2. Aufreinigung von Strep-ABP1 und damit interagierende Proteine

Mit Hilfe des Strep-tag/Strep-Tactin Systems sollten Strep-ABP1 (2.4.8.) und dadurch an ABP1 bindende Proteine aufgereinigt werden. Strep-tag II (Skerra und Schmidt, 2000; www.iba-go.com) bindet an das Streptavidin-Derivat Strep-Tactin. Diese Interaktion basiert auf der Bindung von Biotin an Streptavidin. Strep-tag II kann von Strep-Tactin mit Biotin oder Desthiobiotin eluiert werden (Skerra und Schmidt, 2000; www.iba-go.com). An Strep-tag II gekoppeltes AtABP1 und daran bindende Proteine sollten über Strep-Tactin Sepharose und mit Hilfe von Strep-Tactin Zentrifugationssäulen aufgereinigt werden.

Mehrere putative Arabidopsis Strep-ABP1 Überexpressionslinien (2.4.11.) wurden verwendet. Proteinfractionen wurden aus Suspensionskulturen 7 d nach der Subkultur hergestellt (2.5.1.). 0,5 g filterpapiergetrocknete Zellmasse wurde in flüssigem Stickstoff gemörsert und anschließend mit 1 ml Extraktionspuffer versetzt. Um die in Pflanzen vorkommenden biotinylierten Proteine zu blockieren, wurden 100 µg/ml Avidin verwendet (Witte *et al.*, 2004). Nach einer Inkubation von 5 min auf Eis wurde 20 min bei 4°C und 1000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde zur Isolierung von Strep-ABP1 und interagierenden Proteinen verwendet. Der Proteingehalt der verschiedenen Proben wurde über Bradford (2.5.2.) bestimmt. Sollten verschiedene Zelllinien verglichen werden, wurden jeweils gleiche Proteinmengen je Säule verwendet.

Zur Aufreinigung von Strep-ABP1 und damit interagierenden Proteinen wurden Strep-tag Zentrifugationssäulen (IBA, Göttingen, Deutschland) nach Angaben des Herstellers verwendet. Ebenso wurde zur Aufreinigung Strep-Tactin Sepharose (IBA, Göttingen, Deutschland) genutzt. Hierfür wurden Säulen mit 1 ml Strep-Tactin Sepharose hergestellt (Renner GmbH, Dannstadt, Deutschland). Alle Arbeitsschritte mit der Säule erfolgten im Kühlraum bei 4°C. Die Präparation der Säule, die Elution bindender Proteine und die Regeneration der Säule erfolgten nach Angaben des Herstellers. Proteine wurden mit Desthiobiotin sowie mit Biotin eluiert. Alle Wasch- und Elutionsschritte wurden aufgefangen und mit Zentrifugalkonzentratoren auf ein Volumen von 20 µl eingengt. Als Kontrolle und zur Identifizierung von Proteinen, die unspezifisch (nicht über Biotin oder Strep-tag II) an die Säule banden, wurde neben Proteinfractionen der Strep-ABP1 Überexpressionslinien auch eine Wildtyp Arabidopsis-Zelllinie untersucht. Die eluierten Proteine wurden über eine SDS-PAGE aufgetrennt (2.5.3.). Die Gele wurden mit Coomassie (2.5.4.1.) oder Silber (2.5.4.2.) gefärbt. Ebenso wurden Immunodetektionen von Strep-ABP1 und ABP1 vorgenommen (2.5.6.).

2.6. Funktionelle Analysen von ABP1

2.6.1. Volumenänderung von Protoplasten

Steffens und Lüthen (2000) entwickelten eine Methode, mit der die schnelle Volumenänderung von Protoplasten nach Effektorzugabe ermittelt werden kann. Diese wurde zur Untersuchung des ABP1 Signalweges genutzt. Die Isolierung der Protoplasten sowie die Messung der Volumenänderung erfolgten wie beschrieben in Steffens und Lüthen (2000).

Neben der Maissorte Garant wurde auch die Sorte B73 verwendet. Zur Herstellung von Protoplasten wurden Koleoptilen von B73 70 s lang mit Siliciumcarbid-Pulver aufgeraut.

In der Enzymlyösung zur Herstellung der Protoplasten wurde Cellulase `Onozuka R-10` statt `Onozuka R-S` verwendet. In Versuchen zur Kaliumabhängigkeit wurde der pH-Wert des Waschpuffers mit 100 mM BIS TRIS auf pH 6,5 eingestellt. Zur Beobachtung der Protoplasten wurde ein Inversmikroskop (Diavert von Leica, Wetzlar, Deutschland) mit 32 facher Vergrößerung verwendet. Die Versuche wurden bei einer Lichtstärke von 150 μM Photonen/ m^2s bei $20^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ durchgeführt. Für einen Versuch wurden bis zu 8 Protoplasten mit einem Durchmesser von circa 30 μm beobachtet. Die Protoplasten wurden innerhalb 1 h auf Vitalität geprüft. Darauf erfolgte die Zugabe von Effektoren. Die Beobachtung der Protoplasten wurde für bis zu 2 h fortgesetzt. Während des Versuches wurden alle 5 oder 10 min Bilder von jedem Protoplasten aufgenommen (Coolpix 4500, Nikon, Tokio, Japan). Anhand der Bilder und den Programmen ImageJ (Wayne Rasband, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>, National Institute of Health, USA, Version 1.25) und Origin 6.0 (OriginLab Corporation, Northampton, USA) wurde das Volumen der Protoplasten zum jeweiligen Zeitpunkt ermittelt. Nach Steffens und Lüthen (2000) wurden die Änderungen des Protoplastenvolumens über die Zeit als Nettovolumenänderung in Prozent in Abhängigkeit von der Zeit berechnet und dargestellt. Die verwendeten Effektoren sind in Tabelle 3 aufgeführt.

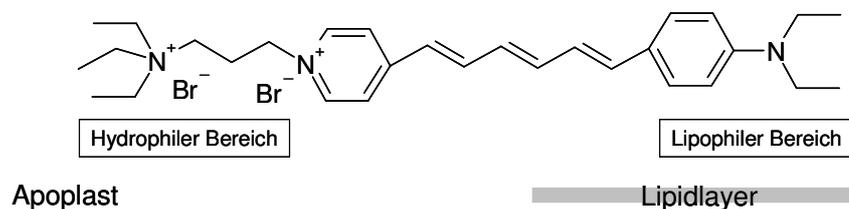
Tabelle 3: Effektoren der Protoplastenversuche. Die Effektoren wurden in Waschpuffer (Steffens und Lüthen, 2000) gelöst.

Effektor	Quelle	Endkonzentration [M]
Indol-3-essigsäure, IAA	Merck (Darmstadt, Deutschland)	10^{-5}
Indol-3-acetonitril, IAN	Merck (Darmstadt, Deutschland)	10^{-5}
2-Naphtylessigsäure, 2-NAA	Merck (Darmstadt, Deutschland)	10^{-5}
Antikörperfragment scFv12	Dr. Catherine Perrot-Rechenmann (CNRS, Gif-sur-Yvette, Frankreich)	8×10^{-8}
C-terminales Peptid (FVWDEDCFEAAKDEL)	PSL (Heidelberg, Deutschland)	10^{-6}
Kontrollpeptid (ECDKLFADFEWVD)	PSL (Heidelberg, Deutschland)	10^{-6}
Phytosulfokin- α , PSK- α	BioSyntan (Berlin, Deutschland)	5×10^{-11} bis 10^{-9}
Unsulfatiertes Pentapeptid, dsPSK	BioSyntan (Berlin, Deutschland)	10^{-10}
PSK-Aminosäurengemisch, I, 2x Y, Q, T	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)	10^{-9}

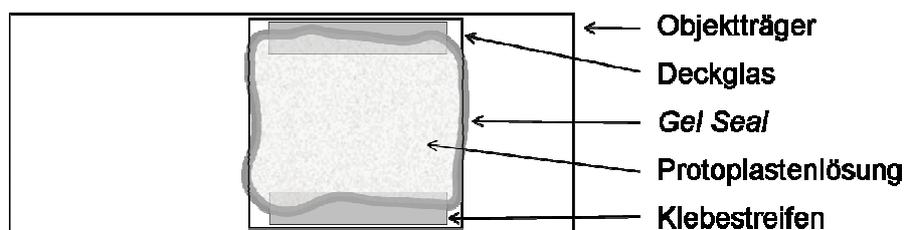
2.6.2. Untersuchungen zum Zyklisieren der Plasmamembran

Es sollte untersucht werden, ob ABP1 einen Einfluss auf das Zyklisieren der Plasmamembran

beziehungsweise des Membransystems der Zelle besitzt. Hierzu wurden die in Tabelle 3 beschriebenen Effektoren herangezogen. Um Veränderungen im Membransystem beobachten zu können, wurde ein spezifischer Membranfarbstoff FM4-64 (N-(3-triethylammoniumpropyl)-4-(p-diethylaminophenyl)hexatrienyl)-pyridium dibromid), Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) verwendet. FM4-64 gehört zur Familie der Sterylpyridium-Farbstoffe (Abbildung 5), ist wasserlöslich und fluoresziert nur in lipophiler Umgebung. Bei einer Anregung bei 488 nm fluoresziert der Farbstoff rot bei 620 bis 650 nm. FM4-64 wird über die Plasmamembran aufgenommen und gelangt über Endozytose in das Membransystem der Zelle.

FM4-64**Abbildung 5:** Strukturformel von FM4-64 und seine Ausrichtung in der Plasmamembran.

Das Zyklieren der Plasmamembran wurde an Maisprotoplasten untersucht. Die Herstellung der Protoplasten erfolgte nach Steffens und Lüthen (2000). Zur Beobachtung wurde ein konfokales Laser Scanning Mikroskop (CLSM, TCS SP mit Ar-Laser von Leica, Wetzlar, Deutschland) verwendet. Spezielle Objektträger wurden vorbereitet (Abbildung 6), um erstens einen festen Abstand zwischen Objektträger und Deckglas zu gewährleisten und um zweitens die Verdunstung des Protoplastenpuffers und damit eine Austrocknung der Protoplasten über die Zeit zu verhindern. Hierfür wurde an zwei gegenüberliegenden Seiten ein circa 1,5 cm langer und circa 3 mm breiter Klebestreifen befestigt und anschließend ein dünner Film von *Gel Seal* (silikonartiges Schmiermittel, GE Healthcare, Freiburg, Deutschland) im Quadrat aufgetragen (Abbildung 6).

**Abbildung 6:** Schematische Darstellung der modifizierten Objektträger.

Für einen Versuch wurde Protoplastenlösung in das begrenzende Quadrat aus *Gel Seal*

gegeben. 5 min nach der Zugabe eines Effektors (Tabelle 3) wurde der Farbstoff in einer Endkonzentration von 8 μM appliziert. Anschließend wurde der Versuchsraum mit einem Deckglas verschlossen. Einzelne Protoplasten wurden über einen Zeitverlauf von 60 min beobachtet, wobei alle 10 min mit dem CLSM (Vergrößerung: 40x, Laserleistung: 11%, Anregungswellenlänge: 488 nm, Bereich der Emissionsdetektion: 610 bis 650 nm) Bilder aufgenommen wurden. Abhängig von der Größe der Protoplasten setzte sich ein Bild aus bis zu 20 Z-Schnitten zusammen, welche mit dem Programm LCS (Leica Confocal Software, Leica, Wetzlar, Deutschland) aufgenommen und bearbeitet wurden. Zur Auswertung wurden Protoplastenbilder nach unterschiedlicher Effektorapplikation verglichen.

2.6.3. Phänotypische Untersuchungen von Zellkulturen

Die hergestellten putativen Strep-ABP1 Überexpressionslinien sollten in Bezug auf Zellkern- und Zellaggregatgröße untersucht werden. Die Untersuchung der Zellkerngröße erfolgte an Strep-ABP1 Überexpressionslinien (2.4.11.) sowie an der Wildtyp-Zelllinie. Hierzu wurden Suspensionszellen 7 d nach der Subkultur verwendet. Es wurden 500 μl der Suspensionskultur in ein Reaktionsgefäß gegeben und mit 1% (v/v) DMSO und 0,004% (w/v) DAPI (4,6-Diamino-2-phenylindole dihydrochlorid, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) vermischt. Die gefärbten Kerne wurden mit einem CLSM (TCS SP mit Ar-Laser von Leica, Wetzlar, Deutschland) bei 40 facher Vergrößerung und einer Anregungswellenlänge von 360 nm beobachtet und dokumentiert (Leica Bildverarbeitungssoftware LCS). Anhand der aufgenommenen Bilder und dem Programm ImageJ (Wayne Rasband, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>, National Institute of Health, USA, Version 1.25) wurde die sichtbare Fläche der Zellkerne in μm^2 bestimmt.

Arabidopsis-Zellkulturen wachsen in Suspension durch Zellteilung in Zellaggregaten. Diese Aggregate teilen sich durch Fragmentierung ab einer bestimmten Größe, so dass eine Population von unterschiedlich großen Zellaggregaten vorkommt. Die Größe dieser Population sollte bestimmt und zwischen verschiedenen Zelllinien verglichen werden. Hierzu wurden Suspensionszellen 7 d nach der Subkultur verwendet. Es wurden Bilder von den Zellaggregat-Populationen mit einem Inversmikroskop (Diavert von Leica, Wetzlar, Deutschland) bei 10 facher Vergrößerung mit einer Digitalkamera (Coolpix 4500, Nikon, Tokio, Japan) aufgenommen. Die sichtbare Fläche der einzelnen Aggregate wurde mit dem Programm ImageJ (Wayne Rasband, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>, National Institute of Health, USA, Version 1.25) in μm^2 bestimmt.

Ebenso wurde der Ploidiegrad der Zelllinie über ein Durchflusscytometer (DFC, Coulter Epics XL, Krefeld, Deutschland) bestimmt. Es wurden Zellkerne von Wildtyp-Zellkulturen mit transformierten Zelllinien verglichen. Hierzu wurden 7 d alte Flüssigkulturen

verwendet. Um das Medium von den Zellen zu entfernen, wurden diese in einem 100 µm Sieb aufgefangen, kurz auf Filterpapier gesetzt und danach bei -20°C eingefroren. Circa 0,5 g gefrorenes Zellmaterial wurde mit 2 ml Propidiumjodidlösung (Sauter, 1997) mit einer Rasierklinge fein zerhackt. Die Suspension wurde durch ein 30 µm Sieb gegeben. Die Lösung mit angefärbten Kernen wurde aufgefangen und für die Messung im DFC verwendet. Um den relativen DNA-Gehalt zu bestimmen, wurden circa 10000 Kerne pro Messung eingesetzt.

2.6.4. P_{AtABP1} :GUS Expressionsanalysen

Die Aktivität des *AtABP1* Promotors sollte über GUS-Analysen untersucht werden. Es wurde ein putativer Promotorbereich von 1582 bp mit Hilfe von www.arabidopsis.org ermittelt. Die Amplifikation des Promotorfragmentes erfolgte stromaufwärts des Startkodons. Die dafür verwendeten Oligonukleotide *AtABP1*-P-R und *AtABP1*-P-F sind in Tabelle 1 aufgeführt. Klonierungen wurde mit dem Gateway System durchgeführt (2.4.9.). Als Destinationsvektor wurde *pBWGFS7* verwendet (Tabelle 2). Er besitzt hinter dem eingefügten Promotorfragment von *AtABP1* das *uid* Gen, welches für β -Glucuronidase kodiert. Arabidopsis-Pflanzen wurden über *Agrobacterium tumefaciens* im „floral dip“-Verfahren transformiert und transformierte Pflanzen selektiert (2.4.10.).

Zur Untersuchung der Promotoraktivität wurden Arabidopsis-Keimlinge im Alter von bis zu 6 d verwendet. Die Keimlinge wurden unter sterilen Bedingungen, wie unter 2.2.1. beschrieben, im Licht wie auch etioliert angezogen. Um den Einfluss von Auxin auf die Aktivität des *AtABP1* Promotors zu untersuchen, wurden Keimlinge auf Medium mit 10 µM 1-NAA und 10 µM NPA (1-N-Naphthylphalat, Duchefa Biochemie, Haarlem, Niederlande) angezogen. Ebenso wurden Blüten von Arabidopsis-Pflanzen untersucht.

Die GUS-Färbung von Keimlingen und Blüten erfolgte nach Weigel und Glazebrook (2002). Pflanzenmaterial wurde in 90%igem (v/v) Aceton gesammelt und für 20 min inkubiert. Anschließend wurde das Aceton durch einen Waschschrift mit 50 mM Na-Phosphatpuffer pH 7,2 entfernt und das Pflanzenmaterial in GUS-Färbelösung 24 h bei 37°C inkubiert. Die Farbreaktion wurde durch Entfernen der GUS-Färbelösung und Waschen in 40% (v/v) Ethanol gestoppt. Chlorophyll im Pflanzenmaterial wurde durch eine aufsteigende Ethanolreihe (bis zu 90%) entfernt. Zur Klärung und Lagerung wurde das Gewebe in Klärlösung eingebettet und bei 4°C gelagert. Die Dokumentation der Färbung erfolgte mit Hilfe eines Inversmikroskops (Diavert von Leica, Wetzlar, Deutschland) und einer Coolpix 4500 Digitalkamera (Nikon, Tokio, Japan).

GUS-Färbelösung

50 mM Na-Phosphatpuffer, pH 7,2

0,1% (w/v) Triton X-100

1 mM $K_3Fe(CN)_6$

1 mM $K_4Fe(CN)_6$

1 mM 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -D-Glucuronid (X-Gluc)

Klärösung

67% (w/v) Chloralhydrat

11% (w/v) Glyzerin

2.7. Verwendete Computerprogramme und Datenbankrecherchen

Die Größen von Zellkernen, Protoplasten und Zellaggregaten wurden über das Programm ImageJ (Wayne Rasband, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>, National Institute of Health, USA, Version 1.25) ermittelt. Die Auswertung von Daten und Erstellung von Grafiken erfolgte über Origin 6.0 (OriginLab Corporation, Northampton, USA). Mit dem CLSM aufgenommene Bilder wurden mit LCS (Leica Confocal Software, Leica, Wetzlar, Deutschland) bearbeitet. Mit der Coolpix Kamera (Nikon, Tokio, Japan) erstellte Bilder wurden mit Photoshop CS2 (Adobe System Inc., San Jose, USA) bearbeitet.

Informationen zur genomischen Sequenz, zu Expressionsdaten und Proteinsequenzanalysen wurden über BioEdit 7.0.5. (Ibis Therapeutics, Carlsbad, Kanada), ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>) ExPASy (<http://au.expasy.org/sprot/>), Genevestigator (<http://www.genevestigator.ethz.ch/at/>), National Center of Biotechnology (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), *Secondary structure prediction* (SSpro, <http://www.ics.uci.edu/%7Ebaldig/scratch/>), The Arabidopsis Information Resource (TAIR, <http://www.arabidopsis.org>) und Tcoffee (http://igs-server.cnrs-mrs.fr/Tcoffee/tcoffee_index.cgi) ermittelt.

Zur statistischen Absicherung wurde eine ANOVA und Tukey-Tests mit dem Programm Minitab (minitab Inc., State Collage Pennsylvania, USA) durchgeführt. Es wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $P < 0,05$ angenommen.

3. Ergebnisse

3.1. P_{AtABP1}:GUS Expressionsanalysen

Über die Expression von Protein kodierenden Genen, in welchen Geweben und in welchen Entwicklungsstadien ihre Promotoren aktiv sind, ist es teilweise möglich Rückschlüsse auf ihre Funktion beziehungsweise ihre Aktivität zu ziehen. Die Expression von *AtABP1* wurde über Microarray-Analysen untersucht (Genevestigator, www.genevestigator.ethz.ch/at/). Microarray-Daten deuten auf sehr schwache aber ubiquitäre Expression im gesamten Entwicklungszyklus von Arabidopsis hin. In Zellkulturen und Blütenstielen wurden deutlich höhere Expressionen nachgewiesen. Um die Aktivität des Promotors von *AtABP1* zellspezifisch untersuchen zu können, wurden P_{AtABP1}:GUS-Pflanzen hergestellt. Es wurde ein Promotorbereich von 1582 bp stromaufwärts des Startkodons ausgewählt. 6 von 10 P_{AtABP1}:GUS-Linien zeigten eine Glucuronidaseaktivität. 5 Linien wurden auf die Aktivität des *AtABP1*-Promotors untersucht. 2 bis 6 d alte Keimlinge wurden unter Langtagbedingungen und im Dunkeln angezogen. Ebenso wurden 5 Wochen alte Pflanzen mit Blüten und Schoten untersucht. Exemplarisch werden Bilder einer Promotor:GUS-Linie mit für alle Linien typischen Färbungen gezeigt. P_{DR5}:GUS-Mutanten wurden zum Vergleich herangezogen. In P_{DR5}:GUS-Pflanzen werden auf Grund eines synthetisch hergestellten Promotors mit 7 Auxin-responsiven Elementen (AuxRE) Zellen angefärbt, die auf Auxin mit einer schnellen auxininduzierten Genexpression antworten (Ulmasov *et al.*, 1997).

Unter Langtag angezogene Keimlinge beginnen nach 2 d mit der Streckung des Hypokotyls (Abbildung 7A und B). Eine *AtABP1*-Promotor-Aktivität war in einzelnen Zellen im Hypokotyl zu beobachten (Abbildung 7A). Im Vergleich dazu war in der P_{DR5}:GUS-Mutante Promotor-Aktivität in der Wurzelspitze und im Zentralzylinder zu erkennen (Abbildung 7B). In 3 d alten Keimlingen war eine Aktivität des *AtABP1*-Promotors in den Kotyledonen und in jungen sich entwickelnden Blättern zu finden (Abbildung 7E). In den Kotyledonen war der Promotor nicht im Bereich der Hydathoden aktiv, anders als bei P_{DR5}:GUS-Pflanzen (Abbildung 7E, F). Eine DR5-Aktivität konnte nach 3 d in den Spitzen junger sich entwickelnder Blätter beobachtet werden. Im Alter von 4 d zeigten P_{AtABP1}:GUS-Keimlinge eine zusätzliche Promotor-Aktivität in Lateralwurzelpromordien (Abbildung 8). Die Aktivität des *AtABP1*-Promotors in Lateralwurzelpromordien wurde bei keiner anderen Behandlung und in keinem anderen Entwicklungsstadium beobachtet. Nach 5 d ließ die Aktivität des *AtABP1*-Promotors in den Kotyledonen nach. In sich entwickelnden Blättern war sie im Bereich des sich entwickelnden Leitgewebes gut erkennbar (Abbildung 7M). Im Vergleich dazu zeigte sich P_{DR5}:GUS-Aktivität in Hydathoden und an den Rändern der Kotyledonen, in den Spitzen sich entwickelnder Blätter und in den Stipulen (Abbildung 7N). Bei 6 d alten

Keimlingen war die P_{AtABP1} :GUS-Aktivität in den Kotyledonen nur noch schwach im Bereich hinter den Hydathoden und in sich entwickelnden Blättern als Linie von der Spitze bis zur Basis zu sehen (Abbildung 7Q). DR5-Pflanzen zeigten im beobachteten Versuchszeitraum keine weiteren entwicklungsabhängigen Veränderungen in der Promotor-Aktivität (Abbildung 7R). In 10 d und 6 Wochen alten Pflanzen mit Blüten und Schoten konnte keine P_{AtABP1} :GUS-Aktivität nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

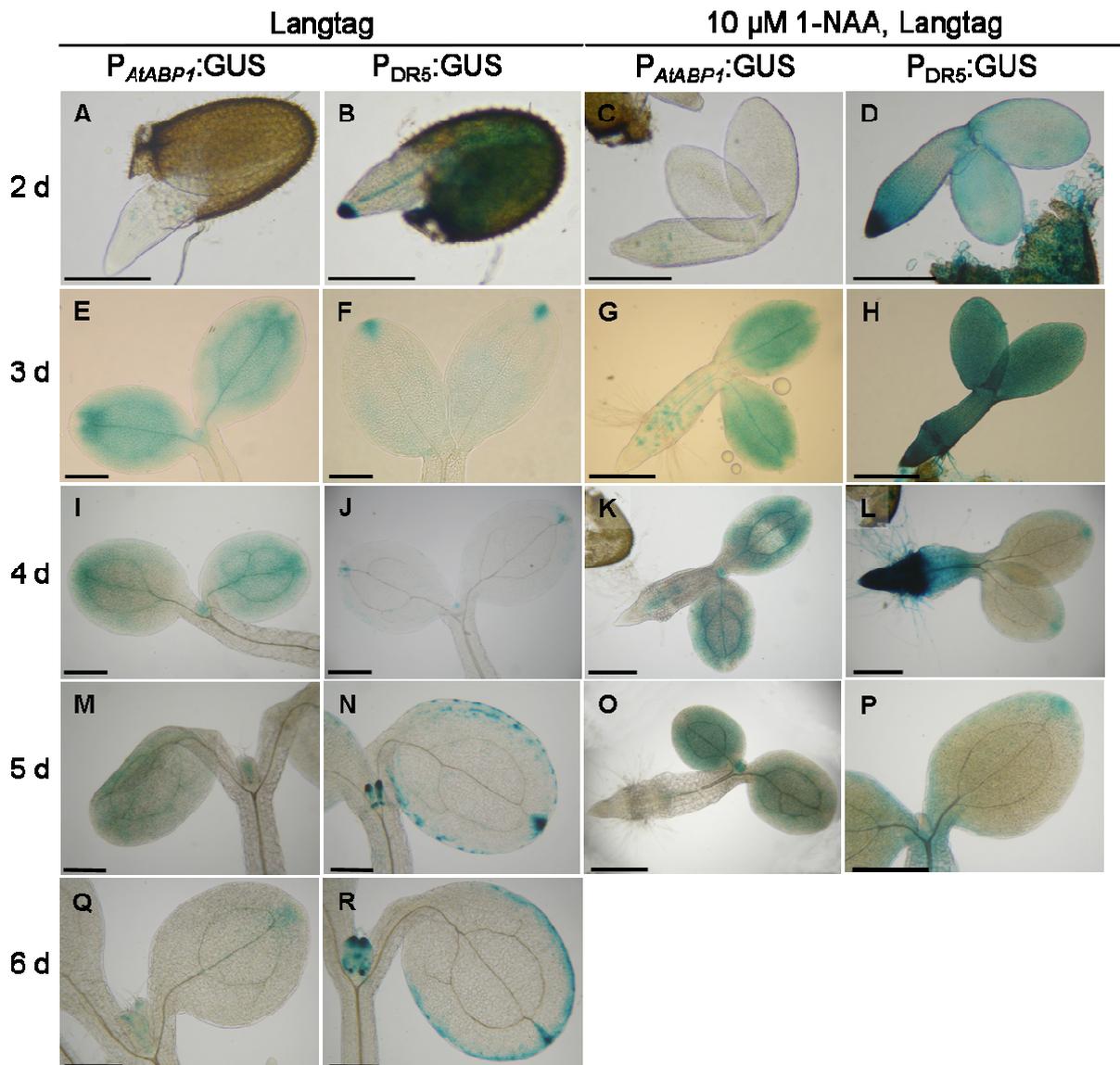


Abbildung 7: P_{AtABP1} :GUS Untersuchungen an 2 bis 6 d alten Arabidopsis-Keimlingen. Keimlinge wurden unter Langtagbedingungen mit (C, D, G, H, K, L, O, P) und ohne 10 μ M 1-NAA (A, B, E, F, I, J, M, N, Q, R) angezogen. Zum Vergleich wurden gleich alte P_{DR5} :GUS-Keimlinge dargestellt. P_{AtABP1} :GUS A, C, E, G, I, K, M, O und Q. P_{DR5} :GUS B, D, F, H, J, L, P und R. Die Balken entsprechen 200 μ m.

Um zu testen, ob die Promotoraktivität von *AtABP1* durch Auxin beeinflusst wird, wurden Keimlinge auf 10 μM 1-NAA unter Langtagbedingungen angezogen (Abbildung 7). Nach 3 d wurden Veränderungen in der *AtABP1*-Promotor-Aktivität beobachtet. Neben dem bekannten Aktivitätsmuster in den Kotyledonen und in sich entwickelnden Blättern war eine zusätzliche Aktivität in einzelnen Zellen des Hypokotyls und der Primärwurzel zu sehen (Abbildung 7G). Nach 4 d und 5 d war eine P_{AtABP1} :GUS-Aktivität im Zentralzylinder im basalen Bereich des Hypokotyls und in der Wurzelhaarzone nachweisbar (Abbildung 7K, O). Die DR5-Promotor-Aktivität wurde durch 1-NAA, wie erwartet, verstärkt. In Keimlingswurzeln zeigte P_{DR5} :GUS die stärkste Aktivität (Abbildung 7D, H, L).

Die Expressionsmuster von P_{AtABP1} :GUS und P_{DR5} :GUS unterschieden sich grundlegend. In den Kotyledonen scheinen sie sogar gegensätzlich exprimiert zu werden. Der *AtABP1*-Promotor wird schwach jedoch spezifisch durch Auxin aktiviert.

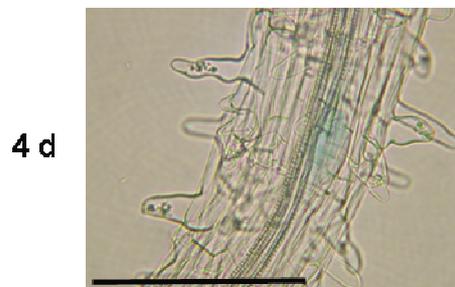


Abbildung 8: Detailaufnahme der Primärwurzel einer 4 d alten, im Langtag angezogenen P_{AtABP1} :GUS-Mutante. Gefärbt ist ein Lateralwurzelpremordium. Der Balken entspricht 200 μm .

Etiolierte Keimlinge der P_{AtABP1} :GUS- und P_{DR5} :GUS-Linien zeigten nach 2 d das gleiche Expressionsmuster wie Keimlinge, die unter Langtagbedingungen angezogen wurden (Abbildung 7 und 9). Nach 3 d war in P_{AtABP1} :GUS-Keimlingen eine starke Färbung in den Kotyledonen, außer in den Hydathoden und eine schwache Färbung in jungen sich entwickelnden Blättern zu beobachten. Zusätzlich war der *AtABP1*-Promotor auch im Leitgewebe des apikalen Hakens aktiv (Abbildung 9E). Im Vergleich dazu wurde die Aktivität vom P_{DR5} :GUS neben den schon bekannten Bereichen nach 3 d und 4 d im unteren Bereich des apikalen Hakens beobachtet (Abbildung 9F, J). Eine P_{AtABP1} :GUS-Aktivität im apikalen Haken konnte dagegen in 4 d alten Keimlingen nicht mehr nachgewiesen werden (Abbildung 9I). Auf 10 μM 1-NAA angezogene etiolierete Arabidopsis-Keimlinge zeigten das gleiche Expressionsmuster (Abbildung 9) wie Keimlinge, die unter Langtagbedingungen mit 10 μM 1-NAA angezogen wurden (Abbildung 7).

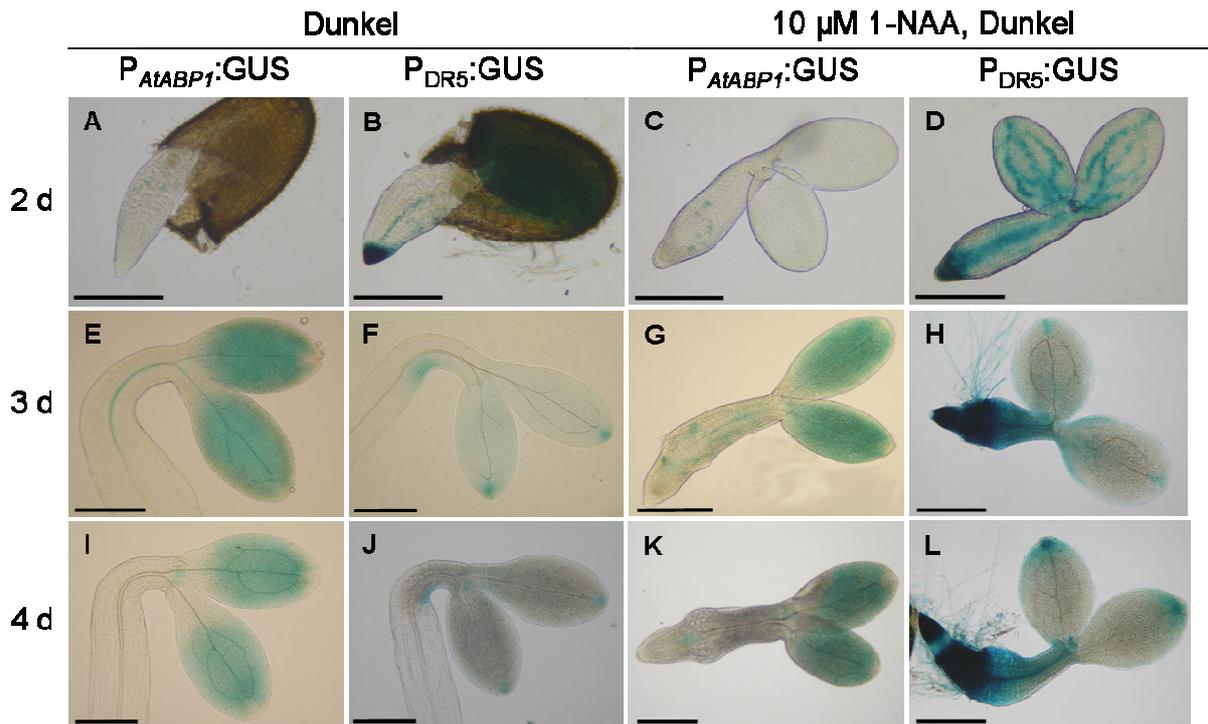


Abbildung 9: $P_{AtABP1}:GUS$ Untersuchungen an 2 bis 4 d alten etiolierten Arabidopsis-Keimlingen. Keimlinge wurden im Dunkeln mit (C, D, G, H, K, L) und ohne 10 μ M 1-NAA (A, B, E, F, I, J) angezogen. Zum Vergleich wurden gleich alte $P_{DR5}:GUS$ Keimlinge dargestellt. $P_{AtABP1}:GUS$ A, C, E, G, I und K. $P_{DR5}:GUS$ B, D, F, H, J und L. Die Balken entsprechen 200 μ m.

Neben dem schon bekannten Expressionsmuster induzierte 1-NAA eine zusätzliche Aktivität von $P_{AtABP1}:GUS$ in Bereichen des Hypokotyls und der Wurzel. In 3 d alten Keimlingen waren verstärkt einzelne Zellen des Hypokotyls und der Wurzel gefärbt. Nach 4 d war die Färbung auf den Zentralzylinder dieser Bereiche konzentriert. 3 d alte Keimlinge zeigten unter diesen Anzuchtbedingungen vereinzelt eine Krümmung des Hypokotyls. Bei gekrümmten $P_{AtABP1}:GUS$ -Keimlingen war eine asymmetrische Verteilung der angefärbten Zellen zu beobachten. Nur auf der gekrümmten Seite des Hypokotyls, nicht auf der gestreckten, war eine Aktivität des *AtABP1*-Promotors zu beobachten (Abbildung 10).



Abbildung 10: 3 d alter, etiolierter auf 10 μ M 1-NAA angezogener $P_{AtABP1}:GUS$ -Keimling. Der Keimling zeigt die vereinzelt auftretende Krümmung des Hypokotyls. Eine asymmetrische Verteilung der gefärbten Zellen ist auf der gekrümmten Seite zu beobachten. Der Balken entspricht 200 μ m.

Etiolierte P_{DR5} :GUS- und P_{AtABP1} :GUS-Keimlinge zeigten insgesamt ein unterschiedliches Expressionsmuster. Der *AtABP1*-Promotor wurde schwach durch Auxin induziert. Im Hypokotyl und in der Primärwurzel, wo ein starkes DR5-Signal zu beobachten war, zeigte sich auch eine schwache P_{AtABP1} :GUS-Aktivität.

Der Auxin-Transportinhibitor 1-N-Naphthylphthalat (NPA) hemmt spezifisch den polaren Transport von Auxin. Es kommt zu einer Anreicherung von Auxin am Bildungsort und einer Verarmung am Wirkort (Reed *et al.*, 1998; Ponce *et al.*, 2005). Es wurde untersucht, ob NPA einen Einfluss auf die *AtABP1*-Promotoraktivität besitzt (Abbildung 11). Eine Behandlung mit 10 μ M NPA veränderte kaum das Expressionsmuster von P_{AtABP1} :GUS-Keimlingen im Vergleich zu der Promotor-Aktivität von Keimlingen, die ohne NPA angezogen wurden (Abbildung 7). Das gleiche galt für P_{DR5} :GUS-Keimlinge. Allerdings war die Promotoraktivität von DR5 in Kotyledonen stärker (Abbildung 11B, D, F). 3 d und 6 d alte P_{DR5} :GUS-Keimlinge zeigten zusätzlich eine Aktivität im apikalen Bereich des Hypokotyls (Abbildung 11B, D, F). Durch die NPA-Behandlung lag dort eine erhöhte Auxinkonzentration vor, da durch NPA der Transport spezifisch gehemmt wird. P_{AtABP1} :GUS-Keimlinge zeigten nach 3 d eine Färbung von einzelnen Zellen im apikalen Bereich des Hypokotyls (Abbildung 11A, C) und etiolierte 6 d alte Keimlinge eine Aktivität im Leitbündel im Bereich der Auxin-Akkumulation (Abbildung 11E).

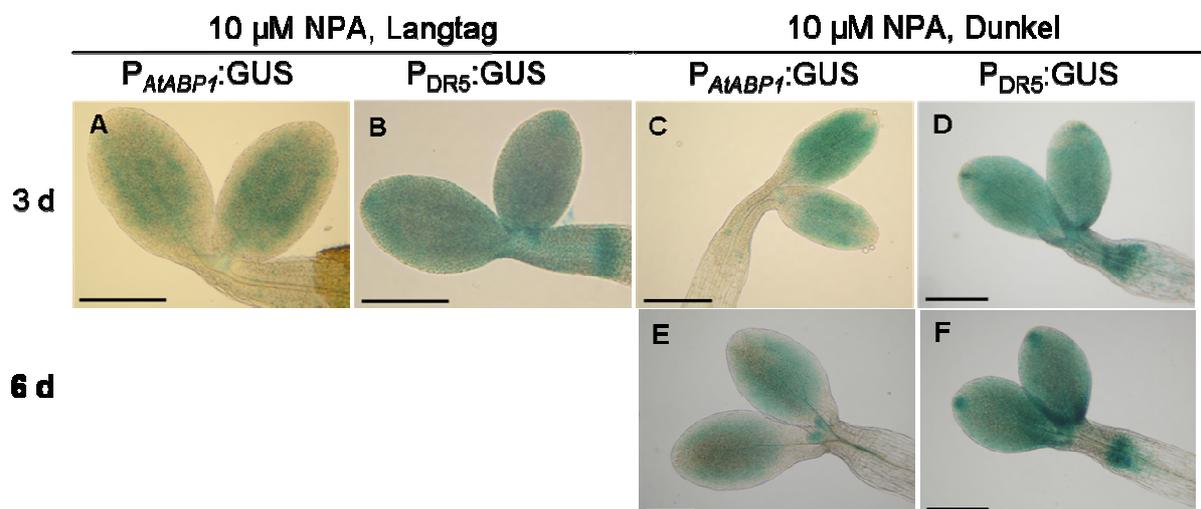


Abbildung 11: Einfluss des Auxin-Transportinhibitors NPA auf die Aktivität von P_{AtABP1} :GUS und P_{DR5} :GUS. 3 d alte Keimlinge wurden unter Langtagbedingungen (A, B), 3 d und 6 d Keimlinge im Dunkeln (C, D, E, F) angezogen. P_{AtABP1} :GUS A, C und E. P_{DR5} :GUS B, D und F. Die Balken entsprechen 200 μ m.

Eine NPA-Behandlung führte im Vergleich zu unbehandelten Keimlingen nur zu einer geringen Veränderung im Expressionsmuster von P_{AtABP1} :GUS. Die Expression von P_{DR5} :GUS wurde vor allem in den Kotyledonen verstärkt. Im apikalen Bereich des Hypokotyls, wo der Transport von Auxin gestört war, wurden bei P_{AtABP1} :GUS-Keimlingen

einzelne Zellen angefärbt. Dieses Promotoraktivitätsmuster ähnelt abgeschwächt dem der 1-NAA behandelten 3 d alten Keimlinge, die in Bereichen des Hypokotyls und der Primärwurzel einzelne gefärbte Zellen aufwiesen (Abbildung 9G). In beiden Fällen könnte eine erhöhte Auxinkonzentration die ABP1-Promotoraktivität induziert haben.

Zusammengefasst war der *ABP1*-Promotor in wachsenden Kotyledonen aktiv, nicht aber im Bereich der Hydathoden. Ebenso zeigte sich eine Aktivität in jungen, sich entwickelnden Blättern. In der Primärwurzel war die P_{AtABP1} :GUS-Aktivität auf Lateralwurzelprimordien beschränkt. Eine Aktivität in Blütenstielen, die durch Genevestigator vorhergesagt wurde, konnte nicht beobachtet werden. In etiolierten Keimlingen war eine Aktivität des *AtABP1*-Promotors auch im Leitbündel des apikalen Hakens zu beobachten. Eine Behandlung mit 1-NAA führte zu einer P_{AtABP1} :GUS-Aktivität im Hypokotyl- und Wurzelbereich. Bei 3 d alten Keimlingen waren dies einzelne Zellen, später war der Zentralzylinder teilweise gefärbt. NPA induzierte eine Färbung im apikalen Bereich des Hypokotyls. Bei 3 d alten Keimlingen waren es vereinzelte Zellen, bei 5 d alten etiolierten Keimlingen zeigte sich Promotor-Aktivität im Leitgewebe. Die von 1-NAA und NPA induzierte Aktivität des *AtABP1*-Promotors wurde in Geweben beobachtet, in denen eine erhöhte Auxinkonzentration vorhanden war. Diese wurde durch den auxinsensitiven DR5-Promotor angezeigt. Ansonsten unterschied sich die P_{DR5} :GUS-Aktivität von der des *AtABP1*-Promotors. Der *AtABP1*-Promotor wird scheinbar schwach, jedoch spezifisch durch Auxin induziert. Durch ergänzende RT-PCR-Versuche und Northern-Blot-Analysen könnte dies bestätigt werden.

3.2. Identifizierung von Proteinen, die mit ABP1 interagieren

Über die Identifizierung von Interaktionspartnern von ABP1 sollte dessen Funktion näher charakterisiert werden. Zum einen sollten interagierende Proteine, die an den C-Terminus binden, aufgereinigt werden. Zum anderen sollte, um keine mögliche Interaktionsdomäne auszuschließen, das gesamte ABP1-Protein zur Aufreinigung seiner Interaktionspartner verwendet werden.

3.2.1. Nachweis von ZmABP1 in Maiskoleoptilen

Um mit ABP1 interagierende Proteine aus Maiskoleoptilen aufzureinigen, musste zuerst nachgewiesen werden, ob in Proteinfractionen aus Maiskoleoptilen ZmABP1 mit einer theoretischen Größe von 22 kDa vorhanden war und somit auch dessen mögliche Interaktionspartner. Es wurden verschiedene Proteinfractionen verwendet. Der aus Maiskoleoptilen hergestellte Proteinextrakt wurde mit 1000 g zentrifugiert, um Zellreste zu

entfernen. Die Proteine des Pellets wurden als Gesamtfraction (G) bezeichnet. Der Überstand wurde mit 8000 g zentrifugiert und das resuspendierte Pellet als P₈ bezeichnet. Aus dem Überstand von P₈ wurden über eine Zentrifugation mit 100000 g Fraktionen aus dem resuspendierten Pellet (P₁₀₀) und dem Überstand vom P₁₀₀ (Ü) hergestellt. In der P₁₀₀-Fraktion sollten sich vor allem Membranvesikel befinden. Nach der Auftrennung der Proteine über eine SDS-PAGE konnte über den Anti-ZmABP1 Antikörper das Protein in allen Fraktionen nachgewiesen werden (Abbildung 12B). Proteinbanden sind in unterschiedlicher Intensität in allen Fraktionen bei einer Größe um 22 kDa zu erkennen. Am stärksten waren die Proteinbanden der Gesamtfraction G und im Membranpellet P₁₀₀ gefärbt. Dies entspricht der gezeigten Lokalisation von ABP1 im ER (Henderson *et al.*, 1997). In Abbildung 12A ist eine coomassiegefärbte SDS-PAGE gezeigt.

Obwohl in den Proteinfractionen, die bei einem pH-Wert von 6,5 isoliert wurden, weniger ZmABP1 nachgewiesen wurde, wurde diese Isolationsmethode für weitere Versuche verwendet. Unter sauren Bedingungen ist die Bindung von IAA an ABP1 somit auch eine Interaktion von ABP1 mit anderen Proteinen wahrscheinlicher (Löbler und Klämbt, 1985).

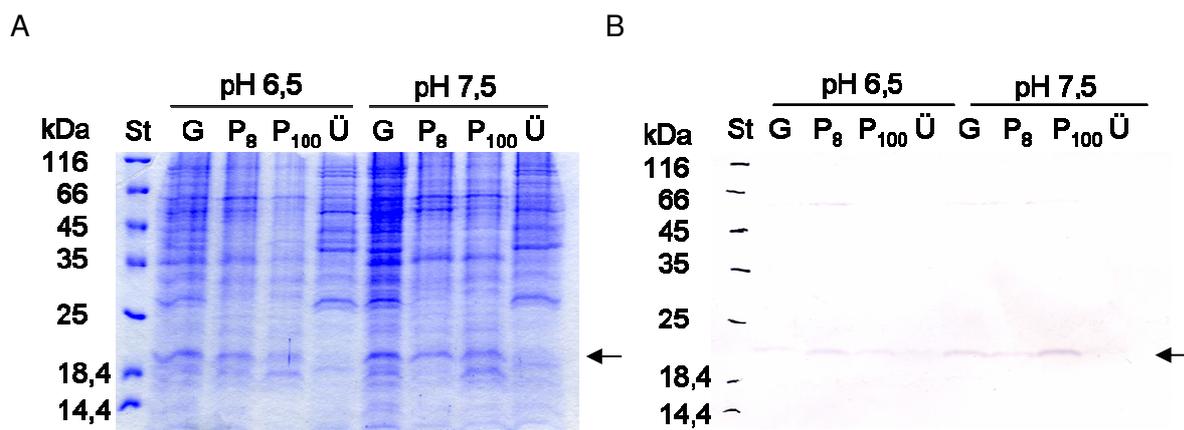


Abbildung 12: Nachweis von ZmABP1 in verschiedenen Proteinfractionen von Maiskoleoptilen über Western-Blot. Proteinfractionen von Maiskoleoptilen wurden in Puffer mit pH-Werten von 6,5 oder 7,5 hergestellt und in eine SDS-PAGE aufgetrennt. Proteinbanden mit ABP1-entsprechenden Größe wurden mit einem Pfeil markiert. **A** Coomassiegefärbte SDS-PAGE. **B** Western-Blot mit Anti-ZmABP1 Antikörper. Nachweis über NBT-BCIP. St: Standard, G: Gesamtfraction, P₈ und P₁₀₀ resuspendiertes Pellet nach Zentrifugation bei 8000 g oder 100000 g, Ü: Überstand von P₁₀₀.

3.2.2. Identifizierung von ABP1-Interaktionspartnern über das C-terminale Peptid von ZmABP1 als Interaktionsdomäne

Vorherige Untersuchungen zeigten, dass der C-Terminus wahrscheinlich eine Domäne von ABP1 ist, die für die Signalweiterleitung wichtig ist (Thiel *et al.*, 1993; Leblanc *et al.*, 1999;

Steffens *et al.*, 2001). In dieser Arbeit wurde an Protoplasten von Maiskoleoptilen gezeigt, dass das C-terminale Peptid FVWDEDCFEAAKDEL von ABP1 alleine ausreichte, um einen auxinähnlichen Effekt zu induzieren (3.3.4.). Das Peptid war demzufolge ausreichend, um eine Reizweiterleitung zu bewirken. Es wurde aus diesem Grund ausgewählt, um über Affinitätschromatographie mit ABP1 interagierende Proteine aufzureinigen.

3.2.2.1. Ermittlung optimaler Bedingungen zur Aufreinigung von interagierenden Proteinen mit dem C-Terminus

Das C-terminale Peptid von ABP1 wurde an die Matrix einer Toyoperl AF-Tresyl 650 M Säule gekoppelt. Anschließend wurde getestet, wieviel Waschpuffer nötig war, um nichtgebundene Proteine zu entfernen und mit welcher Methode Proteine möglichst schonend eluiert werden konnten.

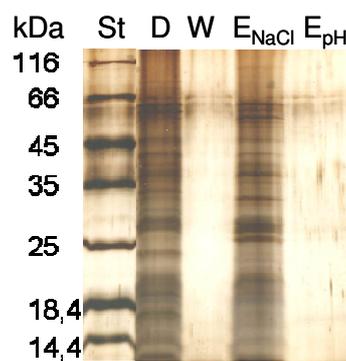


Abbildung 13: Optimierung der Aufreinigung von an den C-Terminus von ZmABP1 bindenden Proteinen. Gesamtextrakt von Maiskoleoptilen wurde auf die mit dem C-Terminus gekoppelte Säule aufgetragen. Die Säule wurde mit Waschpuffer-W gewaschen und Proteine über einen Salz- und anschließend einen pH-Sprung eluiert. Proteinfraktionen der Eluate wurden über eine SDS-PAGE aufgetrennt und über eine Silberfärbung sichtbar gemacht. St: Standard, D: Durchfluss, W: letzter Waschschrift, E_{NaCl} : 1 M NaCl Salzsprung, E_{pH} : pH-Sprung von pH 6,5 zu pH 2,5.

20 ml Waschpuffer-W genügte, um alle ungebundenen Proteine zu entfernen (Abbildung 13). Diese Menge wurde für weitere Versuche zum Waschen verwendet. Nach gängiger Methode werden die an die Säule bindenden Proteine durch einen pH-Sprung eluiert. Hierfür wird ein pH von 2,5 verwendet, wodurch alle bindenden Proteine gelöst werden. Dieser stark saure pH kann die eluierten Proteine zum Teil degradieren. Eine weitere Möglichkeit ist die Elution mit hohen Salzkonzentrationen wie 1 M NaCl. Bei dieser Methode können die Proteine nicht beschädigt werden. Beide Methoden wurden getestet, um die bindenden Proteine vom C-Terminus zu lösen. Erst wurde mit 1 M NaCl und anschließend mit 0,1 M Glycin bei pH 2,5 eluiert. Mit 1 M NaCl (E_{NaCl}) konnten alle interagierenden Proteine eluiert

werden. In der Fraktion des anschließenden pH-Sprungs (E_{pH}) wurden keine Proteine mehr nachgewiesen (Abbildung 13). In weiteren Versuchen wurde für die Elution NaCl mit einer Konzentration bis 1 M verwendet.

3.2.2.2. Aufreinigung von C-Terminus-bindenden Proteinen

Mit einem NaCl-Gradienten von 50 bis 1000 mM (E_{50} bis E_{1000}) konnten Proteine unterschiedlicher Bindungsstärke von der Säule eluiert werden. In Abbildung 15A sind aufgereinigte Proteine aus der Gesamtfraction von Maiskoleoptilen zu sehen. Als Kontrolle wurden Proteine über eine Säule aufgetrennt, die aus dem Säulenmaterial bestand, an die aber kein C-terminales Peptid gekoppelt war. Darüber wurden die Proteine identifiziert, die eine Bindungsaffinität für das Säulenmaterial besaßen. Nur Proteinbanden, die ausschließlich an die mit dem C-Terminus gekoppelte Säule banden, wurden als spezifisch mit dem C-Terminus interagierend eingestuft. Die spezifisch gebundenen Proteine zeigten unterschiedlich hohe Bindungsaffinität zum C-Terminus (Abbildung 15).

Um die an den C-Terminus bindenden Proteine identifizieren zu können, wurden Proteine von Reis- statt von Maiskoleoptilen verwendet. Der Vorteil von Reis (*Oryza sativa*) ist, dass das Genom im Gegensatz zu Mais vollständig sequenziert ist und Proteine über die Aminosäuresequenz leichter identifiziert werden können. Reis und Mais gehören beide zu den Gräsern. Über einen Homologievergleich wurde ein potentielles ABP1 Protein aus *Oryza sativa ssp indica* ermittelt. Das hypothetische Protein OsI_037307 (EAY83348) wurde als OsABP1 bezeichnet. OsABP1 ist zu 79% mit ZmABP1 identisch (Abbildung 14). Der C-Terminus von OsABP1 besitzt die hochkonservierten Aminosäuren, die in allen bislang identifizierten ABP1 Proteinen in Pflanzen gefunden wurden (Abbildung 14). Durch die verwandtschaftliche Nähe sollten gleiche Proteine mit ABP1 interagieren.

```

ZmABP1  MAPDLSELAAAAAARGAYLAGVGVAVLLAASE-LPVAES-SCVDRDNSLVRDLSOMPOSSYCTEGLSHITV
OsABP1  -----MKYPGQPQ-----EIPVFONSTETIPVNDPHORIPDNSLVKDVSKMYOSNYCREGFSHITI

ZmABP1  AGALNHGMKEVEVWLQTI SPGQRTPIHRHSCEEVFTVLKKGKTL LMGSSSLKYPGQPQEIPVEFONTFFSI
OsABP1  AGALAHGMKEVEVWLQTFGPGQRTPIHRHSCEEIFVVLKKGKTL LMGSSSLKYPGQPQEIPVEKNSTFSV

ZmABP1  PVNDPHQVWNSDEHEDLQVLVLIISRPPAKIEFLYDDWSMPHTAAVLKFPFVWDEDCEFAAKDEL
OsABP1  PVNDPHQVWNSDEHEDLQVLVLIISRPPVKIFLYDDWSMPHTAAKLKFPFVWDEDCLPAPKDEL
                                     *** * ****
                                     C-Terminus

```

Abbildung 14: Vergleich der Sequenzen von ZmABP1 (P13689) und OsABP1 (EAY83348) über ein Aligment in BioEdit. Der C-Terminus ist rot umrahmt. Aminosäuren, die mit * markiert sind, sind in allen bekannten ABP1s konserviert (Vergleich Abbildung 3).

Abbildung 15B zeigt das Bandenmuster von an den C-Terminus bindenden Proteinen aus der Gesamtfraktion von Reiskoleoptilen. Drei Proteinbanden aus der Mais- und der Reiskoleoptilfraktion scheinen vergleichbare Größen um 75 kDa (E_{200}), 55 kDa (E_{500}) und 42 kDa (Mais E_{100} , Reis E_{200}) zu besitzen.

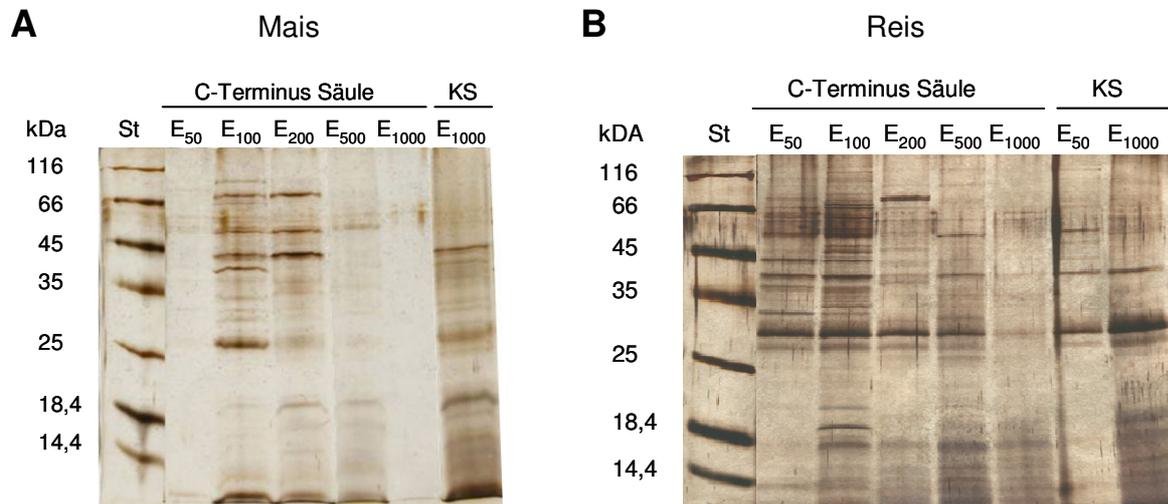


Abbildung 15: Aufreinigung von Proteinen aus Mais- und Reiskoleoptilen, die spezifisch an den C-Terminus von ZmABP1 binden. Proteine wurden über einen Salzgradienten eluiert, in eine SDS-PAGE aufgetrennt und über eine Silberfärbung angefärbt. **A** Proteine aus Maiskoleoptilen. **B** Proteine aus Reiskoleoptilen. KS: Kontrollsäule, St: Standard, E₅₀: 50 mM NaCl Eluat, E₁₀₀: 100 mM NaCl Eluat, E₂₀₀: 200 mM NaCl Eluat, E₅₀₀: 500 mM NaCl Eluat, E₁₀₀₀: 1000 mM NaCl Eluat.

3.2.2.3. Identifizierung von Proteinen aus Reis, die an den C-Terminus von ZmABP1 binden

Um die eluierten Proteine über Massenspektrometrie (MS) analysieren zu können, war eine bessere Auftrennung der einzelnen Proteinbanden nötig. Außerdem wurden größere Proteinmengen eingesetzt. Ausgangsmaterial für die MS-Analyse waren coomassiegefärbte Proteine. Zu analysierende Proteinbanden wurden vorher über eine silbergefärbte SDS-PAGE ausgewählt. Unspezifisch bindende Proteine wurden anhand der von einer Kontrollsäule eluierten Proteine identifiziert und nicht berücksichtigt (Abbildung 16).

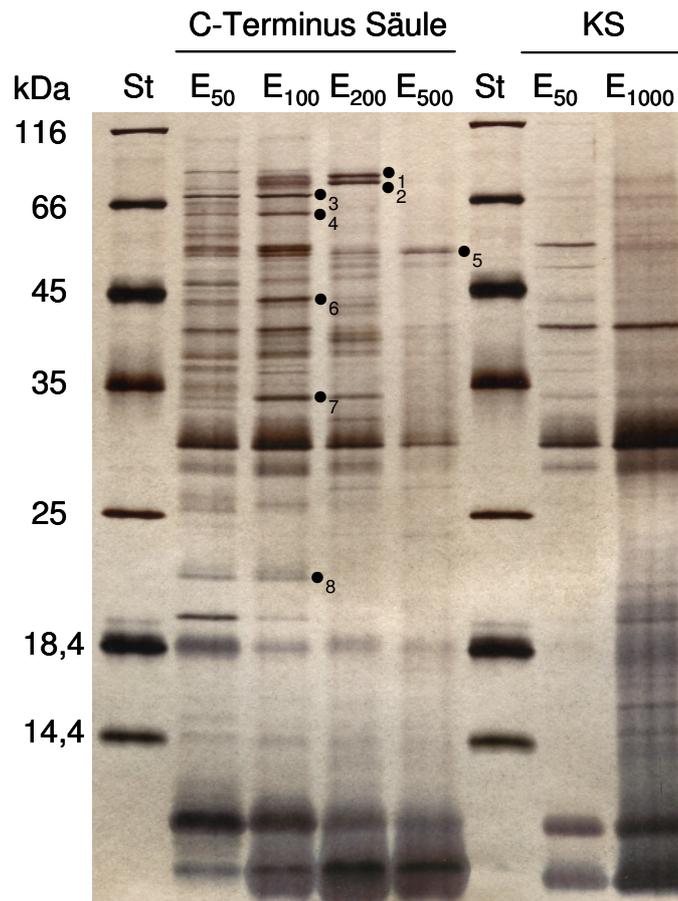


Abbildung 16: Auftrennung von spezifisch und unspezifisch bindenden Proteinen aus dem Gesamtextrakt von Reiskoleoptilen. Gesamtprotein wurde über eine Säule mit gekoppeltem C-Terminus von ZmABP1 (C-Terminus) oder über eine Säule ohne gekoppeltem Peptid (Kontrolle) aufgetrennt. Die Elution der Proteine erfolgte über einen Salzgradienten. Die Proteine wurden silbergefärbt. Mit • sind Proteinbanden markiert, welche einer massenspektrometrischen Analyse unterzogen wurden. St: Standard, E₅₀: 50 mM NaCl Eluat, E₁₀₀: 100 mM NaCl Eluat, E₂₀₀: 200 mM NaCl Eluat, E₅₀₀: 500 mM NaCl Eluat, E₁₀₀₀: 1000 mM NaCl Eluat.

Es wurden 8 Proteinbanden zur Analyse ausgewählt (Abbildung 16) und in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Karsten Niehaus (Universität Bielefeld, Bielefeld, Deutschland) analysiert. Es konnten 5 Proteine mit einer Peptidabdeckung von über 70% identifiziert werden (Tabelle 4). Zu den aus Reis identifizierten Proteine zählten das peroxisomale Fettsäure β -Oxidationsprotein, die putative Format-Tetrahydrofolat Ligase, die putative ATP-Citratlyase α Untereinheit, das putative Auxin- und Ethylen-regulierte Protein AER (*auxin and ethylene regulated*) und die putative 12-Oxophytodienoat Reduktase.

Tabelle 4: Proteine aus Reiskoleoptilen, die an den C-Terminus von ZmABP1 binden. Dargestellt ist, in welcher Elutionsfraktion das Protein gefunden wurde und der Proteinname mit Akzessionsnummer.

Banden Nr.	Elutionsfraktion NaCl [mM]	Proteinname und Akzessionsnummer (Swiss-Prot Datenbank)
2	200	Peroxisomales Fettsäure β -Oxidationsprotein (Q6K7T9)
3	100	Putative Format-Tetrahydrofolat Ligase (Q67UE5)
4	100	Putative ATP-Citratlyase α Untereinheit (Q93VT8)
5	500	Putatives Auxin- und Ethylen-reguliertes Protein (Q6YYV8)
6	100	Putative 12-Oxophytodienoat Reduktase (Q6Z965)

Zusätzlich wurde über die Aminosäuresequenz der identifizierten Proteine die mögliche Lokalisation in der Zelle ermittelt. Es wurde verglichen, in welchem Kompartiment sich ABP1 und in welchem sich seine möglichen Interaktionspartner befinden. Hierfür wurden die Programme PSORT Prediction, PENCE Proteome Analyst und Multi Loc verwendet. Alle drei Programme errechneten für ZmABP1 eine Lokalisation im ER mit den Wahrscheinlichkeiten 0,8 (PSORT), 1 (PENCE) und 0,6 (Multi Loc). PSORT unterscheidet zwischen ER-Lumen und -Membran. Die Lokalisationsvorhersage für ZmABP1 ist im ER-Lumen, weiterhin liegt ZmABP1 mit einer Wahrscheinlichkeit von 0,65 an der Plasmamembran vor (PSORT).

Das peroxisomale Fettsäure β -Oxidationsprotein ist ein sogenanntes Multifunktionsprotein und wurde von Chuong *et al.* (2002) beschrieben. In Peroxisomen ist es an der β -Oxidation von Fettsäuren beteiligt (Preisig-Müller *et al.*, 1994; Mullen, 2002). Ebenso wurde gezeigt, dass es mRNA und kortikale Mikrotubuli binden kann und an der Bewegung der Peroxisomen beteiligt sein könnte (Chuong *et al.*, 2002, 2005). Die Lokalisation des peroxisomalen Fettsäure β -Oxidationsproteins ist mit einer Wahrscheinlichkeit von 0,7 (PSORT) die ER-Membran, mit 0,5 (PSORT) das Cytoplasma, mit 1 (PENCE) und 0,8 (Multi Loc) das Peroxisom. Eine Interaktion mit ABP1 ist aufgrund der vorhergesagten Lokalisation nicht auszuschließen.

Die putative Format-Tetrahydrofolat Ligase aus Reis ist zu 85% identisch mit der 10-Formyltetrahydrofolat Synthetase aus Arabidopsis. Beide Folat-Coenzyme sind an der Übertragung eines Kohlenstoffs und an der Purinbiosynthese beteiligt sind (Prabhu *et al.*, 1996; Moore und King, 2003). Das Protein ist mit einer Wahrscheinlichkeit von 0,7 in der Plasmamembran (PSORT), mit 0,98 (PENCE) und 0,94 (Multi Loc) im Cytoplasma lokalisiert. Aufgrund der Funktion und der Lokalisation erscheint eine Interaktion mit ABP1 als unwahrscheinlich.

Die putative ATP-Citratlyase α Untereinheit aus Reis ist zu 92% identisch mit der ATP-Citratlyase B-2 aus Arabidopsis. Sie ist Bestandteil der ATP-Citratlyase (ACL), einem

Heterooktamer aus den Untereinheiten a und b. Das cytosolische Enzym ACL katalysiert die ATP-abhängige Reaktion von Citrat und CoA zu Acetyl-CoA. ACL scheint den cytosolischen „Pool“ von Acetyl-CoA zu generieren (Fatland *et al.*, 2002, 2005). Die Lokalisation im Cytosol wurde auch über die Programme PENCE mit einer Wahrscheinlichkeit von 0,99 und Multi Loc mit 0,8 bestätigt. PSORT dagegen berechnet eine Lokalisation im Zellkern mit einer Wahrscheinlichkeit von 0,76. Die Lokalisation und Funktion der putativen ATP-Citratlyase a Untereinheit weisen auf keine Interaktion mit ABP1 hin.

Über das putative Auxin- und Ethylen-regulierte Protein (AER) ist wenig bekannt. Über die Proteinaktivitätsvorhersage-Programme InterPro und Pfam wurden Transferasedomänen im AER identifiziert. Das AER-Gen wurde aus einer cDNA-Bank von Auxin-behandelten Tabakkeimlingen als eines der frühen induzierten auxinregulierten Gene identifiziert und wird ebenfalls durch die Ethylenvorstufe 1-Aminocyclopropan-1-Carboxylsäure induziert (Baully *et al.*, 2002). Die Lokalisationsvorhersagen ergaben mit einer Wahrscheinlichkeit von 1 (PENCE) eine Lokalisation im Cytosol, auch PSORT und Multi Loc wiesen auf eine Lokalisation im Cytosol hin, allerdings nur mit einer geringen Wahrscheinlichkeit (PSORT: 0,45, Multi Loc: 0,3). Auch wenn die Expression von AER auxininduziert ist, lassen sich aufgrund der Lokalisation und der unbekanntenen Funktion keine Aussagen über eine Interaktion mit ABP1 machen. Allerdings besaß AER die höchste Affinität zu dem C-Terminus von ABP1 und konnte erst mit 500 mM NaCl eluiert werden.

Die putative 12-Oxophytodienoat Reduktase (OPR) aus Reis ist zu 87% identisch mit der OPR aus Mais. Es gibt zwei Subgruppen der OPR. Subgruppe I ist in der Signaltransduktion bei der Pathogenabwehr involviert. Für Subgruppe II ist gezeigt, dass die Signaltransduktion über die Jasmonsäuresynthese erfolgt. OPR katalysiert hier NADPH-abhängig die Reduktion von 12-Oxophytodienoatsäure (OPDA) zu 3-Oxo-2-[(Z)-2'-Pentyl]Cyclopentan-1-Octanoic Säure (OPC-8:0). OPC-8:0 ist ein Vorläufermolekül der Jasmonsäure (Schaller und Weiler, 1997; Sobajima *et al.*, 2002; Strassner *et al.*, 2002). Die Lokalisationsvorhersagen gaben mit einer Wahrscheinlichkeit von 0,45 (PSORT) und 0,76 (Multi Loc) das Peroxisomen und mit einer Wahrscheinlichkeit von 0,84 (PENCE) das ER an. Eine Interaktion von OPR mit ABP1 ist aufgrund der vorhergesagten Lokalisation nicht ausgeschlossen. Auch die Funktion bei der Jasmonsäuresynthese macht es in Bezug auf Hormon-Hormon-Wechselwirkungen interessant.

Es wurden 5 an den C-Terminus von ZmABP1 bindende Proteine identifiziert. Für keines der Proteine ist eine Interaktion mit ABP1 sicher. Die ATP-Citratlyase Untereinheit a kommt auf Grund der Lokalisation und Funktion kaum als Interaktionspartner von ABP1 infrage. Für die anderen Proteine ist eine Interaktion mit ABP1 nicht sicher, aber möglich. Über Proteinbindestudien müssten Interaktionen belegt oder ausgeschlossen werden. Sollten eines oder mehrere dieser Proteine wiederholt in einem anderen Ansatz über die

Bindung an ABP1 identifiziert werden, wäre dies ein weiterer Hinweis auf eine mögliche Interaktion mit ABP1.

3.2.3. Überexpression und Identifizierung von Strep-ABP1 bindenden Proteinen

In einem zweiten Affinitätschromatographieansatz sollte das gesamte ABP1-Protein verwendet werden, um daran bindende Proteine zu finden. Das funktionelle ABP1 ist glykosyliert und besitzt ein Zinkion in der Auxinbindetasche. Um diese Modifikationen zu gewährleisten, muss ABP1 in Eukaryonten exprimiert werden. Es wurden Arabidopsis-Zellkulturen verwendet. *AtABP1* wurde N-terminal mit Strep-tag II fusioniert und das Fusionsprotein in Arabidopsis-Zellkulturen überexprimiert. Über Strep-tag/Strep-Tactin Affinitätschromatographie sollte *AtABP1* als Komplex mit daran bindenden Proteinen aufgereinigt werden.

ABP1 besitzt C-terminal die bereits erwähnte Interaktionsdomäne. Um diese nicht durch einen C-terminalen *Tag* zu inhibieren, wurde Strep-tag II N-terminal fusioniert. N-terminal weist ABP1 eine ER-Signalsequenz auf, die nach der Synthese des Peptids im ER abgespalten wird. Zur Synthese von ABP1 mit N-terminalem Strep-tag II wurde ein Konstrukt aus einer Chitinase ER-Signalsequenz, der Strep-tag II Sequenz und der *AtABP1* Sequenz ohne die ursprüngliche Signalsequenz kloniert (Strep-ABP1, Abbildung 4).

3.2.3.1. Überexpression von Strep-ABP1

Das *Strep-ABP1* Konstrukt wurde in einen Überexpressionsvektor ligiert, mit dem Arabidopsis-Zellkulturen mit Agrobakterium transformiert wurden. 12 Arabidopsis-Zelllinien wurden über Antibiotikaresistenz gegen Hygromycin B selektiert. In Abbildung 17C kann man als Beispiel eine transformierte Zelllinie, die aus absterbenden untransformierten Zellen herauswächst sehen. In 10 der selektierten Zelllinien wurde das *Strep-ABP1*-Konstrukt in der genomischen DNA nachgewiesen (Abbildung 17A). 4 Monate nach der Selektion starben 5 der transformierten Linien ab. In den verbleibenden Linien konnte das *Strep-ABP1*-Konstrukt auch in der cDNA aus Gesamt-RNA nachgewiesen werden (Abbildung 17B).

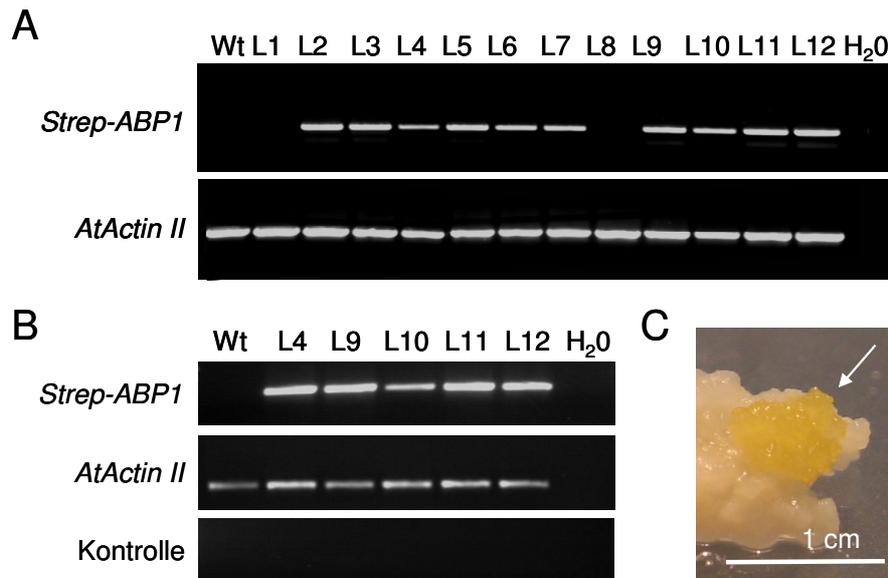


Abbildung 17: Nachweis der Strep-ABP1 DNA in genomischer DNA und aus cDNA der Gesamt-RNA von Arabidopsis-Zelllinien. **A** *Strep-ABP1* wurde über PCR in genomischer DNA von 10 Linien nachgewiesen. Zur Kontrolle wurde *AtActin II* amplifiziert. **B** Nachweis von Strep-ABP1 cDNA aus Gesamt-RNA, die revers transkribiert wurde. *AtActin II* wurde zur Kontrolle amplifiziert. Kontrolle: Über PCR mit nicht revers transkribierter RNA wurde eine DNA-Kontamination untersucht. Es wurden *AtActin II* Oligonukleotide eingesetzt. Wt: Wildtyp, L1 bis L12: transformierte Zelllinien. **C** Herauswachsendes transformiertes Arabidopsis-Zellaggregat 14 d nach der Transformation ist mit einem Pfeil markiert (↓). Der Balken entspricht 1 cm.

3.2.3.2. *Strep-ABP1* überexprimierende Zellen wachsen in größeren Zellaggregaten und zeigen einen vergrößerten Zellkern

Zur phänotypischen Analyse der transformierten Arabidopsis-Zelllinien wurden die Zellkerngrößen und die Größe der Zellaggregate herangezogen. Ebenso sollte der Polyploidiegrad der *Strep-ABP1* Linien mit einem Durchflußcytometer (DFC) gemessen werden. Zur Bestimmung der Zellkerngröße wurden die Zellaggregate der transformierten Linien und des Wildtyps mit DAPI (4,6-Diamino-2-phenylindole dihydrochlorid) angefärbt und über aufgenommene Bilder die Zellkernflächen ermittelt (Abbildung 18A). In Zellen der *Strep-ABP1* Linien waren die Zellkernflächen signifikant größer als in Zellen des Wildtyps (Abbildung 18B). Die Flächen der Zellkerne von Zellen der Linien L4, L9, L10, L11 und L12 waren fast viermal so groß, wie die des Wildtyps. Auch erschien der Nukleolus der transformierten Linien deutlich größer als in der Wildtyp-Zelllinie (Abbildung 18A).

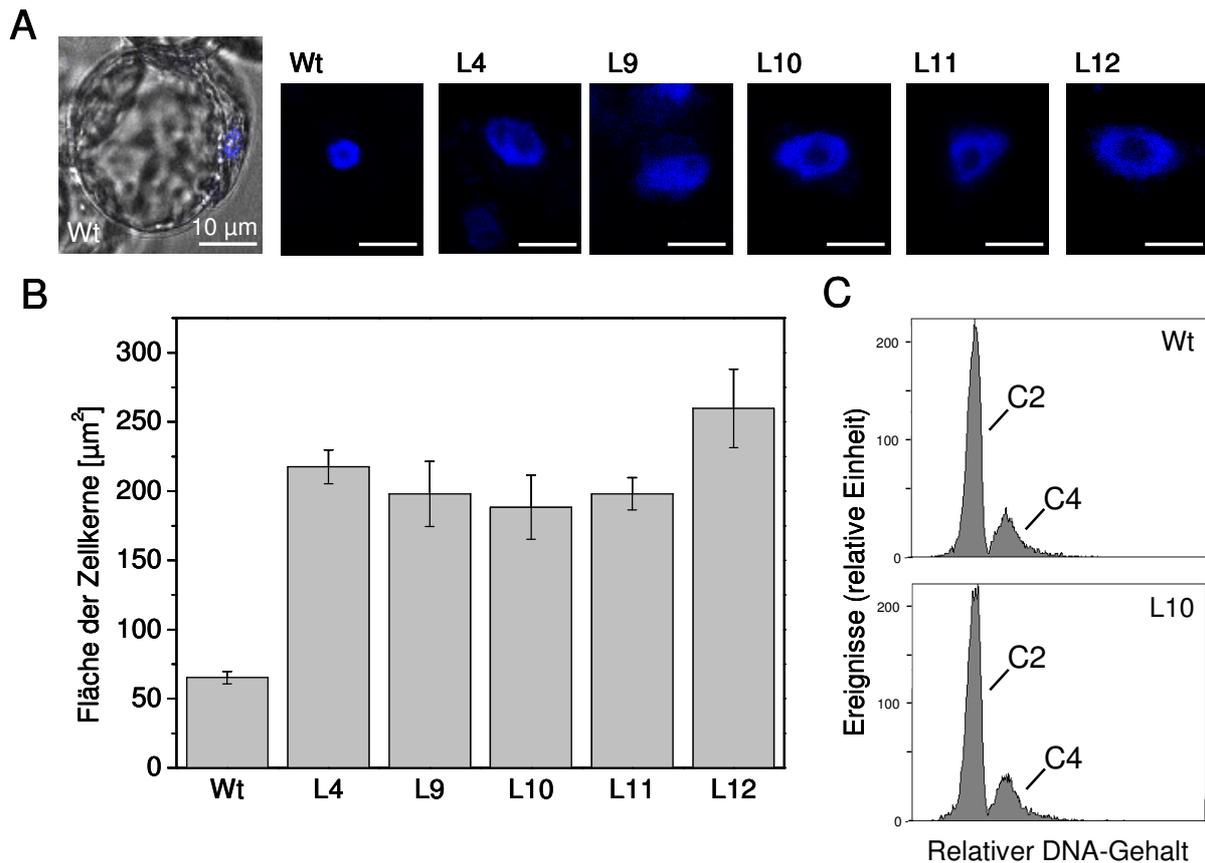


Abbildung 18: Vergleich der Größe der Zellkerne von Zellen der *Strep-ABP1* Überexpressionslinien und von Wildtypzellen. **A** Mit DAPI angefarbte Zellkerne der *Strep-ABP1* Linien L4, L9, L10, L11, L12 und des Wildtyps. Der Nukleolus ist als dunkler Fleck im Zellkern zuerkennen. Das erste Bild ist ein Überlagerungsbild aus Fluoreszenz- und einer Durchlichtaufnahme. Der Balken entspricht in allen Bildern 10 µm. **B** Mittelwerte \pm SE der Zellkernflächen in μm^2 von 2 unabhängigen Versuchen mit $n = 39$ für Wt, $n = 18$ für L4, $n = 30$ für L9, $n = 17$ für L10, $n = 34$ für L11 und $n = 34$ für L12. Über eine ANOVA und den Tukey-Test wurde gezeigt, dass sich die Zellkernflächen des Wildtyps und der *Strep-ABP1* Überexpressionslinien signifikant unterscheiden ($p < 0,05$). **C** Messungen des Polyploidiegrades der Wildtyp-Zelllinie und der Linie 10 mittels DFC. Die Zellkerne wurden aus Suspensionskulturen 7 d nach der Subkultur präpariert. Gezeigt sind repräsentative Messungen von 2 unabhängigen Versuchen. Je Messung wurden über 10000 Ereignisse gemessen. C2 entspricht dem diploiden und C4 dem tetraploiden Chromosomensatz.

Die DAPI angefarbten, vergrößerten Zellkerne (Abbildung 18) deuten auf erhöhte Polyploidiegrade der *Strep-ABP1* überexprimierenden Zellen hin. Über ein Durchflußzytometer wurden die relativen DNA-Gehalte der Zellen gemessen und daraus der Polyploidiegrad bestimmt. Bei allen Überexpressionslinien und der Wildtyplinie wurden diploide (C2), sich in der G1-Phase befindende, und tetraploide (C4), sich in der G2-Phase befindende Zellkerne ermittelt (Abbildung 18C). Die *Strep-ABP1*-Überexpressionslinie sind trotz der sichtbaren Vergrößerung der Zellkerne nicht polyploid. Als Beispiel für die

Überexpressionslinien wird ein Zytogramm der Linie 10 gezeigt und mit dem Wildtyp verglichen (Abbildung 18C).

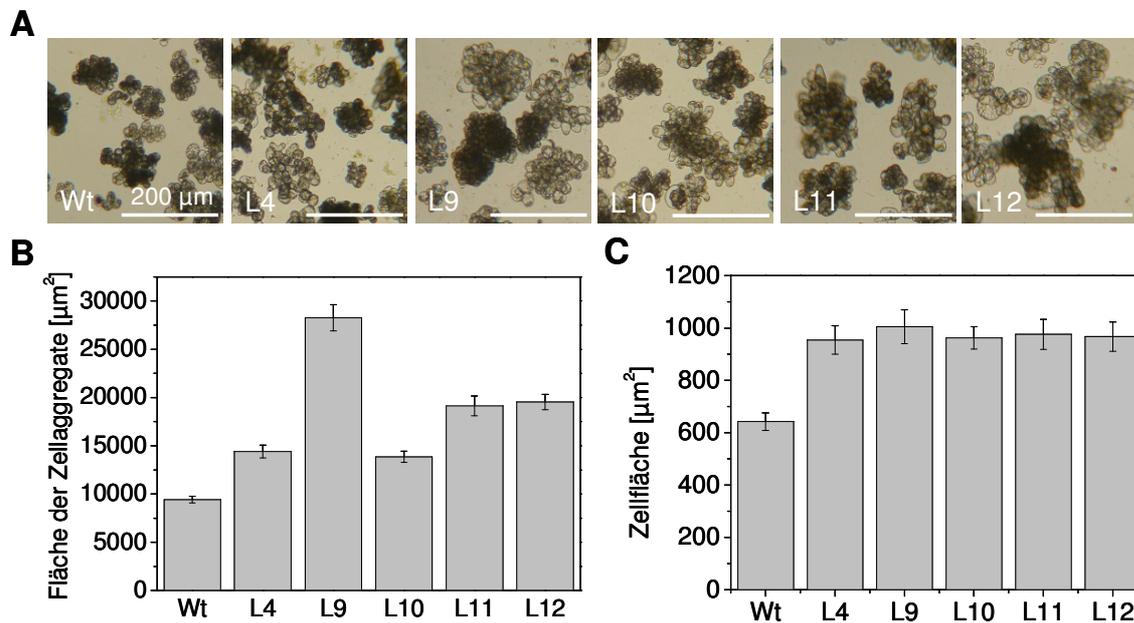


Abbildung 19: Vergleich der Zellaggregat- und Zellgrößen von Arabidopsis-Zelllinien in Flüssigkultur. Es wurde der Wildtyp mit den *Strep-ABP1* Überexpressionslinien L4, L9, L10, L11 und L12 verglichen. **A** Beispielbilder der Zellaggregate der Arabidopsis-Überexpressionslinien L4, L9, L10, L11 und L12 und des Wildtyps. Die Balken entsprechen 200 µm. **B** Mittelwerte ± SE der Flächen der Zellaggregate in µm² aus 3 Versuchen mit n = 212 für Wt, n = 158 für L4, n = 165 für L9, n = 209 für L10, n = 163 für L11 und n = 184 für L12. **C** Mittelwerte ± SE der Zellflächen in µm² aus 3 Versuchen mit n = 100 für alle Linien. Es wurde über eine ANOVA und den Tukey-Test ein signifikanter Unterschied der Wildtyp Zellaggregate und Zellflächen zu denen aller *Strep-ABP1* Überexpressionslinien festgestellt, p < 0,05.

Während der Subkultivierung der *Strep-ABP1* Linien in Flüssigkultur erschienen die Zellaggregate größer als die des Wildtyps (Abbildung 19A). Um dies genauer zu untersuchen, wurden die Flächen der Zellaggregate der verschiedenen Linien und des Wildtyps bestimmt (Abbildung 19B). Zellaggregate der transformierten Arabidopsis-Zelllinien waren signifikant größer als die des Wildtyps. Auch die Zellen der Überexpressionslinien war signifikant um circa ein Drittel größer (Abbildung 19C). Ob die Größe der Aggregate alleine von der Vergrößerung der Einzelzellen oder auch durch die Aggregation einer größeren Anzahl an Zellen hervorgerufen wurde, konnte nicht bestimmt werden.

Fünf Arabidopsis-Zelllinien wurden stabil mit *Strep-ABP1* transformiert. In den Zellen aller Überexpressionslinien waren die Zellkerne, sowie der Nukleolus vergrößert. Die *Strep-ABP1* Linien wuchsen in größeren Zellaggregaten als der Wildtyp.

3.2.3.3. Nachweis von Strep-ABP1 im Western-Blot

In den *Strep-ABP1* überexprimierenden Zelllinien sollte Strep-ABP1 über spezifische Antikörper nachgewiesen werden. Hierzu wurden Gesamtproteinfraktionen der einzelnen Linien und des Wildtyps hergestellt und über eine SDS-PAGE aufgetrennt. Zusätzlich wurde in *E. coli* überexprimiertes AtABP1 ohne Signalsequenz mit den Proteinfraktionen der *Strep-ABP1* Überexpressionslinien verglichen.

Zur Detektion des Strep-tags von Strep-ABP1 wurde HRP-Strep-Tactin verwendet (Abbildung 20A). HRP-Strep-Tactin erkennt allgemein biotinylierte Proteine (Witte *et al.*, 2004). In Pflanzen sind biotinylierte Proteine mit 22 bis 37 kDa (Biotin Carboxylcarrier), 75 bis 80 kDa (Methylcrotonyl-CoA Carboxylasen) und 75 bis 122 kDa (Geranyl-CoA Carboxylasen) bekannt (Nikolau *et al.*, 2003). Aufgrund der zahlreichen gefärbten Banden (Abbildung 20A) war es nicht möglich, Strep-ABP1 über HRP-Strep-Tactin zu identifizieren.

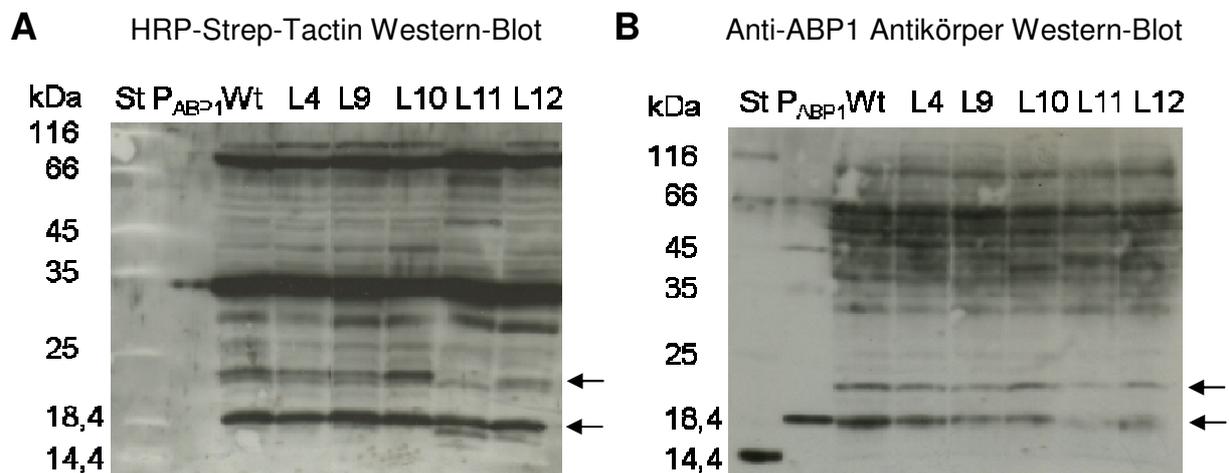


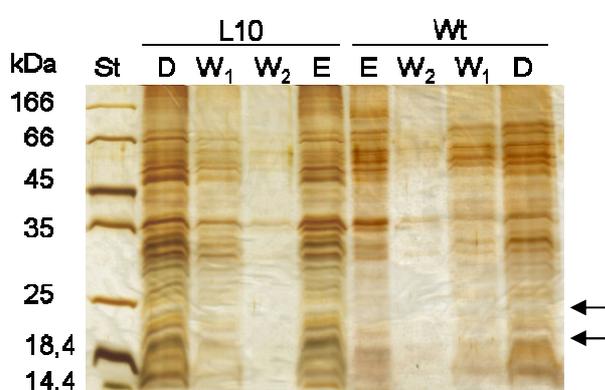
Abbildung 20: Western-Blot-Analysen zur Identifizierung von Strep-ABP1 in Gesamtproteinfraktionen des Wildtyps und der Linien L4, L9, L10, L11 und L12. Banden, bei denen es sich um AtABP1 (18 kDa) und glykosyliertes AtABP1 (23 kDa) handeln könnte, sind mit einem Pfeil markiert. **A** Strep-tag-Nachweis über HRP-Strep-Tactin. **B** AtABP1-Nachweis über einen Anti-AtABP1 Antikörper. Nachweis über ECL-PLUS, St: Standard, P_{ABP1}: 0,25 µg des überexprimierten AtABP1 aus *E. coli*.

Zusätzlich wurde ein Western-Blot mit einem Anti-AtABP1 Antikörper durchgeführt (Abbildung 20B). In *E. coli* überexprimiertes AtABP1 konnte mit einer Größe von 18 kDa identifiziert werden. Auch in den Proteinfraktionen vom Wildtyp und von transformierten Zelllinien war eine Proteinbande um 18 kDa sichtbar. Natives, glykosyliertes AtABP1 sollte 23 kDa groß sein (Massotte *et al.*, 1995). In dieser Größe wurde beim Wildtyp und in allen transgenen Linien eine Proteinbande detektiert. In keiner der transgenen Linien konnte im Vergleich zum Wildtyp mit dem Anti-AtABP1 Antikörper eine zusätzliche oder stärkere Bande in der Größe von 23 kDa nachgewiesen werden. Insgesamt erkennt der Anti-AtABP1

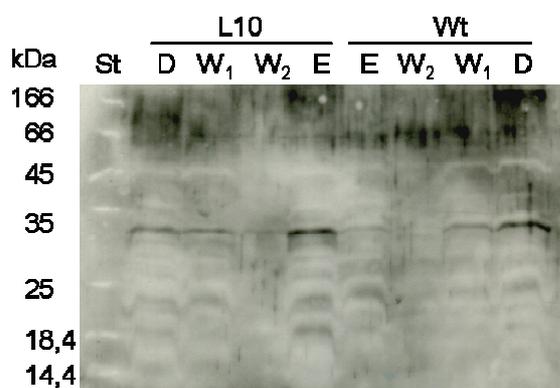
Antikörper viele weitere Proteinbanden. Das Vorhandensein von Strep-ABP1 kann jedoch auch nicht ausgeschlossen werden. Weitere Versuche wurden mit der Linie 10 durchgeführt, die über HRP-Strep-Tactin ein etwas stärkeres Signal bei 23 kDa zeigte als die anderen Überexpressionslinien (Abbildung 20A).

Über Affinitätschromatographie sollte es möglich sein, auch geringe Mengen an Strep-ABP1 aufzureinigen und über MS zu identifizieren. Dafür wurden Strep-tag Zentrifugationssäulen und Gesamtfractionen vom Wildtyp und von Linie 10 verwendet. Auf einer silbergefärbten SDS-PAGE wurden die Fraktionen des Durchflusses, der beiden Waschschriffe und des Eluats von Linie 10 und Wildtyp aufgetragen (Abbildung 21A).

A Silbergefärbte SDS-PAGE



B HRP-Strep-Tactin Western-Blot



C Anti-AtABP1 Antikörper Western-Blot

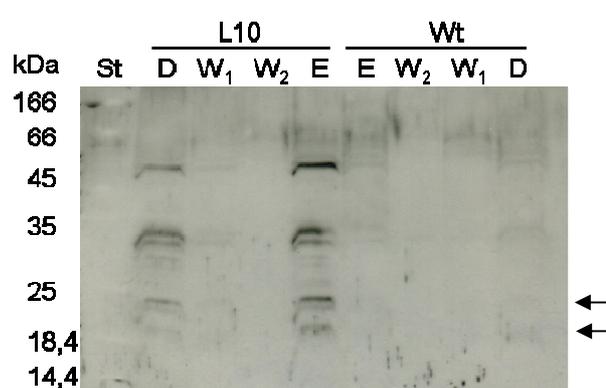


Abbildung 21: Aufreinigung von Strep-ABP1 aus den Gesamtfractionen von Linie 10 und Wildtyp über Strep-tag Zentrifugationssäulen (A) und Identifizierung über Western-Blot-Analysen (B, C). A Silbergefärbte SDS-PAGE. B Detektion von Strep-ABP1 über HRP-Strep-Tactin. Zur Maskierung biotinylierter Proteine wurde der Blot mit Avidin vorbehandelt. C Western-Blot mit Anti-AtABP1 Antikörper. Detektion über ECL-Plus. Proteinbanden, bei denen es sich eventuell um ABP1 handeln könnte, sind mit einem Pfeil markiert. D: Durchfluss, W₁: Waschschriff 1, W₂: Waschschriff 2, E: Eluat, St: Standard.

Im zweiten Waschschrift waren kaum Proteine vorhanden. Trotzdem wurden sehr viele Proteine im Eluat nachgewiesen. Die eluierten Proteinbanden glichen im Muster dem der Durchflussfraktionen. Über eine Affinitätschromatographiesäule sollten generell nur wenige Proteine aufgereinigt werden. Trotz der vielen eluierten Proteine waren im Eluat von Linie 10 im Bereich zwischen 18 und 25 kDa drei Proteinbanden von circa 18, 20 und 25 kDa Größe deutlich stärker zu erkennen als im Wildtyp (Abbildung 21A). Im Western-Blot mit HRP-Strep-Tactin war eine schwache Bande von circa 20 kDa im Eluat von Linie 10, nicht aber im Wildtyp-Eluat zu erkennen. Eine Bande von 25 kDa wurde in beiden Eluaten detektiert (Abbildung 21B). Der Anti-AtABP1 Antikörper detektierte im Eluat von Linie 10 mehrere Banden, die nicht im Wildtyp-Eluat sichtbar sind (Abbildung 21C). Diese waren jedoch auch im Durchfluss von Linie 10 erkennbar. Wie im Western-Blot mit HRP-Strep-Tactin war eine schwache Proteinbande von circa 20 kDa und eine Bande von circa 25 kDa detektiert worden. Ob es sich bei einer der Proteinbanden, die in der silbergefärbten SDS-PAGE und über Western-Blot-Analysen mit HRP-Strep-Tactin und Anti-ABP1 Antikörper nachweisbar waren, um Strep-ABP1 handelt, ist jedoch unklar.

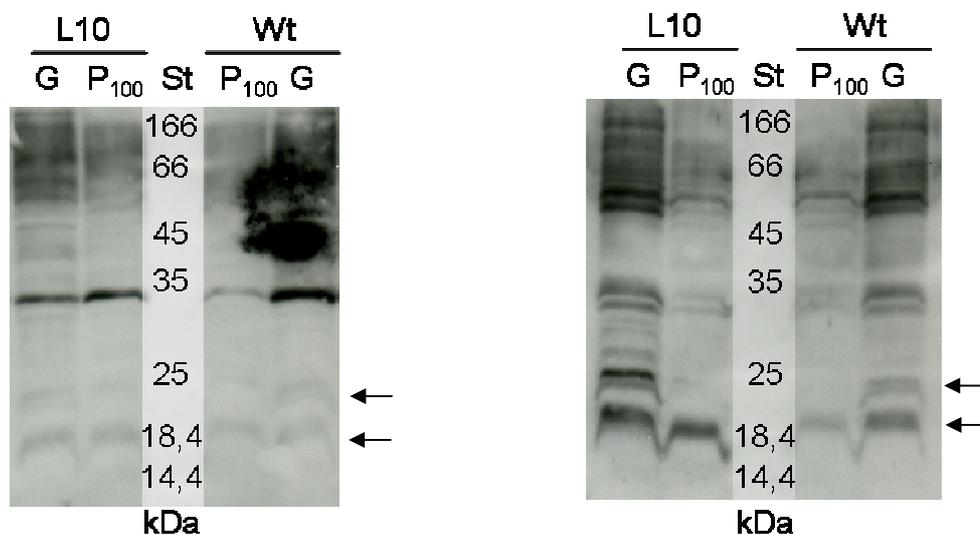
A HRP-Strep-Tactin Western-Blot**B** Anti-AtABP1 Antikörper Western-Blot

Abbildung 22: Western-Blot-Analysen zur Identifizierung von Strep-ABP1 in Gesamtfraction und Membranfraction (P₁₀₀) von Linie 10 und Wildtyp. **A** Detektion von Strep-ABP1 über HRP-Strep-Tactin. Biotinylierte Proteine wurden durch eine Vorbehandlung mit Avidin maskiert. **B** Western-Blot mit Anti-AtABP1 Antikörper. Detektion über ECL-Plus. G: Eluat aus Gesamtfraction, P₁₀₀: Eluat aus Membranfraction, St: Standard.

Strep-ABP1 konnte nicht eindeutig in der Gesamtfraction der Linie 10 nachgewiesen werden. Als ZmABP1 in Maiskoleoptilen nachgewiesen wurde, zeigte sich ein starkes Signal in der Membranfraction P₁₀₀ (Abbildung 12B). Die Membranfraction enthält auch das ER, in dem das meiste ABP1 lokalisiert ist (Henderson *et al.*, 1997). Auch Strep-

ABP1 sollte hauptsächlich im ER lokalisiert sein. Die Versuche mit der Strep-tag Zentrifugationssäule wurden aus diesem Grund mit der Membranfraktion von Linie 10 und Wildtyp wiederholt. Über HRP-Strep-Tactin konnte in den Eluaten der Linie 10 weder in der Gesamtfraction noch in der Membranfraktion eine Proteinbande von 20 oder 25 kDa identifiziert werden (Abbildung 22A). Über den Anti-AtABP1 Antikörper wurden Proteinbanden um 20 und 25 kDa in dem Eluat der Gesamtfraction erkannt. Diese waren jedoch auch schwach in dem Eluat des Wildtyps detektierbar (Abbildung 22B). In der Membranfraktion konnte kein Strep-ABP1 nachgewiesen.

Über die verwendeten Zentrifugationssäulen konnte Strep-ABP1 nicht aufgereinigt werden. In Western-Blot-Analysen war keine eindeutige Identifizierung möglich. Ein Problem bei der Aufreinigung von Strep-ABP1 waren die biotinylierten Proteine, die auch an das Säulenmaterial banden und somit Bindestellen für den Strep-tag belegten. Auch wenn die Gesamtfraction mit Avidin behandelt wurde, um biotinylierte Proteine abzufangen, waren sie immer noch über HRP-Strep-Tactin im Western-Blot nachweisbar. Eventuell kann Strep-ABP1 über ein Säulenmaterial mit einer höheren Bindungskapazität aufgereinigt werden und in den transgenen Linien nachgewiesen werden. Mit Sepharose-Strep-Tactin-Säulen können theoretisch in 1 ml Säulenmaterial bis zu 3 mg Protein aufgereinigt werden. Über die Zentrifugationssäule kann bis zu 150 µg Protein aufgereinigt werden. In einem zweiten Ansatz wurden 1 ml Sepharose-Strep-Tactin-Säulen verwendet. Es wurden ebenfalls die Gesamtfractionen von Linie 10 und Wildtyp verwendet und miteinander verglichen.

Um an das Säulenmaterial bindende Proteine zu eluieren, wurden 6 Elutionsschritte (E₁ bis E₆) durchgeführt. Nach Auftrennung über SDS-PAGE und anschließender Silberfärbung konnte in keiner der Fraktionen eine Proteinbande zwischen 18 und 25 kDa ermittelt werden (Abbildung 23A). Über HRP-Strep-Tactin konnte in den Fraktionen E₃ bis E₆ der Linie 10 eine Proteinbande von circa 21 kDa detektiert werden (Abbildung 23C). Bei der Proteinbande von 33 kDa handelt es sich wahrscheinlich um nicht vollständig maskiertes biotinyliertes Protein. Im Wildtyp konnte ebenfalls eine Proteinbande um 21 kDa in den Fraktionen E₄ bis E₆ detektiert werden (Abbildung 23D). Um festzustellen, ob es sich bei diesen Banden um Strep-ABP1 handelt, wurden die Blots gestrippt und mit Anti-AtABP1 Antikörper inkubiert. In Abbildung 23E sind in den Fraktionen E₂ bis E₆ von Linie 10 sehr schwache Banden in der entsprechenden Größe zu erkennen. In den Fraktionen des Wildtyps wurde dagegen keine entsprechende Proteinbande detektiert. Auch über die Sepharose-Strep-Tactin-Säulen konnte nicht geklärt werden, ob Strep-ABP1 von der Arabidopsis-Zelllinie 10 gebildet wurde.

Es konnte nicht eindeutig geklärt werden, ob das Fusionsprotein Strep-ABP1 in den *Strep-ABP1* Überexpressionslinien gebildet wurde. Damit war es nicht möglich mit AtABP1 interagierende Proteine aufzureinigen und zu identifizieren.

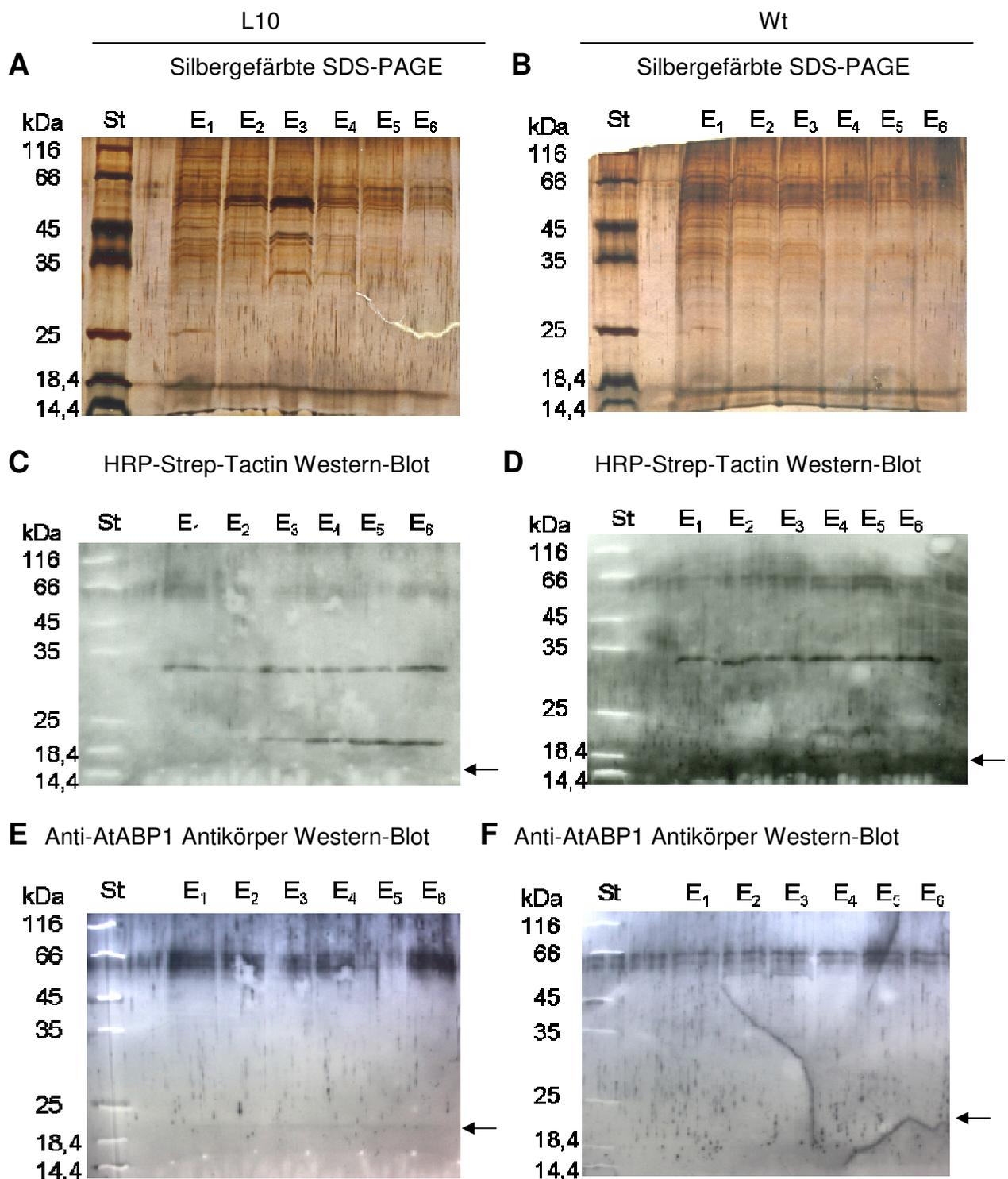


Abbildung 23: Aufreinigung von Strep-ABP1 aus der Gesamtfraction von Linie 10 über Sepharose-Strep-Tactin und Identifizierung von Strep-ABP1 über Western-Blot-Analysen. Die Eluate 1 bis 6 von L10 (**A**, **C** und **E**) und Wildtyp (**B**, **D** und **F**) wurden verglichen. **A** und **B** Silbergefärbte SDS-PAGEs. **C** und **D** Strep-ABP1 Detektion über HRP-Strep-Tactin. Zur Maskierung der biotinylierten Proteine wurden die Blots zuvor mit Avidin behandelt. **E** und **F** Die Blots **C** und **D** wurden gestriipt und für eine Western-Blot-Analyse mit Anti-AtABP1 Antikörper verwendet. St: Standard, E₁ bis E₆: Eluate 1 bis 6.

3.3. Auxinwirkung auf Protoplasten und ABP1 als Signalvermittler

Es wurde der Effekt von Indol-3-essigsäure (IAA), 2-Naphthylessigsäure (2-NAA) und Indol-3-Acetonitril (IAN) auf die Nettovolumenänderung von Maisprotoplasten aus Koleoptilen untersucht. Zusätzlich wurde der Effekt des Pentapeptids Phytosulfokin- α (PSK- α) auf die Volumenänderung untersucht und mit der Auxinwirkung verglichen. Zur Untersuchung der Rolle von ABP1 als Signalvermittler bei der Volumenänderung von Protoplasten wurden Versuche mit dem C-terminalen Peptid von ABP1 und dem Antikörperfragment scFv12, welches an konservierte Bereiche von ABP1, hauptsächlich die Box c bindet, durchgeführt.

3.3.1. IAA und IAN, aber nicht 2-NAA induzieren eine Volumenzunahme von Protoplasten

Das natürliche Auxin IAA induziert, wie schon von Steffens und Lüthen (2000) gezeigt, eine schnelle Volumenzunahme bei Protoplasten aus Maiskoleoptilen. Typisch ist die sofortige Volumenzunahme nach Applikation von IAA ohne *lag*-Phase. 1 h nach der Zugabe von 10 μM IAA konnte eine Vergrößerung der Protoplasten um 4,9% ermittelt werden (Abbildung 24A).

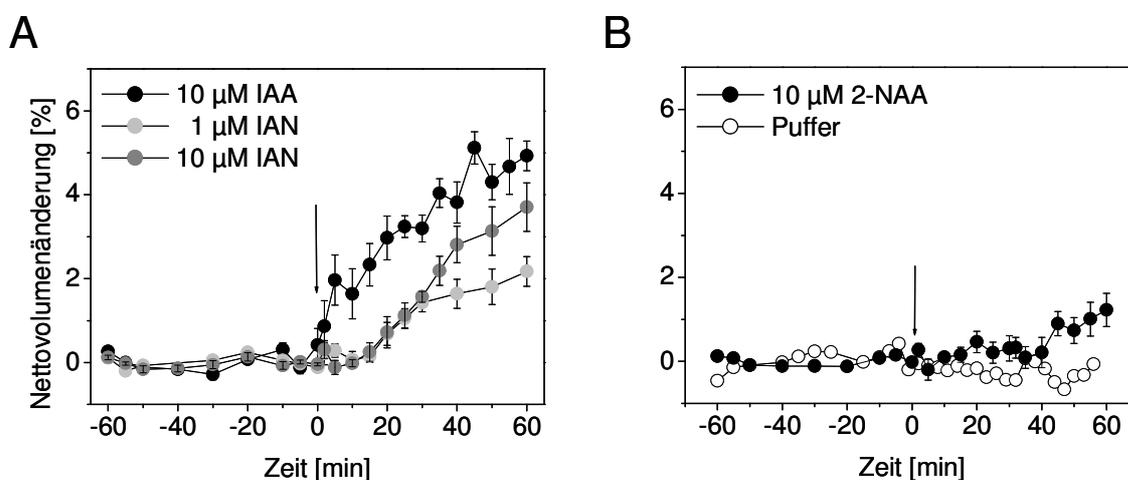


Abbildung 24: Effekte von IAA, IAN, 2-NAA oder Puffer auf das Volumen von Protoplasten. **A** Die Applikation von 10 μM IAA (●) führte zu einer sofortigen Volumenzunahme. 10 μM IAN (◐) und 1 μM IAN (◑) führten zu einer verzögerten Volumenzunahme. **B** 10 μM 2-NAA (●) induzierte erst später einen geringen Volumenzuwachs. Die Applikation von Puffer (◐) als Kontrolle induzierte keine Volumenänderung. Die Applikation des jeweiligen Effektors erfolgte zum Zeitpunkt $t = 0$ min (\downarrow). Die Mittelwerte \pm SE für 10 μM IAA wurden aus 4 Protoplasten von 3 Versuchen, für 1 μM IAN und 10 μM IAN aus je 6 Protoplasten von 2 Versuchen und für 10 μM 2-NAA aus 5 Protoplasten von 3 Versuchen gebildet. Für die Kontrolle (Pufferapplikation) wurde ein repräsentativer Protoplast gezeigt.

IAN, eine Vorstufe von IAA, kann durch Nitrilasen in IAA umgewandelt werden (Normanly *et al.*, 1997). 10 μM IAN bewirkten nach 10-minütiger *lag*-Phase einen IAA-ähnlichen Nettovolumenzuwachs von 4% nach 1 h (Abbildung 24A). Mit 1 μM IAN betrug die Volumenzunahme nach 1 h 2,1%. Auch hier wurde eine verzögerte Wirkung beobachtet (Abbildung 24A). Die Zugabe von 10 μM 2-NAA bewirkte nach 1 h einen Volumenzuwachs von 1,2%, der ähnlich wie die Applikation von Puffer keine mit IAA vergleichbare Volumenzunahme bei Protoplasten darstellte. Gegenüber der Kontrolle induzierte 2-NAA eine leichte Volumenzunahme am Ende des Beobachtungszeitraums (Abbildung 24B).

3.3.2. PSK- α induziert eine Volumenzunahme von Protoplasten

Für das disulfatierte Pentapeptid PSK- α wurde eine Rezeptorkinase mit einem leuzinreichen Wiederholungsmuster als plasmamembranständiger Rezeptor identifiziert (Matsubayashi *et al.*, 2006). Ein Signalweg von PSK- α über die Plasmamembran ist zu erwarten. Hier sollte untersucht werden, ob PSK- α einen Effekt auf die Nettovolumenänderung von Maisprotoplasten besitzt und ob dieser Effekt vergleichbar mit der Auxinwirkung ist. Ein geringer Prozentsatz von ABP1 wurde an der Plasmamembran nachgewiesen (Diekmann *et al.*, 1995) und eine Funktion an der Plasmamembran wird auf Grund von Zeitkinetiken diskutiert (Barbier-Brygoo *et al.*, 1989; Rück *et al.*, 1993).

0,1 nM PSK- α induzierte, ähnlich wie 10 μM IAA, bei Protoplasten eine sofortige Nettovolumenzunahme von 6,6% nach 1 h (Abbildung 25A). Dagegen bewirkten 0,1 nM unsulfatiertes Pentapeptid (dsPSK) und 0,05 nM eines Aminosäure-Gemisches aus den einzelnen Aminosäuren von PSK- α keine Vergrößerung der Protoplasten (Abbildung 25A). PSK- α förderte in Konzentrationen von 0,05 nM bis 10 nM die Volumenzunahme von Maisprotoplasten (Abbildung 25B). Höhere Konzentrationen wurden nicht getestet. 30 min nach Zugabe führten 0,05 nM PSK- α zu einem Zuwachs von 1,8%. Die Konzentrationen 0,3 nM, 0,6 nM und 1 nM führten zu einem ähnlichen Effekt um 3%. 10 nM PSK- α führten zu einer leicht erhöhten Volumenzunahme mit 3,4%. Der stärkste Volumenzuwachs wurde durch 0,1 nM PSK- α mit 5% nach 30 min und 6,6% nach 1 h ausgelöst. Das disulfatierte Pentapeptid PSK- α führte zu einem Volumenzuwachs bei Protoplasten. Die dabei beobachtete Zeitkinetik entsprach dem Auxin-Effekt (Abbildung 24A). PSK- α bewirkte schon in geringen Konzentrationen von 0,05 nM eine Nettovolumenänderung bei Protoplasten. Das Optimum wurde mit 0,1 nM PSK- α erzielt.

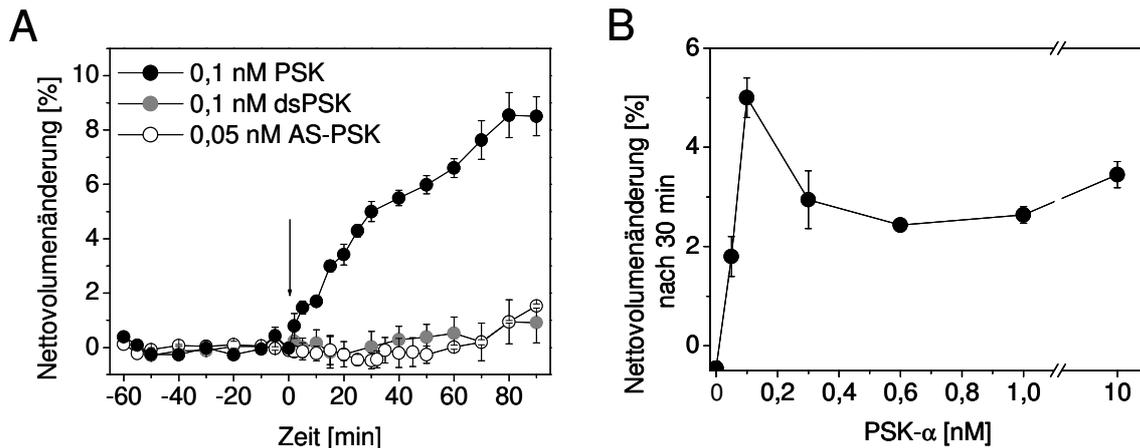


Abbildung 25: Wirkung von PSK- α , unsulfatiertem Pentapeptid (dsPSK) und Aminosäuren von PSK (AS-PSK) auf Maisprotoplasten. **A** Die Zugabe von 0,1 nM PSK- α (●) führte zu einer Volumenzunahme. 0,1 nM dsPSK (●) und 0,05 nM AS-PSK (○) induzierten dagegen keinen Volumenzuwachs. Die Applikation des jeweiligen Effektors erfolgte zum Zeitpunkt $t = 0$ min (↓). **B** Dosis-Wirkungs-Kurve von PSK- α . Die Nettovolumenänderung wurde 30 min nach der Zugabe bestimmt. Die Mittelwerte \pm SE für 10 nM PSK- α wurden aus 5 Protoplasten, für 1 nM PSK- α aus 3 Protoplasten, für 0,6 nM PSK- α und 0,3 nM PSK- α aus je 5 Protoplasten von 2 Versuchen, für 0,1 nM PSK- α aus 5 Protoplasten von 3 Versuchen, für 0,05 nM PSK- α aus 3 Protoplasten von 2 Versuchen, für 0,1 nM dsPSK aus 4 Protoplasten von 3 Versuchen und für 0,05 nM AS-PSK aus 2 Protoplasten und 0 nM PSK- α aus 7 Protoplasten von 6 Versuchen gebildet.

3.3.3. IAA- und PSK- α -induzierte Volumenzunahmen sind kaliumabhängig

Beim auxininduzierten Wachstum von Maiskoleoptien werden Protonenpumpen und Kaliumkanäle aktiviert (Lüthen *et al.*, 1990; Philippar *et al.*, 1999). Kaliumionen werden als Ausgleich für die in den Apoplasten gepumpten Protonen in die Zelle aufgenommen. Über die dadurch induzierte Wasseraufnahme steigt der Turgor der Zelle und der Protoplast nimmt an Volumen zu. In Versuchen ohne Kalium sollte untersucht werden, ob auch der IAA- und PSK- α -induzierte Volumenzuwachs kaliumabhängig ist.

Ohne Kalium im Puffer induzierte 10 μ M IAA nach 1 h eine Volumenzunahme von 0,8% (Abbildung 26A). Dies ist im Vergleich zum IAA-induzierten Effekt in 10 mM kaliumhaltigem Puffer mit einem Volumenzuwachs von 4,9% (Abbildung 26A) eine starke Reduktion. Die von 0,1 nM PSK- α -induzierte Volumenzunahme von 6,6% sank ohne Kalium im Puffer auf 1,1% (Abbildung 26B). Bei der Verringerung der Kaliumkonzentration von 10 mM auf 1 mM sank die von 0,1 nM PSK- α -induzierte Volumenzunahme auf 3,4% nach 1 h (Abbildung 26B). Dies verdeutlichte die Kaliumabhängigkeit des PSK- α -Effekts auf Protoplasten. Ohne Kalium im Puffer zeigten Kontrollprotoplasten eine leichte

Nettovolumenzunahme innerhalb 1 h (Abbildung 26A). Im Vergleich dazu war bei Protoplasten mit 10 mM Kalium im Puffer (Abbildung 28A) kein Zuwachs zu beobachten.

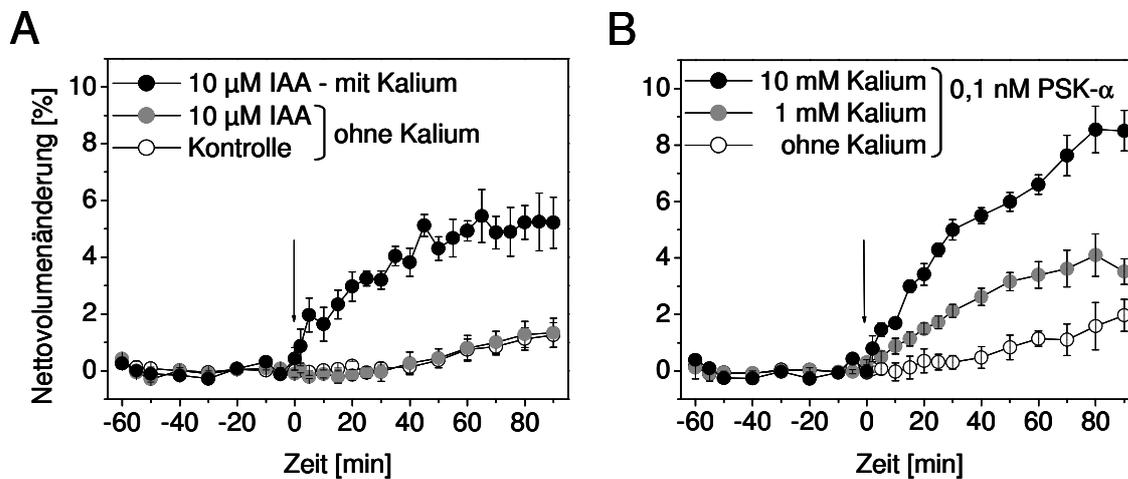


Abbildung 26: Effekte von IAA und PSK- α in Abhängigkeit der Kaliumkonzentration im Puffer. Die Effektoren wurden zum Zeitpunkt $t = 0$ min (\downarrow) appliziert. **A** Protoplasten in Puffer ohne Kalium zeigten nach der Applikation von $10 \mu\text{M}$ IAA (\bullet) wie die Kontrolle (\circ) keine Volumenzunahme. Protoplasten mit 10 mM Kalium im Puffer zeigten nach Applikation von $10 \mu\text{M}$ IAA (\bullet) eine Volumenzunahme. **B** Mit 10 mM Kalium im Puffer (\bullet) zeigten Protoplasten nach der Applikation von $0,1 \text{ nM}$ PSK- α eine starke, mit 1 mM Kalium im Puffer (\bullet) eine geringere und ohne Kalium im Puffer (\circ) keine Volumenzunahme. Die Mittelwerte \pm SE für $10 \mu\text{M}$ IAA mit 10 mM Kalium und ohne Kalium wurden aus je 4 Protoplasten von 3 Versuchen, für die Kontrollprotoplasten ohne Kalium aus 6 Protoplasten von 4 Versuchen, für $0,1 \text{ nM}$ PSK- α mit 10 mM Kalium aus 5 Protoplasten von 3 Versuchen, mit 1 mM Kalium aus 5 Protoplasten von 2 Versuchen und ohne Kalium aus 3 Protoplasten gebildet.

Die von PSK- α -induzierte Nettovolumenzunahme von Koleoptilprotoplasten war wie die von IAA kaliumabhängig. Es besteht somit die Möglichkeit, dass PSK- α in Protoplasten aus Maiskoleptilen Kaliumkanäle aktiviert, wie dies für Auxin und ABP1 bekannt ist (Thiel *et al.*, 1993).

3.3.4. Das C-terminale Peptid von ZmABP1 induziert alleine eine Volumenzunahme bei Protoplasten

ABP1 besitzt mehrere hochkonservierte Bereiche, die als Boxen a, b und c bezeichnet werden (Napier und Venis, 1990; Leblanc *et al.*, 1999), so wie den C-Terminus der als Proteininteraktionsdomäne diskutiert wird (Thiel *et al.*, 1993; Leblanc *et al.*, 1999; David *et al.*, 2001). Es sollte untersucht werden, ob das C-terminale Peptid von ZmABP1, bestehend aus 15 Aminosäuren mit der Sequenz FVWDEDCFEAAKDEL alleine eine Volumenzunahme

bei Protoplasten auslösen kann und somit eine Domäne für die Interaktion mit einer weiteren Signalkomponente in Frage kommt. Um die Spezifität des C-terminalen Peptids auf die Volumenzunahme von Protoplasten zu testen, wurde zusätzlich ein Kontrollpeptid aus den gleichen Aminosäuren, jedoch einer anderen Primär- und Sekundärstruktur mit der Sequenz ECDKLF EADFEWVDA verwendet. Die Sekundärstruktur wurde über SSpro (*Secondary structure prediction*) ermittelt und mit der des C-terminalen Peptids verglichen.

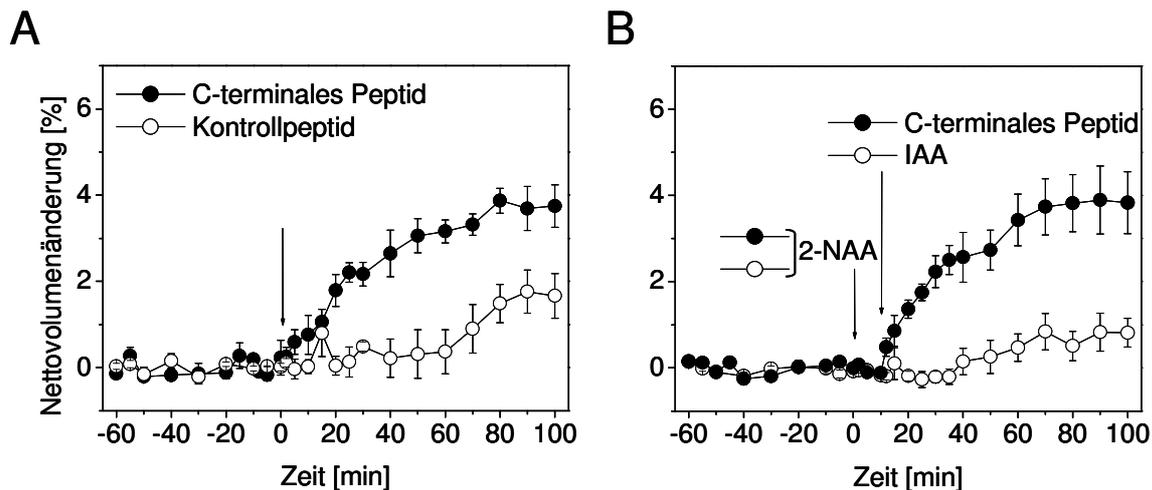


Abbildung 27: **A** Wirkung des C-terminalen Peptids und des Kontrollpeptids auf Protoplasten. Zum Zeitpunkt $t = 0$ min (\downarrow) wurden $1 \mu\text{M}$ C-terminales Peptid (\bullet) oder $1 \mu\text{M}$ Kontrollpeptid (\circ) appliziert. Das C-terminale Peptid, nicht aber das Kontrollpeptid induzierte eine Volumenzunahme. **B** Konkurrenzexperimente von 2-NAA mit IAA und von 2-NAA mit C-terminalem Peptid. Zum Zeitpunkt $t = 0$ min (\downarrow) wurden $10 \mu\text{M}$ 2-NAA und zum Zeitpunkt $t = 10$ min (\downarrow) $1 \mu\text{M}$ C-terminales Peptid (\bullet) oder $10 \mu\text{M}$ IAA (\circ) appliziert. Die Mittelwerte \pm SE wurden für das C-terminale Peptid und für das Kontrollpeptid aus je 3 Protoplasten von 2 Versuchen, für den Konkurrenzversuch 2-NAA und C-terminales Peptid aus 5 Protoplasten von 2 Versuchen und für 2-NAA und IAA aus 4 Protoplasten gebildet.

Die Applikation von $1 \mu\text{M}$ C-terminalem Peptid bewirkte einen Volumenzuwachs von 3,2% nach 1 h (Abbildung 27A). Eine Zugabe des Kontrollpeptids induzierte mit 0,4% Nettovolumenzunahme nach 1 h keinen vergleichbaren auxinähnlichen Effekt (Abbildung 27A). 2-NAA besitzt nach Berechnungen von Edgerton *et al.* (1994) eine hohe Bindungsaffinität zu ABP1. Wurden Protoplasten 10 min mit $10 \mu\text{M}$ 2-NAA vorinkubiert und dann $10 \mu\text{M}$ IAA appliziert, wurde der typische IAA-Effekt (Abbildung 24A) gehemmt. Untersuchte Protoplasten zeigten nach 1 h eine Nettovolumenänderung von nur 0,4% (Abbildung 27B). In weiteren Versuchen sollte untersucht werden, ob ein durch 2-NAA blockiertes ABP1 den vom C-terminalen Peptid induzierten Effekt beeinflusst. Das C-terminale Peptid alleine löste einen IAA-ähnlichen Effekt aus (Abbildung 27A). Durch 10-

minütige Vorinkubation mit 2-NAA wurde die Wirkung des C-terminalen Peptids nicht vermindert. Nach 1 h konnte eine Volumenzunahme von 3,4% beobachtet werden (Abbildung 27B). Dies entspricht dem Effekt des C-terminalen Peptids ohne Vorinkubation mit 2-NAA (Abbildung 27A). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass der C-Terminus von ABP1 an der Weiterleitung des Auxin-Signals beteiligt ist.

3.3.5. Die durch das Antikörperfragment scFv12 induzierte Volumenzunahme wird durch 2-NAA verstärkt

Die hochkonservierten Epitope, die Boxen a und c von ABP1, scheinen wichtig für die Auxinbindung zu sein (Napier und Venis, 1990; Brown und Jones, 1994; Napier *et al.*, 2001; Steffens *et al.*, 2001). Es konnte gezeigt werden, dass durch die Bindung eines Antikörpers an Box a ein auxinähnlicher Effekt induziert wird (Venis *et al.*, 1992; Rück *et al.*, 1993; Steffens *et al.* 2001). Durch die Verwendung des Antikörperfragmentes scFv12, welches stark an die Box c, schwach an die Box a und kaum an den C-Terminus von ABP1 bindet (Leblanc *et al.*, 1999), sollte geklärt werden, ob auch Box c wichtig für die Auxinbindung ist.

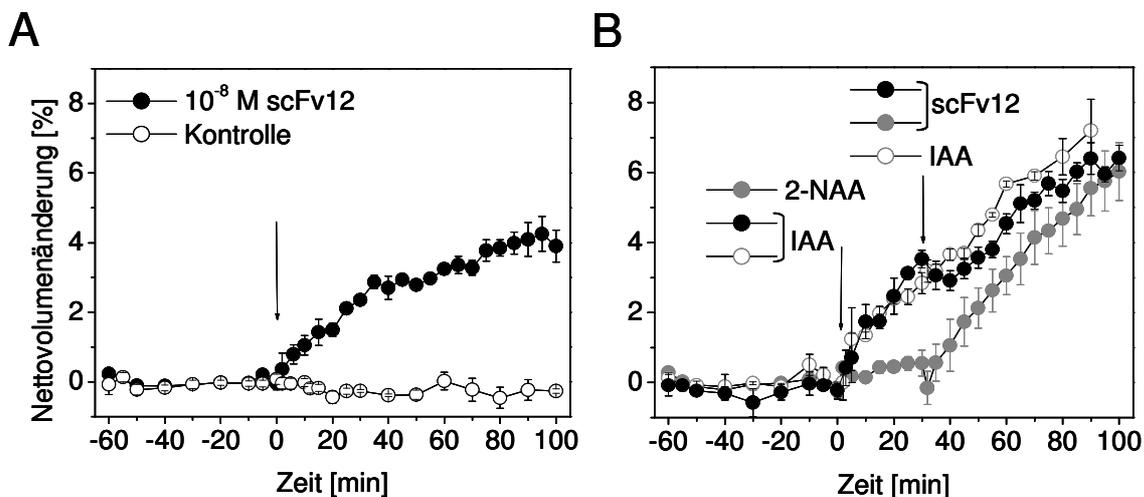


Abbildung 28: **A** Das Antikörperfragment scFv12 induziert eine Volumenzunahme bei Protoplasten. Zum Zeitpunkt $t = 0$ min (\downarrow) wurden 10^{-8} M scFv12 (\bullet) appliziert. Dagegen zeigte die Kontrolle (\circ) keinen Effekt. **B** Wettbewerbsversuche von $10 \mu\text{M}$ IAA mit 10^{-8} M scFv12 (\bullet) und $10 \mu\text{M}$ 2-NAA mit 10^{-8} M scFv12 (\bullet), sowie Zweifachapplikation von $10 \mu\text{M}$ IAA (\circ). Zum Zeitpunkt $t = 0$ min (\downarrow) wurden IAA (\bullet , \circ) oder 2-NAA (\bullet) und zum Zeitpunkt $t = 30$ min (\downarrow) scFv12 (\bullet , \bullet) oder IAA (\circ) appliziert. Die Vorinkubation mit 2-NAA führte zu einem gesteigerten scFv12-Effekt. Dagegen verstärkt die Vorbehandlung mit IAA nicht die Wirkung des scFv12. Die Mittelwerte \pm SE wurden für die Kontrolle aus 7 Protoplasten von 6 Versuchen, für scFv12 aus 5 Protoplasten und 3 Versuchen, für die Wettbewerbsversuche IAA und scFv12 aus 3 Protoplasten von 2 Versuchen, für 2-NAA und scFv12 aus 4 Protoplasten von 2 Versuchen und für IAA + IAA aus 2 Protoplasten gebildet.

Die Applikation von 10 μM IAA alleine führte zu einer starken Volumenzunahme mit 5,2% nach 90 min (Daten nicht gezeigt). Wurde Protoplasten hintereinander, zu den Zeitpunkten 0 min und 30 min 10 μM IAA appliziert, führte dies zu einem verstärkten Volumenzuwachs (Abbildung 28B). Nach 90 min wurde ein Volumenzuwachs von 7,1% gemessen. Eine zweite Applikation von IAA induzierte eine zusätzliche Volumenzunahme. Es wurden Kompetitionsversuche mit dem Antikörperfragment scFv12 durchgeführt. Die Applikation von 10^{-8} M scFv12 alleine induzierte bei Protoplasten nach 90 min eine Volumenzunahme von 4,1% (Abbildung 28A). Nach vorheriger Inkubation mit 10 μM IAA führte die Zugabe von 10^{-8} M scFv12 zum Zeitpunkt 30 min nach einer weiteren Stunde zu einer Volumenzunahme von insgesamt 6,1% (Abbildung 28B). Die zusätzliche Applikation des scFv12 induzierte wie die zweite Applikation von IAA eine entsprechende Volumenzunahme. Erfolgte eine Vorinkubation mit 10 μM 2-NAA für 30 min wurde nach der Zugabe von 10^{-8} M scFv12 eine Volumenzunahme von 5,5% innerhalb 1 h beobachtet (Abbildung 28B). 2-NAA bewirkte alleine keine Volumenzunahme (Abbildung 24A), zusammen mit dem scFv12 induzierte es dagegen eine Volumenzunahme, die stärker ist als die vom scFv12 alleine.

ScFv12 induzierte einen auxinähnlichen Effekt. In einem Kompetitionsversuch mit IAA zeigten sich keine Veränderungen in der Volumenzunahme im Vergleich zu einer doppelten Applikation von IAA. Wurden Protoplasten dagegen mit 2-NAA vorinkubiert, konnte mit scFv12 ein verstärkter Volumenzuwachs beobachtet werden. 2-NAA und scFv12 interagieren scheinbar gemeinsam mit ABP1 und induzieren zusammen einen stärkeren Effekt als einer der beiden alleine.

3.3.6. Effektoren, die zu einer Nettovolumenzunahme bei Protoplasten führen, verringern die Fluoreszenz von FM4-64 in der Plasmamembran

Der Fluoreszenzfarbstoff FM4-64 gilt als spezifischer Marker für die Plasmamembran. Er wird über Endozytose der Plasmamembran in die Endosomenmembran, die Membran des Golgi-Apparates und den Tonoplast eingebracht (Bolte *et al.*, 2004). Über die Effektoren IAA, IAN, PSK- α , dsPSK, AS-PSK sollte mit Hilfe von FM4-64 beobachtet werden, ob die Auxin-beziehungsweise PSK- α -induzierte Volumenzunahme von Protoplasten auch das Zyklieren der Plasmamembran beeinflusst. Anschließend sollten der oder die beobachteten Effekte mit den Wirkungen des C-terminalen Peptids und des scFv12 von ABP1 verglichen werden. Daraus sollten Rückschlüsse über einen eventuellen Einfluß von ABP1 auf das Zyklieren gezogen werden.

Kontroll-Protoplasten, die ausschließlich mit dem Farbstoff behandelt wurden, zeigten eine starke Fluoreszenz in der Plasmamembran (Abbildung 29A-C und Abbildung

30A). Innerhalb der ersten 10 min nahm die Fluoreszenzintensität leicht zu (Abbildung 29A, B) und blieb für weitere 50 min unverändert (Abbildung 29C und Daten nicht gezeigt). Wurden Maisprotoplasten mit Effektoren behandelt, erfolgte 5 min später bei $t = 0$ min die Zugabe von FM4-64. Nach einer Behandlung mit $10 \mu\text{M}$ IAA konnte nur ein schwaches Fluoreszenzsignal beobachtet werden (Abbildung 29D–F und Abbildung 30B). Auch nach 1 h wurde keine Veränderung festgestellt (nicht dargestellt). Wurden Protoplasten mit $10 \mu\text{M}$ IAN behandelt, wurde in den ersten Minuten eine starke Fluoreszenz beobachtet. Diese zeigte eine vergleichbare Intensität wie bei Kontroll-Protoplasten. Innerhalb der nächsten 10 min war eine leichte Verringerung der Fluoreszenz festzustellen (Abbildung 29G–I). Diese schien über einen weiteren Zeitraum von 50 min unverändert (nicht dargestellt).

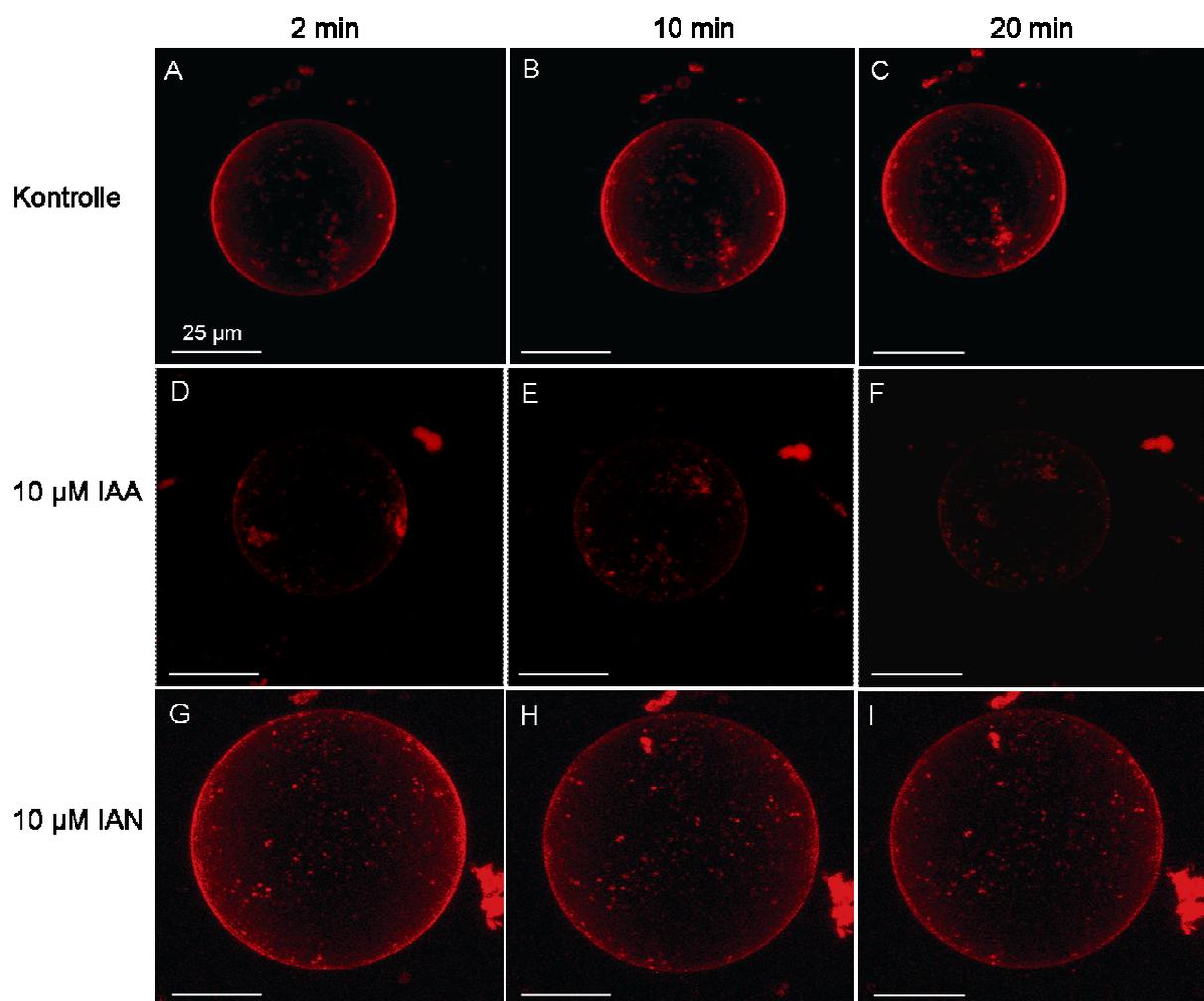


Abbildung 29: Maisprotoplasten nach Zugabe von IAA oder IAN und anschließender Applikation des Fluoreszenzfarbstoffs FM4-64. 5 min nach einer Vorinkubation mit $10 \mu\text{M}$ IAA oder $10 \mu\text{M}$ IAN wurden $8 \mu\text{M}$ Farbstoff appliziert. Die Zugabe von FM4-64 erfolgte bei $t = 0$ min. **A bis C** Dargestellt ist jeweils ein typischer Kontroll-Protoplast. Es wurden 7 Protoplasten in 4 Versuchen beobachtet. **D bis F** Typische Färbung eines von 6 mit $10 \mu\text{M}$ IAA behandelten Protoplasten aus 3 Versuchen. **G bis I** Typische Färbung eines von 3 mit $10 \mu\text{M}$ IAN behandelten Protoplasten. Die Bilder wurden am CLSM aus 10 bis 20 Einzelbildern zusammengesetzt. Die Balken entsprechen $25 \mu\text{m}$.

15 min nach der Zugabe von 1 μM C-terminalem Peptid von ABP1, 10^{-8} M scFv12 oder 0,1 nM PSK- α konnte nur eine schwache Fluoreszenz von FM4-64 in der Plasmamembran beobachtet werden (Abbildung 30B-E). Nach der Zugabe von 0,1 nM dsPSK erscheint das Fluoreszenzsignal dagegen dem von Kontroll-Protoplasten zu entsprechen (Abbildung 30A, F). Während eines Beobachtungszeitraumes von 1 h wurde keine Veränderungen festgestellt (nicht dargestellt).

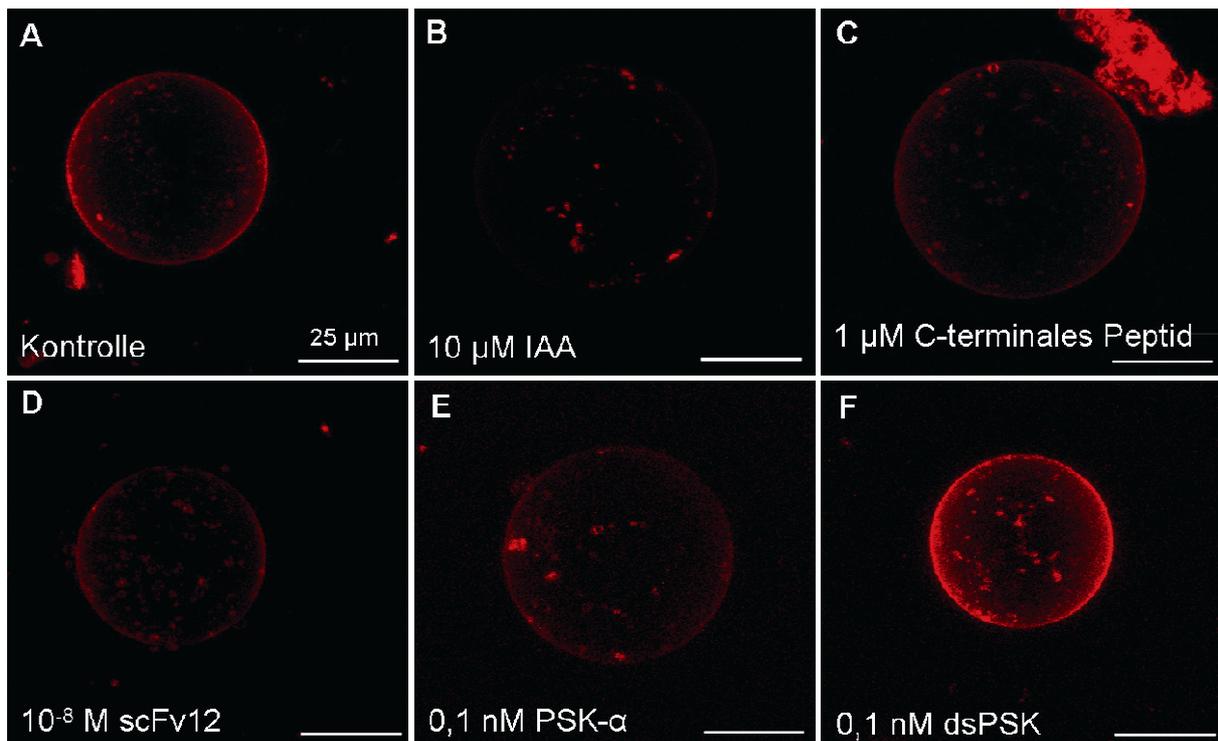


Abbildung 30: Effekte von IAA, C-terminalem Peptid, scFv12, PSK- α oder dsPSK auf die Fluoreszenz des membranspezifischen Farbstoffes FM4-64. Dargestellt ist jeweils ein Protoplast mit typischer Färbung 10 min nach Zugabe von FM4-64. Die Effektoren wurden 5 min vor der Zugabe des Farbstoffs appliziert. **A** Ein typisch gefärbter Kontroll-Protoplast von insgesamt 7 Protoplasten aus 4 Versuchen. **B** Färbung eines von 6 mit 10 μM IAA behandelten Protoplasten aus 3 Versuchen. **C** Typische Färbung eines von 4 mit 1 μM C-terminalem Peptid behandelten Protoplasten. **D** Ein typisch gefärbter Protoplast von 6 mit 10^{-8} M scFv12 behandelten Protoplasten. Typische Färbung eines mit 0,1 nM PSK- α (**E**) und mit 0,1 nM dsPSK behandelten (**F**) Protoplasten. Es wurden jeweils 4 Protoplasten beobachtet. Die mit einem CLSM aufgenommenen Bilder wurden aus 10 bis 20 Einzelbildern zusammengesetzt. Die Balken entsprechen jeweils 25 μm .

In diesen Versuchen wurde beobachtet, dass alle untersuchten Substanzen (IAA, PSK- α , C-terminales Peptid von ABP1 und scFv12), die bei Maisprotoplasten eine Volumenzunahme induzierten, in diesem Versuchsaufbau zu einem geringeren Fluoreszenzsignal in der Plasmamembran führten. Die IAA-Applikation induzierte die stärkste Abnahme der FM4-64-Fluoreszenz in der Plasmamembran. Nach IAN-Behandlung

verringerte sich die Fluoreszenz erst nach einer *lag*-Phase von 10 min. Dies entsprach auch dem IAN-Effekt der Nettovolumenzunahme, die ebenfalls erst nach 10 min induziert wurde. Unsulfatiertes PSK, welches keinen Effekt auf die Volumenzunahme besaß, zeigte auch keine verringernde Wirkung auf das Fluoreszenzsignal. Wodurch die Verminderung des Fluoreszenzsignals von FM4-64 genau hervorgerufen wurde, konnte nicht ermittelt werden. Da kein Membranzyklieren beobachtet werden konnte, lässt sich keine Aussage darüber machen, in wie weit ABP1 das Zyklieren beeinflusst. Allerdings wurde der von IAA und auch PSK- α induzierte Effekt, die Verringerung der FM4-64-Fluoreszenz in der Plasmamembran auch über den ABP1-Signalweg induziert, wie die Versuche mit dem C-terminalen Peptid und dem scFv12 zeigten.

4. Diskussion

Mit TIR1 und AFB1, AFB2 und AFB3 wurde eine Auxinrezeptor-Familie identifiziert. Diese Rezeptoren sind F-Box Proteine und damit Bestandteil eines SCF-Komplexes. Sie vermitteln auxinabhängig den Abbau von Aux/IAA-Proteinen, Repressoren der auxinabhängigen Genexpression (Dharmasiri *et al.*, 2005a, b; Kepinski und Leyser, 2005). Allerdings lassen sich nicht alle auxinvermittelten Reaktionen über diesen Auxinrezeptor-Signalweg erklären. Insbesondere schnelle Reaktionen, wie zum Beispiel die von Auxin ausgelöste Hyperpolarisation der Plasmamembran (Ephritikhine *et al.*, 1987), die innerhalb einer Minute induziert wird, ist kaum über einen Auxinsignalweg mit Proteinabbau, Genexpression und *de novo* Synthese von Proteinen zu erklären. Für schnelle auxinvermittelte Reaktionen wird ein weiterer Auxinsignalweg vorgeschlagen, in dem das Auxin-bindende Protein 1 (ABP1) als Auxinrezeptor fungieren könnte. Ein viel diskutierter Wirkort von ABP1 könnte die Plasmamembran sein (Klämbt, 1990; MacDonald, 1997; Steffens *et al.*, 2001). Die Perzeption des disulfatierten Pentapeptids Phytosulfokin- α (PSK- α) scheint ebenfalls an der Plasmamembran stattzufinden (Matsubayashi *et al.*, 2002, 2006). In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass Auxin über ABP1 vermittelt die Volumenzunahme von Protoplasten induziert. Es wurde gezeigt, dass PSK- α einen Einfluss auf das Volumen von Protoplasten ausübt und dass diese Wirkung mit der durch ABP1-vermittelten Auxinwirkung Ähnlichkeiten aufweisen.

4.1. Phytosulfokin- α induziert kaliumabhängig die Volumenzunahme von Protoplasten

Phytosulfokin- α (PSK- α) ist ein disulfatiertes Pentapeptid mit hormonähnlichen Eigenschaften. Es fördert in geringen Konzentrationen Zellteilung von Suspensionszellen geringer Dichte (Matsubayashi und Sakagami, 1996; Yang *et al.*, 2000), Keimung von Pollen geringer Dichte (Chen *et al.*, 2000) und somatische Embryogenese (Hanai *et al.*, 2000; Igasaki *et al.*, 2003; Umehara *et al.*, 2005). Somit scheint PSK- α an der Förderung oder Induktion von Zellteilung beteiligt zu sein (Matsubayashi und Sakagami, 1996; Matsubayashi *et al.*, 1999b; Chen *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 2000). PSK- α wurde in konditionierten Medium von Zellkulturen aus *Asparagus officinalis* nachgewiesen. Zellen, die mit konditioniertem Medium behandelt wurden, besaßen eine höhere Teilungsrate (Matsubayashi und Sakagami, 1996). In Abbildungen von Matsubayashi und Sakagami (1996) werden behandelte und unbehandelte Zellen gezeigt. Obwohl nicht beschrieben, sieht es so aus, als ob die mit PSK- α behandelten Zellen größer sind als Kontrollzellen. Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass PSK- α einen Einfluss auf Zellexpansion besitzen könnte.

Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde in dieser Arbeit untersucht, ob PSK- α einen Einfluss auf das Volumen von Protoplasten aus Maiskoleptilen besitzt. Es konnte

gezeigt werden, dass PSK- α eine Volumenzunahme von Protoplasten in Konzentrationen von 0,5 nM bis 10 nM induziert. Unsulfatiertes PSK und ein Gemisch einer äquimolaren Konzentration der Aminosäuren von PSK- α bewirkten dagegen keine Volumenänderung. Der PSK- α -Effekt entspricht in seiner Zeitkinetik dem von ABP1-vermittelten Effekt von IAA. Beide induzierten nach Applikation eine sofortige Volumenzunahme ohne *lag*-Phase. Beide Signale, PSK- α und IAA, könnten die gleichen Prozesse in Gang setzen und möglicherweise über die gleichen Signalüberträger wirken.

IAA führt zur Expansion von Maisprotoplasten. Dieser Effekt ist von der Kaliumkonzentration abhängig (Christian *et al.*, 2006). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die von PSK- α induzierte Volumenzunahme ebenfalls kaliumabhängig ist. Mit abnehmender Kaliumkonzentration im Puffer nahm die Wirkung von PSK- α ab. PSK- α könnte, wie IAA, Kaliumkanäle regulieren. Für IAA ist bekannt, dass es den einwärtsgerichteten Kaliumkanal ZMK1 in der Maiskoleoptile aktiviert (Phillippar *et al.*, 1999). Über *Patch-Clamp*-Versuche könnte geklärt werden, ob tatsächlich Kaliumkanäle durch PSK- α reguliert werden und ob es sich hierbei um einwärts- oder auswärtsgerichtete Kanäle handelt. In *Daucus carota* und *Arabidopsis thaliana* wurden die LLR (*leucine rich repeat*)-Rezeptorkinasen DcPSKR1 und AtPSKR1 als PSK- α -Rezeptoren identifiziert. Über Mutanten, deren PSK-Rezeptor ausgeschaltet wurde, könnte ebenfalls untersucht werden, ob die PSK- α -Signalübertragung für die kaliumabhängige Volumenzunahme von Protoplasten verantwortlich ist.

Einen Hinweis auf eine Beteiligung von PSK- α bei der Osmoregulation geben auch Promotor-GUS-Analysen. Diese zeigten, dass *AtPSKR1* und Gene, die für Präproproteine von PSK- α kodieren, unter anderem in Stomata exprimiert werden (Anke Kutschmar, Universität Kiel, persönliche Mitteilung). Je nachdem, ob sich Stomata öffnen oder schließen, sind auswärts- oder einwärtsgerichtete Kaliumkanäle aktiv (Dreyer *et al.*, 1997; Büchenschütz *et al.*, 2005). Es könnte untersucht werden, ob sich die Apertur von Stomata durch PSK- α verändert und ob dabei ebenfalls, wie in Protoplasten aus Maiskoleoptilen, Kalium und Kaliumkanäle involviert sind. Hierzu würden sich wiederum *Patch-Clamp*-Versuche eignen.

Es wird postuliert, dass die Aktivität von Kaliumkanälen über das Zyklieren an der Plasmamembran reguliert wird (Hurst *et al.*, 2004; Fuchs *et al.*, 2006). Für Kaliumkanäle, die bei der Stomataregulation beteiligt sind, wurde gezeigt, dass sie zwischen Plasmamembran und Vesikeln zyklieren (Sutter *et al.*, 2006). Die Wirkung von PSK- α auf Protoplasten war kaliumabhängig und möglicherweise werden Kaliumkanäle durch PSK- α reguliert. In dieser Arbeit wurde über Experimente mit dem Fluoreszenzfarbstoff FM4-64 der Einfluss von PSK- α auf das Zyklieren der Plasmamembran untersucht. Zugabe von PSK- α zu Protoplasten führte zu einer Abnahme der FM4-64-Fluoreszenz in der Plasmamembran. Protoplasten, die

mit unsulfatierten Pentapeptid behandelt wurden, zeigten dagegen keine Veränderung in der FM4-64-Fluoreszenz in der Plasmamembran und entsprachen damit Kontroll-Protoplasten. IAA reduzierte ebenfalls die Fluoreszenz von FM4-64 in der Plasmamembran. Wodurch die Reduktion der FM4-64-Fluoreszenz bei IAA- oder PSK- α -Behandlung hervorgerufen wird, ist noch zu klären. Der PSK- α -Rezeptor ist wie der Brassinosteroidrezeptor BRI1 eine LLR-Rezeptorkinase. Beide sind an der Plasmamembran lokalisiert (Li und Chory 1997; Matsubayashi *et al.*, 2002; Cano-Delgado *et al.*, 2004; Shinohara *et al.*, 2007). Für BRI1 ist bekannt, dass er zwischen Endosomen und Plasmamembran zyklisiert (Ruscinova *et al.*, 2004; Geldner *et al.*, 2007). Über ein fluoreszenzmarkiertes PSK- α -Rezeptorprotein könnte ermittelt werden, ob der PSK- α -Rezeptor wie BRI1 zyklisiert. Über Versuche mit fluoreszenzmarkierten Kaliumkanälen oder H⁺-ATPasen könnte untersucht werden, ob PSK- α einen Einfluss auf das Zyklisieren dieser am Wachstum beteiligten Proteine besitzt.

4.2. ABP1 als möglicher Rezeptor für auxininduziertes Streckungswachstum

Für das auxininduzierte Streckungswachstum wird ABP1 als Auxinrezeptor diskutiert (Jones *et al.*, 1998; Christian *et al.*, 2003). Tabakzellen, die ZmABP1 überexprimieren, sind größer als Kontrollzellen (Jones *et al.*, 1998). In der *diageotropica* (*dgt*) Mutante aus Tomate induziert Auxin kein Streckungswachstum im Hypokotyl (Christian und Lüthen, 2000; Christian *et al.*, 2003), inhibiert nicht das Wachstum von älteren Wurzeln (Coenen *et al.*, 2002) und induziert keine Protonensekretion (Coenen *et al.*, 2002). Ebenso ist die *dgt*-Mutante im Gravitropismus gestört (Madlung *et al.*, 1999; Rice und Lomax, 2000). Es wurde gezeigt, dass das IAA-induzierte Streckungswachstum von Hypokotylen bei der *dgt*-Mutante gestört ist. Auch reagieren Protoplasten aus diesem Gewebe nicht mehr mit Volumenzunahme auf Auxin. Antikörper, die gegen Box a von ABP1 gerichtet sind und bei Kontrollprotoplasten eine mit IAA-vergleichbare Volumenzunahme auslösen, induzierten bei der *dgt*-Mutante keine Volumenzunahme. Dies ist ein Indiz dafür, dass ABP1 das auxininduzierte Streckungswachstum vermittelt. Durch Auxin wird Streckungswachstum induziert indem plasmamembranständige H⁺-ATPasen aktiviert und verstärkt Protonen in den Apoplasten transportiert werden. Dies hat eine Hyperpolarisation der Plasmamembran zur Folge (Barbier-Brygoo *et al.*, 1989; Rück *et al.*, 1993). Hierdurch werden einwärtsgerichtete Kaliumkanäle aktiviert und Kalium in die Zelle aufgenommen (Phillippar *et al.*, 1999), wobei zusätzlich Wasser einströmt. Der Turgor der Zelle nimmt zu. Durch die Ansäuerung des Apoplasten werden Expansine aktiviert (Cosgrove *et al.*, 2002). Diese ermöglichen das Dehnen der Zellwand und Streckungswachstum setzt ein. Das Streckungswachstum selbst setzt erst nach einer zehn- bis zwanzigminütigen *lag*-Phase nach Auxinapplikation ein

(Christian und Lüthen, 2000; Christian *et al.*, 2003; Hager, 2003). Der Grund für die Verzögerung scheint die langsame Ansäuerung des Apoplasten zu sein. Werden Hypokotyle in einem sauren Puffer um einen pH-Wert von 4 inkubiert, setzt Streckungswachstum sofort ein, das so genannte „Säurewachstum“ (Hager, 2003). Die Hyperpolarisation der Plasmamembran und die Aktivierung von plasmamembranständigen H⁺-ATPasen und einwärtsgerichteten Kaliumkanälen erfolgt innerhalb einer Minute (Barbier-Brygoo *et al.*, 1989; Rück *et al.*, 1993; Badescu und Napier, 2006). Die ersten Reaktionen auf Auxin bei der Zellstreckung scheinen somit nicht von der F-Box Auxinrezeptor-Familie vermittelt zu werden. Durch die gleichen Mechanismen, die bei Zellen zur Streckung führen, reagieren Protoplasten aus sich streckenden Organen auf Auxin mit Volumenzunahme. Da bei Protoplasten die Zellwand fehlt, wird die Volumenzunahme schon innerhalb der ersten Minute induziert. Durch das Fehlen der Zellwand als Barriere für Antikörper und die schnelle Aufnahme von Effektoren unter einer Größe von 10 kDa (Lucas und Lee, 2004) werden Protoplasten für Untersuchungen zum Auxinsignalweg herangezogen und die auxininduzierte Volumenzunahme mit dem Streckungswachstum verglichen.

Protoplasten von Koleoptilen aus *Zea mays*, von Hypokotylen aus *Arabidopsis thaliana* und *Solanum lycopersicum* sowie aus internodialen Epidermiszellen von *Pisum sativum* reagieren auf Auxin mit einer schnellen Volumenzunahme (Steffens und Lüthen, 2000, Steffens *et al.*, 2001; Yamagami *et al.*, 2004; Christian *et al.*, 2006). Bei Protoplasten aus Tabakmesophyllzellen induziert Auxin die Hyperpolarisation der Plasmamembran (Barbier-Brygoo *et al.*, 1989, 1991; Rück *et al.*, 1993). In dieser Arbeit wurde mit Protoplasten aus Maiskoleoptilen gearbeitet. Eigene Experimente bestätigten eine IAA-induzierte Volumenzunahme. Dies war eine Grundvoraussetzung für die folgenden Versuche zur Aufklärung der Rolle von ABP1 im Auxinsignalweg.

Der hochkonservierte C-Terminus von ABP1 scheint eine Interaktionsdomäne zu sein. Dies zeigten eigene Versuche mit einem C-terminalen Peptid von ZmABP1. Das C-terminale Peptid alleine führte wie IAA bei Protoplasten, zu einer sofortigen Volumenzunahme (Abbildung 31A). Dies bestätigen frühere Versuche von Steffens *et al.* (2001). Daneben löste das C-terminale Peptid von ABP1 eine Hyperpolarisation der Plasmamembran (Leblanc *et al.*, 1999b; David *et al.*, 2001) und das Öffnen von Stomata, welches ebenfalls durch Auxin induziert wird, aus (Thiel *et al.*, 1993). Ein Anti-C-Terminus Antikörper inhibierte dagegen die von IAA induzierte Volumenzunahme bei Protoplasten (Steffens *et al.*, 2001; Christian *et al.*, 2006). Auch die Applikation eines Anti-ABP1 Antikörpers inhibierte die von Auxin ausgelöste Volumenzunahme (Steffens *et al.*, 2001) sowie die Hyperpolarisation der Plasmamembran (Barbier-Brygoo *et al.*, 1989). Diese Ergebnisse deuten auf eine Funktion von ABP1 beim auxinvermittelten Streckungswachstum von Sprossstellen hin.

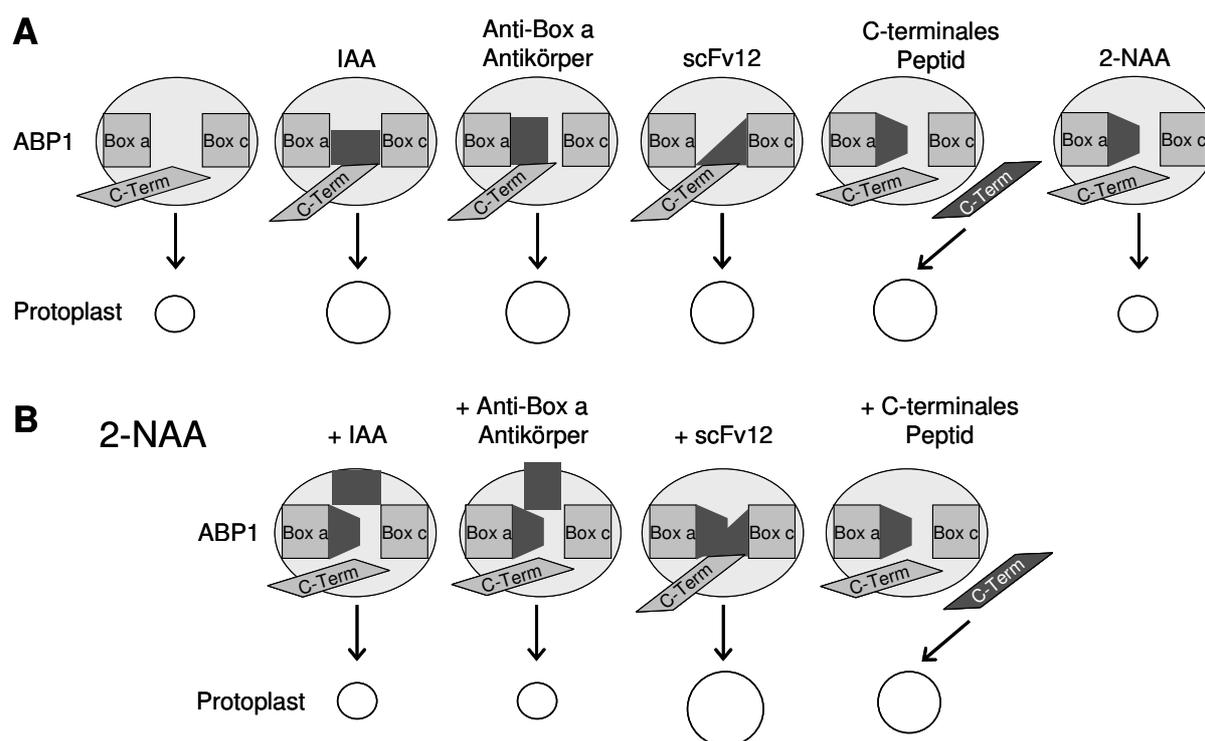


Abbildung 31: Modell der Interaktion von IAA, 2-NAA, dem Anti-Box a Antikörper, dem scFv12 und dem C-terminalen Peptid von ZmABP1 mit ABP1 und die daraus resultierenden Wirkungen auf Protoplasten aus Maiskoleoptilen. **A** ABP1 alleine induziert kein Anschwellen der Protoplasten. Die Boxen a und c sind unbesetzt. Der C-Terminus (C-Term) ist in seiner Stellung unverändert. IAA, Anti-Box a Antikörper, scFv12 und das C-terminale Peptid führen zu einer Volumenzunahme. 2-NAA induziert keine Volumenzunahme. **B** In Wettbewerbsversuchen mit 2-NAA wird die Wirkung von IAA und vom Anti-Box a Antikörper durch vorherige Applikation von 2-NAA gehemmt. Der Effekt des C-terminalen Peptids ist unabhängig von einer vorherigen 2-NAA-Applikation. Die von scFv12 induzierte Volumenzunahme wird durch eine Vorinkubation mit 2-NAA nicht inhibiert, sondern verstärkt.

Für Untersuchungen des ABP1-Signalweges sind Effektoren hilfreich, die an ABP1, aber nicht an TIR1 binden und die keine Auxinwirkung auslösen. 2-NAA ist solch ein Effektor. 2-NAA zeigt im Gegensatz zu 1-NAA in Auxinbioassays nur eine geringe oder keine Auxinwirkung (Katekar, 1979). Nach theoretischen Kalkulationen bindet 2-NAA mit hoher Affinität an ABP1 (Edgerton *et al.*, 1994). 2-NAA unterstützt nicht wie 1-NAA die Bindung von TIR1 an Aux/IAA-Proteine und 2-NAA induziert keinen TIR1-abhängigen Proteinabbau (Kempinski und Leyser, 2005). Wie Steffens und Lüthen (2000) zeigten, bestätigten Versuche dieser Arbeit, dass 2-NAA keinen mit IAA-vergleichbaren Effekt auf das Volumen von Maisprotoplasten ausübt (Abbildung 31A). In Wettbewerbsversuchen inhibierte 2-NAA die von IAA induzierte Volumenzunahme (Abbildung 31B). Die Bindungsaffinität von 2-NAA an ABP1 könnte stärker als die von IAA sein und IAA möglicherweise verdrängen. Dies würde den Vorhersagen von Edgerton *et al.* (1994) entsprechen. Für die Aktivierung von

ABP1 scheint die Stellung der Carboxylgruppe des Auxins wichtig zu sein (Woo *et al.*, 2002; Bertoša *et al.*, 2007). Die Carboxylgruppe interagiert mit einem Zinkion in der Auxinbindetasche von ABP1 (Woo *et al.*, 2002; Bertoša *et al.*, 2007). Die Carboxylgruppe von 2-NAA ist im Vergleich zu 1-NAA um ein C-Atom im aromatischen Ringsystem versetzt und zeigt somit in eine andere Richtung. Dies könnte der Grund für die Inaktivität von 2-NAA trotz starker Bindung sein. Nachdem gezeigt wurde, dass 2-NAA eine IAA-induzierte Volumenzunahme unterbindet, wurden Versuche mit 2-NAA und dem C-terminalen Peptid durchgeführt. Das C-terminale Peptid von ABP1 induzierte trotz Vorinkubation mit 2-NAA bei Protoplasten eine Volumenzunahme (Abbildung 31B). 2-NAA blockiert wahrscheinlich die Bindetasche für Auxin von ABP1, nicht aber die vom C-Terminus von ABP1 ausgehende Wirkung der Volumenzunahme, wie bereits von Steffens *et al.* (2001) gezeigt wurde.

Durch die Auxinbindung an ABP1 könnte sich der C-Terminus als Interaktionsdomäne in seiner Ausrichtung am Molekül verändern, wodurch eine Aktivität von ABP1 ausgelöst wird. Über die Kristallstruktur von ZmABP1 mit 1-NAA als interagierendem Auxin wurde die Auxinbindetasche näher beschrieben (Woo *et al.*, 2002). Für die Interaktion mit Auxin wichtige Aminosäuren sind vor allem in der hochkonservierten Box a vertreten. Hier sind drei der vier Aminosäuren lokalisiert, die das Zinkion binden und so bei der Interaktion mit der Carboxylgruppe mitwirken. Zwei der insgesamt fünf Aminosäuren, die mit dem aromatischen Ringsystem von Auxin interagieren, befinden sich ebenfalls in der Box a. Ein Antikörper, der gegen Box a von ABP1 gerichtet ist, induziert wie IAA eine Hyperpolarisation der Plasmamembran (Venis *et al.*, 1992; Leblanc *et al.*, 1999a) und eine Volumenzunahme bei Protoplasten (Steffens *et al.*, 2001). Er imitiert möglicherweise die Auxinbindung an Box a und löst dadurch eine Wirkung aus (Abbildung 31A). In Konkurrenz mit 2-NAA war der Anti-Box a Antikörper nicht mehr wirksam (Abbildung 31B, Bianka Steffens, Universität Kiel, persönliche Mitteilung). Neben Box a bindet Auxin auch an Box c, wie Bindestudien mit photoaktivierter IAA zeigten (Brown und Jones, 1994). Über die Kristallstruktur von ZmABP1 wurde gezeigt, dass eine Aminosäure der Box c an der Bindung des aromatischen Ringes von 1-NAA beteiligt ist (Woo *et al.*, 2002). Der gegen NtABP1 generierte Antikörper Mab12 und sein Antikörperfragment scFv12 besitzen eine starke Bindungsaffinität für Box c und eine schwache für Box a (Leblanc *et al.*, 1999a; David *et al.*, 2001). In Hyperpolarisationsversuchen hemmt Mab12 die von 1-NAA induzierte Hyperpolarisation der Plasmamembran von Tabakmesophyllzellen (Leblanc *et al.*, 1999a). Mab12 und scFv12 besitzen eine hohe Affinität für NtABP1 (David *et al.*, 2007). Tabak BY2-Zellen, die den scFv12 mit einer KDEL-Signalsequenz für das ER induzierbar exprimieren, sind in ihrer Zellteilung gehemmt (David *et al.*, 2007). In eigenen Versuchen mit Protoplasten aus Maiskoleoptilen induzierte scFv12 dagegen, ähnlich wie IAA, eine Volumenzunahme bei Protoplasten (Abbildung 31A). scFv12 bindet hauptsächlich an Box c. Dies scheint die

Volumenzunahme auszulösen. Box c scheint ebenfalls wichtig für die Wirkung von Auxin über ABP1 zu sein. In Wettbewerbsversuchen mit 2-NAA wurde die Wirkung von scFv12 nicht gehemmt, wie es bei IAA oder Antikörpern gegen Box a der Fall war. Die von scFv12 induzierte Volumenzunahme wurde vielmehr durch 2-NAA gefördert (Abbildung 31B). 2-NAA interagiert demnach nicht mit der gesamten Auxinbindetasche. Vermutlich gibt es keine Interaktion mit dem Zinkion und eine Volumenzunahme bei Protoplasten unterbleibt. ScFv12 interagiert nur schwach mit Box a und stark mit Box c. Die Interaktion reicht jedoch, um eine Volumenzunahme bei Protoplasten auszulösen. ScFv12 kann vermutlich zusätzlich zu 2-NAA an ABP1 binden. Zusammen werden Box a und Box c belegt und eine starke Volumenzunahme ausgelöst. In Wettbewerbsversuchen mit IAA und scFv12 zeigten Protoplasten eine der IAA-Wirkung vergleichbare Volumenzunahme. IAA besetzt wahrscheinlich alle Auxinbindedomänen, so dass scFv12 nicht binden kann. Die Interaktion der Carboxylgruppe des Auxins mit dem Zinkion in der Auxinbindetasche so wie Box c sind wichtig für die von ABP1 ausgehende Wirkung.

4.3. Das über ABP1 vermittelte Auxinsignal beeinflusst die Fluoreszenz von FM4-64 in der Plasmamembran

Das Zyklieren von Membranen ist in Pflanzen ein wichtiger Prozess bei der Internalisierung und der Wiederverwertung von Molekülen, wie plasmamembranassoziierten Proteinen und Sterolen (Geldner *et al.*, 2001; Grebe *et al.*, 2003; Hurst *et al.*, 2004). Rezeptoren, die extrazelluläre Signale weiterleiten, Transporter, Protonenpumpen sowie Kaliumkanäle scheinen ebenfalls über Plasmamembranzyklieren in ihrer Aktivität reguliert zu werden (Murphy *et al.*, 2005). Proteine und andere Membranbestandteile können über Exozytose vom Golgiapparat über Vesikel, wie partiell ummantelte Vesikel zur Plasmamembran transportiert werden. Dort verschmelzen die Vesikel mit der Plasmamembran, oder es werden nur Teile der Vesikel mit der Plasmamembran ausgetauscht, wodurch die exozytierten Moleküle in die Plasmamembran gelangen (Harata *et al.*, 2006). Über Endozytose werden Membranbestandteile wiederum über Vesikel und Endosomen in die Zelle aufgenommen und wiederverwertet oder in die Vakuole transportiert und dort abgebaut (Maxfield *et al.*, 2004; Tse *et al.*, 2004).

Auxin wird über Efflux-Carrier, die PIN-Proteine, polar transportiert und reguliert selbst die Aktivität der PIN-Proteine, indem es das endozytotische Zyklieren verlangsamt. Dadurch bleiben mehr PIN-Proteine in der Plasmamembran lokalisiert (Paciorek *et al.*, 2005). Plasmamembranständige H⁺-ATPasen werden durch Auxin verstärkt zur Plasmamembran transportiert (Geldner *et al.*, 2001). Auch Kaliumkanäle sind endozytotisch reguliert (Hurst *et al.*, 2004; Meckel *et al.*, 2004) und durch Auxin nimmt ihre Aktivität an der

Plasmamembran zu. Die erhöhte Aktivität scheint ebenfalls durch einen verstärkten Transport zur Membran induziert zu werden (Hurst *et al.*, 2004; Fuchs *et al.*, 2006). Der Auxin Influx-Carrier AUX1 zykliert zwischen Plasmamembran und endosomalen Kompartimenten (Kleine-Vehn *et al.*, 2006). Ob dieses Zyklieren durch Auxin induziert wird, ist unklar.

ABP1 könnte im Signalweg von IAA, bei der Aktivierung von plasmamembranständigen H⁺-ATPasen und Kaliumkanälen in Protoplasten eine Rolle spielen (Rück *et al.*, 1993; Phillippar *et al.*, 1999; Christan *et al.*, 2006). Es besteht die Möglichkeit, dass ABP1 das Zyklieren der Protonenpumpen und der Kaliumkanäle beeinflusst, wodurch deren Aktivität gesteigert werden könnte. Sowohl der Transport zur Plasmamembran könnte gefördert als auch die Endozytose inhibiert werden.

Der nur in lipophiler Umgebung fluoreszierende Farbstoff FM4-64 wird häufig verwendet, um das Zyklieren der Plasmamembran zu beobachten (Geldner *et al.*, 2003; Meckel *et al.*, 2004). Er inseriert mit dem lipophilen Ende in die äußere Lipidschicht der Plasmamembran und wird über endozytotisches Zyklieren in Membranvesikel, die Membranen von Endosomen und Golgiapparat sowie den Tonoplast verteilt (Meckel *et al.*, 2004). In dieser Arbeit wurde untersucht, ob die auxininduzierte Volumenzunahme bei Protoplasten einen Effekt auf die Verteilung von FM4-64 hat. Protoplasten, die mit FM4-64 inkubiert wurden, besaßen eine stark fluoreszierende Plasmamembran. Bei mit IAA-behandelten Protoplasten war dagegen nur eine sehr geringe Fluoreszenz in der Plasmamembran zu beobachten. Nach Behandlung mit Indol-3-Acetonitril (IAN), einer Vorstufe von IAA, verringerte sich ebenfalls die Fluoreszenz in der Plasmamembran. Dies geschah jedoch erst nach einer zehnmütigen *lag*-Phase, wie sie auch bei der Volumenzunahme zu beobachten war. Diese Verzögerung könnte durch die langsame enzymatische Umwandlung von IAN zu IAA hervorgerufen werden. Auxin führte demnach zu einer starken Verringerung der FM4-64 Fluoreszenz in der Plasmamembran. Zudem wurde beobachtet, dass diese Antwort auch über einen ABP1-abhängigen Signalweg induziert werden konnte. Das C-terminale Peptid von ABP1 und scFv12, welche eine Volumenzunahme bei Protoplasten hervorrufen, führten ebenfalls zu einer verminderten FM4-64 Fluoreszenz in der Plasmamembran. Alle untersuchten Effektoren, die eine Volumenzunahme bei Protoplasten induzierten, führten zu einer Verminderung der Fluoreszenz von FM4-64 in der Plasmamembran. Anhand der Versuche kann vermutet werden, dass auch ABP1 einen Einfluss auf das Zyklieren der Plasmamembran besitzt.

Über die Ursache der Fluoreszenzverminderung kann nur spekuliert werden. Bei Untersuchungen zum Zyklieren von PIN-Proteinen wurde ebenfalls FM4-64 verwendet. Die Versuche wurden an Wurzeln von *Arabidopsis* durchgeführt (Paciorek *et al.*, 2005; Blakeslee *et al.*, 2007). Durch die Applikation von 1-NAA zu *Arabidopsis*wurzeln wurde die Aufnahme

des Farbstoffes in die Zellen verlangsamt. Die Plasmamembran war stark gefärbt. Innere Zellkompartimente wurden im Vergleich zu einer Kontrolle ohne Auxinbehandlung erst nach einer Stunde angefärbt. Das endozytotische Zyklieren war durch Auxin verlangsamt. In Versuchen an Protoplasten aus Koleoptilen mit Effektoren, die die Volumenzunahme induzieren, schien die Aufnahme von FM4-64 nicht verlangsamt, da im Inneren der Protoplasten Kompartimente schon nach kurzer Zeit gefärbt waren. Der Farbstoff kann nur über Endozytose der Plasmamembran aufgenommen werden und so in innere Zellkompartimente gelangen. In der Plasmamembran schien die Fluoreszenz schnell und spezifisch abzunehmen. Ein wichtiger Unterschied zwischen den Versuchen an Protoplasten und an Wurzeln ist, dass die verwendeten Protoplasten als Reaktion auf Auxin sehr schnell an Volumen zunehmen und sich die Plasmamembranfläche schnell vergrößert. Entsprechende IAA-Konzentrationen hemmen dagegen bei Wurzeln das Streckungswachstum (Thimann, 1936). Es wird demnach eine andere Antwort ausgelöst als in der Koleoptile. Es wäre interessant die unterschiedlichen Reaktionen auf Auxin in den verschiedenen Geweben genauer zu untersuchen. Um das Zyklieren direkt beobachten zu können, würden sich für die vergleichenden Versuche Protoplasten aus Wurzeln und Hypokotylen anbieten.

Auxin induziert über ABP1 bei Protoplasten eine schnelle Volumenzunahme. Innerhalb einer Stunde erhöht sich das Volumen der Protoplasten um 5%. Die Plasmamembran kann sich nur bis zu 3% dehnen. Jede weitere Vergrößerung wird erst durch die aktive Aufnahme von Membranbestandteilen ermöglicht (Homann und Thiel, 2002; Hurst *et al.*, 2004; Meckel *et al.*, 2004). So könnte der schnelle Zuwachs an neuen Membranbausteinen die Fluoreszenz in der Plasmamembran von Protoplasten eventuell verringern. Alleine der Zuwachs der Plasmamembran scheint jedoch nicht auszureichen, um die Verringerung der Fluoreszenz in der Membran zu erklären. Das Wachstum von Pollenschläuchen wurde ebenfalls in Gegenwart von FM4-64 beobachtet. Diese ebenfalls schnell wachsenden Zellen zeigten während ihres polaren Längenwachstums eine anhaltende Färbung in der Plasmamembran mit starkem Vesikeltransport in die Zelle (Parton *et al.*, 2001).

FM4-64 lagert sich durch Endozytose in die Plasmamembran, in Endosomen, den Golgiapparat und den Tonoplast ein und fluoresziert dort bei einer Wellenlänge von 640 nm. Unter diesen Bedingungen fluoreszieren das ER und die Kernmembran nicht (Bolte *et al.*, 2004). Zal *et al.* (2006) zeigten dagegen in Zelllinien aus verschiedenen tierischen Geweben, dass FM-4-64 ebenfalls bei einer Wellenlänge von 480 bis 520 nm fluoresziert und bei dieser Wellenlänge ein spezifischer Marker für die Kernmembran und das ER zu sein scheint. Dies lässt vermuten, dass FM4-64 über Endozytose auch in die ER- und Kernmembran gelangt. Die Wellenlänge der Fluoreszenz von FM4-64 scheint von der Zusammensetzung der

Membran abhängig zu sein (Zal *et al.*, 2006). So könnte sich nach Zal *et al.* (2006) der Gehalt an Phospholipiden unterscheiden und zur Verschiebung des Emissionsspektrums führen. Auch Proteine könnten hierbei eine Rolle spielen. Während der auxininduzierten Vergrößerung der Plasmamembran verändert sich eventuell die Membranzusammensetzung. So werden zum Beispiel plasmamembranständige H⁺-ATPasen und Kaliumkanäle durch Auxin verstärkt zur Plasmamembran transportiert (Geldner *et al.*, 2001; Baluška *et al.*, 2002; Hurst *et al.*, 2004; Fuchs *et al.*, 2006). Dies könnte zur Verschiebung des Emissionsspektrums von FM4-64 führen und eine Fluoreszenz um 640 nm wäre nicht oder kaum mehr detektierbar. In wie weit eine Veränderung der Membranzusammensetzung in einem Zeitraum von einer Minute möglich ist, um eine Verschiebung des Emissionsspektrums hervorzurufen, ist noch zu klären. Um zu untersuchen, ob IAA solch eine Wirkung besitzt, sollte die Fluoreszenz des Farbstoffes FM4-64 parallel bei unterschiedlichen Wellenlängen beobachtet werden.

Im tierischen System wird FM4-64 vor allem für Untersuchungen der Signalweiterleitung in Neuronen verwendet. Über ein spezielles Verfahren, der *second harmonic generation* (SHG), werden Änderungen im Membranpotential in Millisekunden über Veränderungen des Fluoreszenzsignals gemessen (Domedeck *et al.*, 2005; Nurgia *et al.*, 2006; Jiang *et al.*, 2007). In diesem System wurde gezeigt, dass die Fluoreszenz von FM4-64 abhängig von der Polarität der Anregungswellenlänge ist (Jiang *et al.*, 2007). Die Veränderung des Fluoreszenzsignals bei der Änderung des Membranpotentials scheint durch eine Änderung der Achsenausrichtung der FM4-64 Moleküle in der Membran hervorgerufen zu werden. Nicht die Reorientierung des Farbstoffes in der Membran oder die Verschiebung im Emissionsspektrum scheinen für die Minderung der Fluoreszenz verantwortlich zu sein (Jiang *et al.*, 2007). Durch Auxin wird eine Hyperpolarisation der Plasmamembran induziert (Barbier-Brygoo *et al.*, 1989; Rück *et al.*, 1993). Ob diese zu einer Änderung der Ausrichtung von FM4-64 und somit zur Verringerung der Fluoreszenz führt, ist zu überlegen. Zu bedenken ist jedoch, dass die Potentialänderungen in Neuronen in einem anderen Zeitfenster verlaufen als die auxininduzierte Hyperpolarisation der Plasmamembran. Die beobachteten Veränderung der Fluoreszenz bei der Reizweiterleitung dauerten nur Millisekunden (Dombeck *et al.*, 2005; Nuriya *et al.*, 2005). Der beobachtete Effekt in der Protoplastenmembran war nach Zugabe der Effektoren bis zu einer Stunde stabil.

Wodurch die Verringerung der Fluoreszenz in der Plasmamembran hervorgerufen wurde, ob durch eine veränderte Ausrichtung der FM4-64-Moleküle, eine Reorientierung in der Membran oder eine Änderung der Membranzusammensetzung, konnte nicht geklärt werden. Festzustellen ist, dass die Verringerung der Fluoreszenz spezifisch durch Auxin über ABP1 ausgelöst wurde. Ob ABP1 das Zyklieren der Plasmamembran beeinflusst und dadurch H⁺-ATPasen und Kaliumkanäle in ihrer Aktivität verstärkt werden oder ob ABP1

selber zyklisiert, konnte in den Versuchen nicht geklärt werden. GFP-(*green fluorescent protein*) oder anders fluoreszenzmarkiertes ABP1 und markierte H⁺-ATPasen und Kaliumkanäle wären hilfreich, um ein Zyklisieren direkt beobachten zu können. Über Effektoren, wie das C-terminale Peptid, welches eine auxinähnliche Wirkung besitzt, und einen Anti-ABP1 Antikörper, der den Auxineffekt bei Protoplasten inhibiert, könnte untersucht werden, ob ABP1 das Zyklisieren beeinflusst und ob es selbst zyklisiert. Hierzu müsste ein Versuchssystem mit Protoplasten von *Arabidopsis* etabliert werden.

4.4. *AtABP1* wird in teilungsaktivem Gewebe exprimiert

Um herauszufinden, in welchen Geweben und während welcher Entwicklungsstadien von *Arabidopsis thaliana* *AtABP1* aktiv sein könnte, wurde die Promotoraktivität von *AtABP1* analysiert. Aus Wachstumsmessungen von Hypokotylen von etiolierten *Arabidopsis*-Keimlingen und Versuchen an Protoplasten aus diesem Gewebe, ist bekannt, dass *AtABP1* dort aktiv ist und in die Zellstreckung involviert sein könnte (Christian und Lüthen, 2000; Christian *et al.*, 2003).

Eine Recherche der Expression von *AtABP1* basierend auf Microarray-Studien (Genevestigator, <http://www.genevestigator.ethz.ch/at/>) sagen eine schwache Aktivität in allen Geweben und im gesamten Entwicklungsverlauf von *Arabidopsis thaliana* vorher. Nur in Zellkulturen und Blütenstielen wurde eine erhöhte Expression von *AtABP1* gemessen. Um auch zellspezifisch untersuchen zu können, wo *AtABP1* aktiv ist, wurden in dieser Arbeit Promotor-GUS-Analysen durchgeführt. Unter Langtag angezogene P_{*AtABP1*}:GUS-Transformanten zeigten in bis zu 6 Tage alten Keimlingen GUS-Aktivität vor allem in sehr jungen sich entwickelnden Blättern bis zu einer Länge von 200 µm und in Kotyledonen außer im Bereich der Hydathoden. Etiolierte Keimlinge besaßen ein vergleichbares Expressionsmuster. Nur im Leitgewebe des apikalen Hakens war bei drei Tage alten etiolierten Keimlingen eine zusätzliche Aktivität zu beobachten. Es wurde keine Expression im Hypokotyl, dem Bereich der für Protoplastenversuche verwendet wird, beobachtet. Woraus sich die Frage ergibt, ob der ausgewählte Promotorbereich von 1582 bp stromaufwärts des Startkodons, nicht alleine für die Aktivität des Gens verantwortlich ist. Ebenso muss bedacht werden, dass ABP1 vielleicht nicht im Hypokotyl aktiv ist. Dies stünde jedoch mit den Versuchen aus Hypokotylprotoplasten im Widerspruch (Christian und Lüthen, 2000; Christian *et al.*, 2003).

Um zu sehen, inwieweit die Aktivität des *AtABP1*-Promotors mit der Lokalisation von aktivem Auxin übereinstimmt, wurden zusätzliche Expressionsanalysen mit der DR5-Mutante durchgeführt und mit dem gemessenen Gehalt an freier IAA abhängig vom Entwicklungsstadium von *Arabidopsis* verglichen (Ljung *et al.*, 2001). DR5 ist ein Marker für

schnelle auxininduzierte Genexpression (Ulmasov *et al.*, 1997) und wird allgemein als Marker für aktives Auxin verwendet (Sabatini *et al.*, 1999; Aloni *et al.*, 2001; Friml *et al.*, 2002; Marchant *et al.*, 2002). In Kotyledonen von drei Tage alten Keimlingen war DR5-Aktivität in den Blattspitzen, den Bereich der Hydathoden zu beobachten. P_{AtABP1} :GUS Aktivität war dagegen im gesamten Bereich der Kotyledonen außer den Hydathoden zu beobachten. Auch in sehr jungen sich entwickelnden Blättern unterschieden sich die Expressionsmuster von *AtABP1* und DR5. In drei Tage alten Keimlingen war in den ersten sich entwickelnden Blättern P_{AtABP1} :GUS Aktivität zu beobachten. In sechs Tage alten Keimlingen beschränkte sich die Aktivität auf einen Bereich um die sich entwickelnden Leitbündel von der Spitze bis zur Basis des jungen Blattes. DR5-Aktivität in den sich entwickelnden Blättern war erst bei vier Tage alten Keimlingen zu beobachten. Erst war eine Aktivität nur in der Blattspitze, später, in fünf Tage alten Keimlingen, war sie auch im sich entwickelnden Leitbündel zu beobachten. Ljung *et al.* (2001) bestimmten die Konzentration an freier IAA gaschromatographisch mit einem nachgeschalteten Massenspektrometer während der Entwicklung von Arabidopsispflanzen und analysierten den IAA-Gehalt in Abhängigkeit von der Blattentwicklung. Die IAA-Verteilung und -Konzentration in Blättern ist von ihrem Entwicklungsstadium abhängig und lässt sich in zwei Abschnitte teilen. Im ersten Abschnitt, in dem das junge Blatt durch Zellteilung wächst, wurde eine hohe Konzentration an freier IAA gemessen. Eine erhöhte *de novo* Synthese von IAA findet statt. Ab einer Blattlänge von 200 μm beginnt der zweite Entwicklungsabschnitt. Die Synthese von IAA und die Zellteilung nehmen rapide ab. Das Wachstum des Blattes erfolgt nun durch Zellstreckung und die Ausdifferenzierung des Leitgewebes findet statt (Ljung *et al.*, 2001). Die Expression von P_{AtABP1} :GUS in sich entwickelnden Blättern wurde während der Phase der erhöhten Zellteilung und IAA-Synthese beobachtet. Mit Beginn der Zellstreckung, nahm die Aktivität des *AtABP1*-Promotors ab. Hier war die Expression von *AtABP1* mit dem Ort der *de novo* Synthese von IAA vergleichbar. Es konnte dagegen kein Zusammenhang zwischen Zellstreckung und P_{AtABP1} :GUS Expression festgestellt werden. Mit einsetzender Zellstreckung wurde keine *AtABP1*-Promotoraktivität mehr beobachtet. Somit ist wiederum zu überlegen, ob ABP1 überhaupt mit Zellstreckung in Verbindung steht.

Im sich streckenden Hypokotyl findet keine IAA-Synthese statt. IAA wird von den Blättern in die Wurzel transportiert. Durch gerichteten Transport liegt im Hypokotyl trotzdem freie, aktive IAA vor (Ljung *et al.*, 2001). Die Aktivität des DR5-Promotors wird oft mit Auxinaktivität gleich gesetzt (Sabatini *et al.*, 1999; Aloni *et al.*, 2001; Friml *et al.*, 2002; Marchant *et al.*, 2002). Dies scheint jedoch nicht immer der Fall zu sein, wie die Beobachtungen im Hypokotyl und in sehr jungen Blättern zeigten. Wenn P_{DR5} :GUS Pflanzen verwendet werden, sollte die Definition von Ulmasov *et al.* (1997) herangezogen werden. Nach ihr ist die Aktivität des synthetischen Promotors mit der, der frühen auxininduzierten

Gene zu vergleichen. Eventuell ist die Aktivierung der frühen auxininduzierten Gene nicht nur von IAA abhängig, sodass P_{DR5} :GUS Aktivität nicht mit der IAA-Konzentration gleich gesetzt werden kann.

Die Expression von P_{AtABP1} :GUS fiel in spezifischen Entwicklungsstadien mit der Synthese von IAA zusammen. In dieser Arbeit wurde untersucht, ob die Expression von P_{AtABP1} :GUS auch durch externe Applikation des synthetischen Auxins 1-NAA induziert werden kann. In drei Tage alten Keimlingen, die auf 1-NAA-haltigem Medium wuchsen, war eine zusätzliche P_{AtABP1} :GUS Expression in einzelnen Zellen im Hypokotyl und der Wurzel zu beobachten, die ohne Auxinbehandlung keine Färbung zeigten. In vier Tage alten Keimlingen war die P_{AtABP1} :GUS Aktivität im Zentralzylinder in der Übergangszone zwischen Hypokotyl und Primärwurzel zu beobachten. In der späteren Keimlingsentwicklung konnte keine zusätzliche P_{AtABP1} :GUS-Aktivität im Vergleich zur Kontrolle beobachtet werden. Der Promotor von *AtABP1* kann durch externes Auxin aktiviert werden. Er scheint auxininduzierbare Promotorelemente zu besitzen, bei denen es sich jedoch nicht um Auxin-responsive Elementen (AuxRE) handelt. Bei der Analyse des ausgewählten Promotorbereiches wurden keine AuxREs gefunden. Vereinzelt Arabidopsiskeimlinge zeigten unter 1-NAA-Behandlung eine starke Krümmung im Hypokotyl. Bei diesen Keimlingen war P_{AtABP1} :GUS nur auf der eingekrümmten Seite aktiv. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass hier eine Expression nur in Zellen zu beobachten ist, die in ihrer Streckung gehemmt sind, oder sich später strecken werden.

Auch durch eine Umverteilung von internem Auxin konnte P_{AtABP1} :GUS Expression schwach verändert werden. Durch Behandlung mit 1-N-Naphthylphthalat (NPA) wird der aktive Transport von IAA gehemmt (Ljung *et al.*, 2001). Internes IAA sammelt sich im apikalen Bereich des Hypokotyls an. In diesem Bereich war bei drei Tage alten Keimlingen P_{AtABP1} :GUS Expression in vereinzelt Zellen zu beobachten. Wurde der IAA-Gehalt in Zellen, die in ihrer Streckung gehemmt sind, erhöht, wurde P_{AtABP1} :GUS aktiviert. Warum dies nur in einzelnen Zellen zu beobachten war, ist noch zu klären. Das Signal zur Zellteilung oder Differenzierung kann von einer einzelnen Zelle ausgehen. Dies ist zum Beispiel bei der Entwicklung von Blattprimorden der Fall (Golz, 2006; Veit, 2006; Sablowski, 2007). Auch die einzelnen Zellen, die eine P_{AtABP1} :GUS Expression aufwiesen, könnten Signalgeber für die umliegenden Zellen sein.

In Olive (*Eucommia ulmoides*), Erdbeere (*Fragaria x ananassa*) und Tabak (*Nicotiana tabacum*) wurden die Expressionen von ABP1 und die Lokalisationen der ABP1-Proteine untersucht (Chen *et al.*, 2001a; Hou und Huang, 2005; Hou *et al.*, 2006). In Olive konnte eine Expression von *EuABP1* in aktiven Kambien über quantitative *real-time*-PCR nachgewiesen werden. In ruhenden Kambien wurde keine Expression beobachtet. Die Expression von *EuABP1* konnte durch IAA-Behandlung induziert werden. Über *in situ* Hybridisierung und

Immunofluoreszenz konnte die Expression von *EuABP1* und die Lokalisation des Proteins selbst nachgewiesen werden. Es wurde gezeigt, dass im aktiven Kambium die Expression von *EuABP1* mit dem Protein kolokalisiert ist (Hou *et al.*, 2006). In den in dieser Arbeit durchgeführten Promotor:GUS-Analysen konnte dagegen kein Bezug von Expression und Aktivität von *AtABP1* hergestellt werden. Im Hypokotyl ist *AtABP1* aktiv (Christian und Lüthen, 2000; Steffens *et al.*, 2001), eine Expression konnte jedoch nicht gezeigt werden. In *Fragaria x ananassa* wurden *FaABP1* und IAA über Antikörper immunohistologisch nachgewiesen (Hou und Huang, 2005). Es wurde gezeigt, dass sowohl *FaABP1* als auch IAA in Spross- und Blütenmeristemen lokalisiert sind. IAA und *FaABP1* sind kolokalisiert. Inwieweit der IAA-Antikörper nur freie IAA oder auch IAA-Konjugate, also inaktive IAA erkennt, ist nicht bekannt. Es wurde gezeigt, dass *FaABP1* in teilungsaktivem Gewebe vorhanden ist (Hou und Huang, 2005). In Spross- und Blütenmeristemen von 6 Wochen alten *Arabidopsis*-Pflanzen konnte über Promotor:GUS-Analysen keine P_{AtABP1} :GUS Aktivität nachgewiesen werden. Jedoch wurde, wie in *Fragaria x ananassa*, in jungen teilungsaktiven Blättern mit einem hohen IAA-Gehalt P_{AtABP1} :GUS-Aktivität nachgewiesen. In Tabakblättern wurde dagegen über Western-Blot-Analysen gezeigt, dass in vollentwickelten Blättern mehr *NtABP1* enthalten ist als in jungen noch teilungsaktiven Blättern (Chen *et al.*, 2001a). Diese Beobachtungen entsprechen nicht denen aus *Fragaria x ananassa* (Hou und Huang, 2005) und den in dieser Arbeit an *Arabidopsis thaliana* erzielten.

In dieser Arbeit konnte eine Expression von P_{AtABP1} :GUS gezeigt werden, die sich jedoch von den Beobachtungen in Erdbeere, Olive und Tabak unterscheidet, wobei bei Erdbeere und Tabak ausschließlich *ABP1*-Proteine nachgewiesen wurden. Auch in Samen von sich entwickelnden Schoten, beziehungsweise in Embryonen konnte keine *AtABP1*-Aktivität nachgewiesen werden. Und dies, obwohl *AtABP1* essentiell während der Embryogenese ist. *Atabp1-Knockout*-Mutanten sterben im globulären Embryostadium ab (Chen *et al.*, 2001b). Eventuell ist *ABP1* nur in dieser einen Entwicklungsphase von Embryonen wichtig. Um dies genauer zu untersuchen, sollten die verschiedenen Embryostadien auf P_{AtABP1} :GUS-Aktivität analysiert werden.

Es besteht die Möglichkeit, dass der ausgewählte Promotorbereich nicht die gesamte Aktivität von *AtABP1* reguliert. Es gibt Gene, bei denen sich regulierende Elemente für die entwicklungs- und gewebespezifische Expression in Introns oder Exons befinden (Itho *et al.*, 1999; Chan *et al.*, 2001; Chang und Sun 2002). Für *GA1*, ein Gen der Gibberellinsynthese, wurde in *Arabidopsis* gezeigt, dass sich ein regulatorisches Element im zweiten Intron befindet (Chang und Sun 2002). In Tabak war auch das zweite Exon wichtig für die gewebespezifische Expression von *GA1* (Itho *et al.*, 1999). Die Expression von *AtABP1* könnte ebenfalls von weiteren regulatorischen Elementen beeinflusst werden. Über weitere GUS-Transformanten, die zusätzlich zum verwendeten Promotorbereich auch Exons und

Introns oder das gesamte Gen von *AtABP1* besitzen, könnte diese Hypothese getestet werden. Sollten diese eine ubiquitäre *AtABP1*-Expression zeigen, wäre dies ein deutlicher Hinweis auf weitere regulatorische Elemente von *AtABP1* außerhalb des ausgewählten Promotorbereiches. Um die Expression von *AtABP1* ergänzend zu untersuchen, könnten außerdem Northern-Blot-Analysen durchgeführt werden und mit den Ergebnissen der P:GUS-Analysen.

4.5. ABP1 und Interaktionspartner

ABP1 ist an der Vermittlung schneller Auxinantworten beteiligt, die in Streckungswachstum resultieren. Wie das von Auxin ausgehende und über ABP1 vermittelte Signal weitergeleitet wird, ist noch nicht bekannt. Um dieser Frage nachzugehen, sollten Interaktionspartner von ABP1 identifiziert werden. Über interagierende Proteine sollte es möglich sein, die Funktion von ABP1 besser zu verstehen.

Über den C-Terminus von ABP1, der wahrscheinlich als Interaktionsdomäne für interagierende Proteine fungiert (Klämbt, 1990; MacDonald, 1997) und der alleine an Protoplasten mit Auxin vergleichbare Reaktionen auslöst (Thiel *et al.*, 1993; Leblanc *et al.*, 1999b; 2001; Steffens *et al.*, 2001), wurde bereits ein Protein identifiziert (Shimomura, 2006). In *Zea mays* wurde über Photoaffinitätsvernetzung mit dem C-Terminus von ZmABP1 ein Glykosylphosphatidylinositol-verankerte plasmamembranständige Protein als mögliches interagierendes Protein identifiziert (Shimomura, 2006). Ein weiteres Protein wurde aufgereinigt, konnte jedoch nicht eindeutig einer bekannten Peptidsequenz zugeordnet werden (Shimomura, 2006). Das Glykosylphosphatidylinositol-verankerte plasmamembranständige Protein aus *Zea mays* ist homolog zu einem Glykosylphosphatidylinositol-verankerten plasmamembranständigen Protein aus *Arabidopsis*, SKU5 (*Skewed5*). SKU5 scheint beim gerichteten Wurzelwachstum eine Rolle zu spielen (Sedbrook *et al.*, 2002). Um die postulierte Interaktion mit ABP1 zu bestätigen, fehlen jedoch Bindestudien der Proteine mit ABP1.

Es ist leichter, Proteine aus *Arabidopsis* oder Reis zu identifizieren, da die Genome vollständig entschlüsselt und bereits viele Proteine annotiert sind. Für Mais trifft dies noch nicht zu. Aus diesem Grund wurden in dieser Arbeit die Versuche zur Identifizierung von ABP1-Interaktionspartnern mit Reis und *Arabidopsis* vorgenommen, auch wenn die meisten Ergebnisse zu ABP1 von Versuchen an Mais oder Tabak stammen. In vielen Pflanzen, wie auch *Arabidopsis*, wurden Homologe von *ZmABP1* nachgewiesen (Napier *et al.*, 2002). Über einen Homologievergleich wurde in *Oryza sativa ssp indica* ein zu 79% mit ZmABP1 identisches hypothetisches Protein OsI_037307 (EAY83348) als OsABP1 identifiziert. Die

Boxen a, b und c und der C-Terminus sind in den putativen ABP1-Proteinen hoch konserviert.

Über die Affinität an den C-Terminus von ZmABP1 wurden Proteine aus Reis aufgereinigt. Fünf Proteine wurden massenspektrometrisch identifiziert: das peroxisomale Fettsäure β -Oxidationsprotein, eine putative Format-Tetrahydrofolat Ligase, eine putative ATP-Citratlyase a Untereinheit, ein putatives Auxin- und Ethylen-reguliertes Protein AER (*auxin and ethylene regulated*) und eine putative 12-Oxophytodienoat Reduktase. Die geringste Bindungsaffinität besaßen die putative Format-Tetrahydrofolat Ligase, die putative ATP-Citratlyase a Untereinheit und die putative 12-Oxophytodienoat Reduktase. Über die Funktion der Proteine und deren Lokalisation in der Zelle, wird eine mögliche Interaktion mit ABP1 diskutiert. ABP1 ist zu 98% im ER und zu 2% an der Plasmamembran lokalisiert (Henderson *et al.*, 1997).

Mehrere Untereinheiten der ATP-Citratlyase a Untereinheit und der ATP-Citratlyase b Untereinheit bilden ein Heterooktamer, welches in Arabidopsis als ATP-Citratlyase fungiert. Die ATP-Citratlyase ist ein Enzym des Primärstoffwechsels und scheint den cytoplasmatischen „Pool“ von Acetyl-CoA aus Citrat zu synthetisieren (Fatland *et al.*, 2002, 2005). Das Protein ist im Cytoplasma lokalisiert. Ein Bezug zu Auxin, zum Beispiel über die Regulation des Proteins oder dessen Expression durch Auxinbehandlung ist nicht bekannt. Auch gibt es keinen Zusammenhang zu Auxineffekten wie Streckungswachstum. Auf Grund der bekannten Daten ist eine Interaktion der ATP-Citratlyase a Untereinheit mit ABP1 eher unwahrscheinlich.

Auch die Format-Tetrahydrofolat Ligase aus Arabidopsis, die als Koenzym an einer Kohlenstoffübertragung zum Beispiel bei der Purinbiosynthese oder im Aminosäuremetabolismus beteiligt ist (Prabhu *et al.*, 1996; Moore und King, 2003), erscheint nicht als wahrscheinliches Bindeprotein für ABP1. In verschiedenen Lokalisationsvorhersagen wird mit einer Wahrscheinlichkeit von 94% oder 98% das Cytoplasma angegeben. Mit einer Wahrscheinlichkeit von 70% könnte es auch an der Plasmamembran lokalisiert sein, wo eventuell ABP1 aktiv ist.

Die putative 12-Oxophytodienoat Reduktase bindet ebenfalls nur schwach an das C-terminale Peptid von ZmABP1. Nach Lokalisationsvorhersagen ist es mit bis zu 84%iger Wahrscheinlichkeit im ER oder mit bis zu 74%iger Wahrscheinlichkeit in Peroxisomen aktiv. Es gibt zwei Untergruppen der 12-Oxophytodienoat Reduktasen. Eine spielt eine Rolle bei der Pathogenabwehr. Die zweite ist in die Biosynthese von Jasmonsäure in Peroxisomen involviert (Schaller und Weiler, 1997; Sobajima *et al.*, 2002; Strassner *et al.*, 2002). Auf Grund der Lokalisationsvorhersagen wäre eine Interaktion mit ABP1 möglich.

Das peroxisomale Fettsäure β -Oxidationsprotein besitzt eine stärkere Bindung zum C-Terminus von ZmABP1 als die drei vorherigen Proteine. Es ist ein multifunktionales

Protein, das an der β -Oxidation von Fettsäuren beteiligt ist (Preisig-Müller *et al.*, 1994; Mullen, 2002). In Reis wurde es über seine Bindung an mRNAs identifiziert, ebenso wird eine Bindung an Mikrotubuli vorhergesagt (Chuong *et al.*, 2002, 2005). Es besitzt C-terminal eine Signalsequenz für die Peroxisomenmembran (Subramani *et al.*, 2000). Die mRNA-Bindung scheint im Cytoplasma stattzufinden. Es wurde vorausgesagt, dass das Protein am Transport von mRNAs peroxisomaler Proteine beteiligt sein könnte (Chuong *et al.*, 2002). Das peroxisomale Fettsäure β -Oxidationsprotein wurde auf Grund seiner Bindungsfähigkeit für mRNA und Mikrotubuli mit dem tierischen Protein Staufen aus *Drosophila* verglichen, welches ebenfalls besagte Eigenschaften besitzt (Chuong *et al.*, 2002). Staufen ist am rauen ER lokalisiert und es scheint, dass es mRNA zum Ort der Translation transportiert (Wickham *et al.*, 1999). Es gibt Hinweise, dass an der Bindung von Staufen an das raue ER weitere Proteine beteiligt sind (Cosentino *et al.*, 1995; Benkirane *et al.*, 1997). Sollte das peroxisomale Fettsäure β -Oxidationsprotein auch in dieser Eigenschaft Staufen ähneln, wäre auch eine Bindung mit ABP1 im oder am ER denkbar, wo es die Lokalisation oder den Transport unterstützen könnte.

Das fünfte Protein mit der stärksten Bindung an den C-Terminus von ZmABP1 ist homolog dem Auxin- und Ethylen-regulierten Protein (AER) aus Tabak (Baully *et al.*, 2002). Ein Anstieg dessen mRNA ist nach Auxin- und Ethylenbehandlung zu beobachten. AER wird dadurch als Marker für einen Auxin- und Ethylen-verknüpften Signalweg gesehen (Baully *et al.*, 2002). Das Protein selbst wurde noch nicht beschrieben. Über die Proteinsequenz wurden eine Transferaseaktivität und eine Lokalisation im Cytoplasma vorhergesagt. Über eine Interaktion von AER und ABP1 lässt sich keine Vorhersage machen, da zu wenig über das Protein bekannt ist. Auf Grund seiner starken Bindung zu dem C-terminalen Peptid scheint eine Interaktion möglich.

Die identifizierten Proteine haben keine offensichtliche signalübertragende Funktion, könnten jedoch auch eine andere Rolle in Bezug auf ABP1 spielen und nicht an einer Signalweiterleitung beteiligt sein. Um eine Aussage über mögliche Interaktionen machen zu können, sollten Bindungsstudien von ABP1 mit dem jeweiligen Protein durchgeführt werden. Proteine können vielfältige Eigenschaften besitzen, die noch nicht bekannt sind. So ist eine Magnesiumprotoporphyrin-IX-Chelatase Untereinheit H an der Chlorophyllbioynthese (Walker und Willows, 1997) und an der Signaltransduktion zwischen Plastiden und Kern beteiligt (Mochizuki *et al.*, 2001; Strand *et al.*, 2003; Nott *et al.*, 2006). Ebenso wurde sie als ABA-Rezeptor identifiziert (Shen *et al.*, 2006).

Die Suche nach Bindungspartnern von ABP1 könnte über diesen Ansatz weiterverfolgt werden. Über das C-terminale Peptid könnten aus spezifischen Fraktionen, wie zum Beispiel einer endosomalen Fraktion, Proteine aufgereinigt werden.

In einem zweiten Ansatz wurde das gesamte ABP1-Protein verwendet. Mit markiertem AtABP1 wurde versucht, über Affinitätschromatographie interagierende Proteine aufzureinigen. C-terminal besitzt ABP1 die schon erwähnte Interaktionsdomäne. Um diese nicht durch einen C-terminalen *tag* zu stören, wurde ein Fusionsprotein mit N-terminalem *tag* verwendet. Als *tag* wurde der Strep-tag II verwendet. ABP1 ist ein glykosyliertes Protein mit einer Signalsequenz, und es besitzt ein Zinkion in der Auxinbindetasche, welches wichtig für seine Funktion zu sein scheint (Woo *et al.*, 2000, 2002). Modifikationen, wie die Glykosylierung und den Einbau des Zinkions, können nicht von Bakterien vorgenommen werden. Da diese Modifikationen wahrscheinlich ebenfalls wichtig für die Funktion von ABP1 sind, wurde *Strep-ABP1* in Arabidopsiszellen überexprimiert. Da ABP1 eine N-terminale Signalsequenz besitzt, wurde eine N-terminale Signalsequenz so zugefügt, dass der *tag* sich zwischen der Signalsequenz und der ABP1 Proteinsequenz befand.

In dieser Arbeit wurden Arabidopsis-Zellkulturen mit *Strep-ABP1* transformiert und fünf stabile *Strep-ABP1*-Überexpressionslinien hergestellt. Die Zelllinien wuchsen im Vergleich zum Wildtyp in größeren Zellaggregaten. Auch waren die einzelnen Zellen und Zellkerne der *Strep-ABP1*-Linien größer. Die Zellkerne wiesen die vierfache Größe im Vergleich zu Wildtyp-Zellkernen auf. Zusätzlich war der Nukleolus in den *Strep-ABP1*-Linien deutlich größer, was auf eine höhere Transkriptionsaktivität hinweist. Auch Tabak BY2-Zellen, die *ZmABP1* überexprimierten, wiesen stark vergrößerte Zellkerne auf (Chen *et al.*, 2006). Die Tabakzellen waren nicht diploid wie Kontrollzellen, die mit dem leeren Überexpressionsvektor transformiert waren, sondern zu 90% oktaploid. Auch hatte sich die Größe der *ZmABP1* überexprimierenden Zellen verdoppelt. Überexprimiertes Protein wurde allerdings nicht nachgewiesen (Chen *et al.*, 2006). Ein Zusammenhang zwischen Zellgröße und Grad der Ploidie wird diskutiert (Melaragno *et al.*, 1993; Gilissen *et al.*, 1996; Gendreau *et al.*, 1998; Traas *et al.*, 1998). Die in der Arbeit hergestellten *Strep-ABP1*-Überexpressionslinien wiesen mit vergrößerten Zellen und Zellkernen einen ähnlichen Phänotyp auf wie die *ZmABP1* überexprimierenden Tabakzellen (Chen *et al.*, 2006). Der Ploidiegrad der *Strep-ABP1*-Linien und der Kontrolle waren jedoch gleich. Es wurden auch keine Veränderung im Zellzyklus beobachtet, wie es in *AtABP1* überexprimierenden Tabakzellen aus Blättern der Fall war. Bei ihnen wurde eine ausgeprägtere G2-Phase beobachtet (Chen *et al.*, 2001a). Um sicher zu sein, dass die beobachteten größeren Zellen und Zellkerne nicht von der Transformation selbst ausgelöst wurden, wäre ein Vergleich mit Zellen, die mit dem leeren Vektor transformiert werden, sinnvoll. Dass die *Strep-ABP1*-Linien einen Phänotyp wie die *ZmABP1* überexprimierenden BY2-Zellen zeigen, deutet auf einen Effekt von AtABP1 hin. Der beobachtete vergrößerte Nukleolus deutet auf eine höhere Transkriptionsaktivität hin. Hypokotylzellen von Sojabohnen, die mit Auxin behandelt wurden, zeigten ebenfalls einen vergrößerten Nukleolus und besaßen erhöhte RNA-Konzentrationen

und erhöhte RNA-Polymerase I Aktivität. Es wurde jedoch kein vergrößerter Zellkern beobachtet (Chen *et al.*, 1975). Bis jetzt ist nicht bekannt, ob ABP1 die Transkription beeinflusst. Der Einfluss von Auxin auf die Transkription wurde bislang eher mit den F-Box Auxinrezeptoren in Verbindung gebracht. Der vergrößerte Zellkern, sowie Nukleolus sind allerdings über bislang bekannte Wirkungen von ABP1 nicht zu erklären.

Um Strep-ABP1 nachzuweisen, wurden Western-Blot-Analysen mit Anti-AtABP1 Antikörper und HRP-Strep-Tactin durchgeführt. Ein spezifischer Nachweis war nicht möglich, da viele Proteinbanden unterschiedlicher Größe erkannt wurden. Es wurden jedoch Unterschiede im Bandenmuster von Proteinfractionen aus Wildtyp- und Strep-ABP1-Linien beobachtet. Über zwei verschiedene Affinitätssäulen konnte kein Strep-ABP1 aufgereinigt werden. Das Protein schien demzufolge nicht nachweisbar überexprimiert zu werden. Schwache Proteinbanden in einer Strep-ABP1 entsprechenden Größe um 21 kDa, die von HRP-Strep-Tactin und vom Anti-AtABP1 Antikörper erkannt wurden, lassen vermuten, dass es sich dabei um Strep-ABP1 handeln könnte. Es könnte sich bei der Proteinbande jedoch auch um ein unspezifisch bindendes Protein handeln, da eine Bande entsprechender Größe teilweise auch im Wildtyp nachgewiesen wurde. So scheint es unwahrscheinlich, dass Strep-ABP1 in größeren Mengen synthetisiert wurde. Da die mRNA von *Strep-ABP1* über *reverse-transkription*-PCR nachgewiesen wurde, das Protein jedoch nicht nachweisbar war, ist zu vermuten, dass das Protein nicht oder nur wenig gebildet oder schnell wieder abgebaut wurde.

Es gab mehrere Probleme bei der Aufreinigung des markierten Proteins. Die Bindung des Strep-tag II mit dem Säulenmaterial Strep-Tactin basiert auf der Bindung von Biotin mit Streptavidin (Schmidt und Skerra, 1993; Schmidt *et al.*, 1996; Voss und Skerra, 1997; Korndörfer und Skerra, 2001). Auch Biotin und biotinylierte Proteine binden an Strep-Tactin (Terpe, 2003). In Pflanzen gibt es freies Biotin. In Blättern von Erbsen wurden 11 μM freies Biotin nachgewiesen (Tissot *et al.*, 1997). Auch wurden bis jetzt drei biotinylierte Enzyme in Pflanzen identifiziert (Nikolau *et al.*, 2003). In den Versuchen konkurrieren somit Strep-tag II, Biotin und biotinylierte Proteine um die Bindestelle des Säulenmaterials Strep-Tactin. Um die störenden Interaktionen von Biotin und biotinylierten Proteinen zu unterbinden, werden diese an Avidin gebunden und sollten so nicht mehr mit dem Säulenmaterial interagieren können. Der Strep-tag II besitzt keine Bindungsaffinität für Avidin und sollte für die Bindung mit Strep-Tactin frei vorliegen (Skerra und Schmidt, 2000; Witte *et al.*, 2004). In den Eluatzen wurden trotz Avidinbehandlung biotinylierte Proteine nachgewiesen. Es kann somit nicht ausgeschlossen werden, dass biotinylierte Proteine weiterhin mit Strep-ABP1 um die Bindestellen des Säulenmaterials konkurrierten. Dies würde bedeuten, dass nicht das gesamte Strep-ABP1 an Strep-Tactin binden konnte. Aus diesem Grund wäre es möglich, dass Strep-ABP1 nicht aufgereinigt und nicht nachgewiesen werden konnte. Es ist jedoch

verwunderlich, dass überhaupt biotinylierte Proteine eluiert wurden, da die Bindung von Biotin mit Strep-Tactin irreversibel sein sollte (Hamblett *et al.*, 2002). So bleibt die Frage offen, wie diese biotinylierten Proteine eluiert werden konnten.

Trotz der Probleme, die es in dieser Arbeit mit dem Strep-tag II und Strep-Tactin gab, ist eine Überexpression und Aufreinigung über den Strep-tag II in Pflanzen möglich. Es wurde für NtCDK2, einer Proteinkinase mit Membrananker aus Tabak (Romeis *et al.*, 2001) und für AtSGT1b, einem löslichen Protein aus Arabidopsis gezeigt (Austin *et al.*, 2002; Witte *et al.*, 2004). Möglich ist, dass das Strep-ABP1-Konstrukt, das aus der Chitinasesignalsequenz, dem Strep-tag II und dem *AtABP1*-Gen ohne seine Signalsequenz besteht, nicht korrekt gespalten oder gefaltet und deswegen abgebaut wurde. In einem neuen Ansatz zur Überexpression und Aufreinigung von markiertem AtABP1 ist zu überlegen, ob der *tag* nicht N-terminal sondern im Protein an einer für eine Interaktion unwahrscheinlichen und exponierten Stelle angebracht werden sollte. Der C-Terminus, als wahrscheinliche Interaktionsdomäne und der N-Terminus liegen in der Sekundärstruktur relativ nahe beieinander und so könnte ein N-terminaler *tag* eine Interaktion eventuell stören. Um ABP1 als Komplex mit seinen interagierenden Proteinen aufzureinigen, sollte ein *tag* verwendet werden, dessen Bindedomäne nicht in Pflanzen vorkommt, wie zum Beispiel der *c-myc-tag*. Dieser basiert auf einem Antikörperepitop und wurde schon in Agrobakterium-transformierten Arabidopsiszellen verwendet (Ferrando *et al.*, 2001). So kann es bei der Aufreinigung nicht zu Konkurrenzreaktionen kommen. Auch wäre eine Expression von ABP1 gekoppelt an ein Fluoreszenzprotein wie GFP oder YFP (*green-*, *yellow fluorescent protein*) sinnvoll. FP-gekoppelte Proteine und Proteinkomplexe können über FP-Antikörpersäulen aufgereinigt werden. Zusätzlich kann die Synthese des Proteins neben Western-Blot-Analysen auch über das Fluoreszenzsignal überprüft werden. Damit wären zusätzlich ABP1-Lokalisationsstudien möglich.

4.6. ABP1 und seine Funktion als möglicher Auxinrezeptor

Ob ABP1 ein Auxinrezeptor ist und wo die über ihn vermittelte Antwort erfolgt, bleibt weiterhin offen. ABP1 ist zu 98% hauptsächlich im ER lokalisiert (Abbildung 32; Henderson *et al.*, 1997). Die PIN-Proteine 5 und 8 transportieren Auxin vom Cytoplasma in das ER (Jiří Friml, Universität Gent, Belgien, unveröffentlicht). IAA-Konjugathydrolasen, die IAA von Aminosäuren spalten und somit die Konzentration an freier IAA erhöhen, besitzen N-terminal das KDEL-Motif und sind ebenfalls im ER lokalisiert (Bartel und Fink, 1997; Davies *et al.*, 1999). Im ER sollte somit viel freie IAA vorliegen und die Möglichkeit einer IAA-Bindung bestehen. Allerdings ist der pH-Wert im ER mit 7,1 (Kim *et al.*, 1998) nicht optimal für eine Bindung an ABP1, welches Auxin am besten bei einem pH-Wert um 5,5 (Löbler und Klämbt,

1985) bindet. Bei einem hohen Angebot an IAA ist eine hohe Bindungsaffinität eventuell unnötig. Eine Signalperzeption ist im ER also möglich (Abbildung 32).

Auxinreaktionen scheinen über Auxingradienten vermittelt zu werden. Der PIN-vermittelte Auxintransport und die dadurch vermittelte Umverteilung von Auxin sind entscheidend für die Embryoentwicklung und die Entwicklung von Meristemen (Friml *et al.*, 2003; Heisler *et al.*, 2005; Boutté *et al.*, 2007). Könnte auch die Wirkung von ABP1 vom Auxingradient abhängig sein und ist es im ER möglich über den PIN-vermittelten Import von IAA und die Inaktivierung von freier aktiver IAA durch Konjugation einen Gradienten entsprechend dem an der Plasmamembran zu schaffen? Über ABP1 wird eine Hyperpolarisation der Plasmamembran und die Aktivierung von plasmamembranständigen H⁺-ATPasen und plasmamembranständigen einwärtsgerichteten Kaliumkanälen induziert (Rück *et al.*, 1993; Phillippar *et al.*, 1999). Das von ABP1 im ER perzipierte Signal müsste hierzu zur Plasmamembran gelangen. ABP1 könnte auch bei der Regulation des Zyklirens der H⁺-ATPasen und/oder Kaliumkanälen involviert sein und somit deren Aktivität regulieren (Abbildung 32).

Was spricht für eine ABP1-Aktivität an der Plasmamembran? Der pH-Wert im Apoplasten entspricht dem Optimum der Bindungsaffinität von IAA an ABP1. ABP1 wurde, wenn auch in sehr geringen Mengen, an der Plasmamembran nachgewiesen (Jones und Herman, 1993; Diekmann *et al.*, 1995; Henderson *et al.*, 1997). Die über ABP1 aktivierten H⁺-ATPasen und Kaliumkanäle sind plasmamembranständig. Ebenso ist die auxininduzierte Hyperpolarisation der Plasmamembran ABP1-abhängig (Abbildung 32). Das über ABP1 vermittelte Auxinsignal ist sehr schnell. Reaktionen, wie die Hyperpolarisation der Plasmamembran (Barbier-Brygoo *et al.*, 1989), die Aktivierung der Kaliumkanäle (Thiel *et al.*, 1993) und die Volumenzunahme von Protoplasten sind innerhalb einer Minute zu beobachten. Dies lässt vermuten, dass über ABP1 nicht erst Proteine neu synthetisiert werden, wie es der Fall bei der bekannten F-Box Auxinrezeptor-Familie ist. Diese Auxinrezeptoren vermitteln das Auxinsignal über Proteinabbau und der Transkription von auxinregulierten Genen (Dharmasiri *et al.*, 2005a; Kepinski and Leyser, 2005). Früheste Reaktionen in Form von Transkription von auxininduzierten Genen, wie den SAURs, sind fünf Minuten nach Auxinbehandlung beobachtet worden (Badescu und Napier, 2006). Um die Frage des Wirkortes oder vielleicht auch der Wirkorte von ABP1 zu klären, sind Mutanten mit fluoreszenzmarkiertem ABP1 oder Antikörper, die mit ABP1 interagieren, sowie fluoreszenzmarkiertes C-terminales Peptid als Signalauslöser von ABP1 hilfreich.

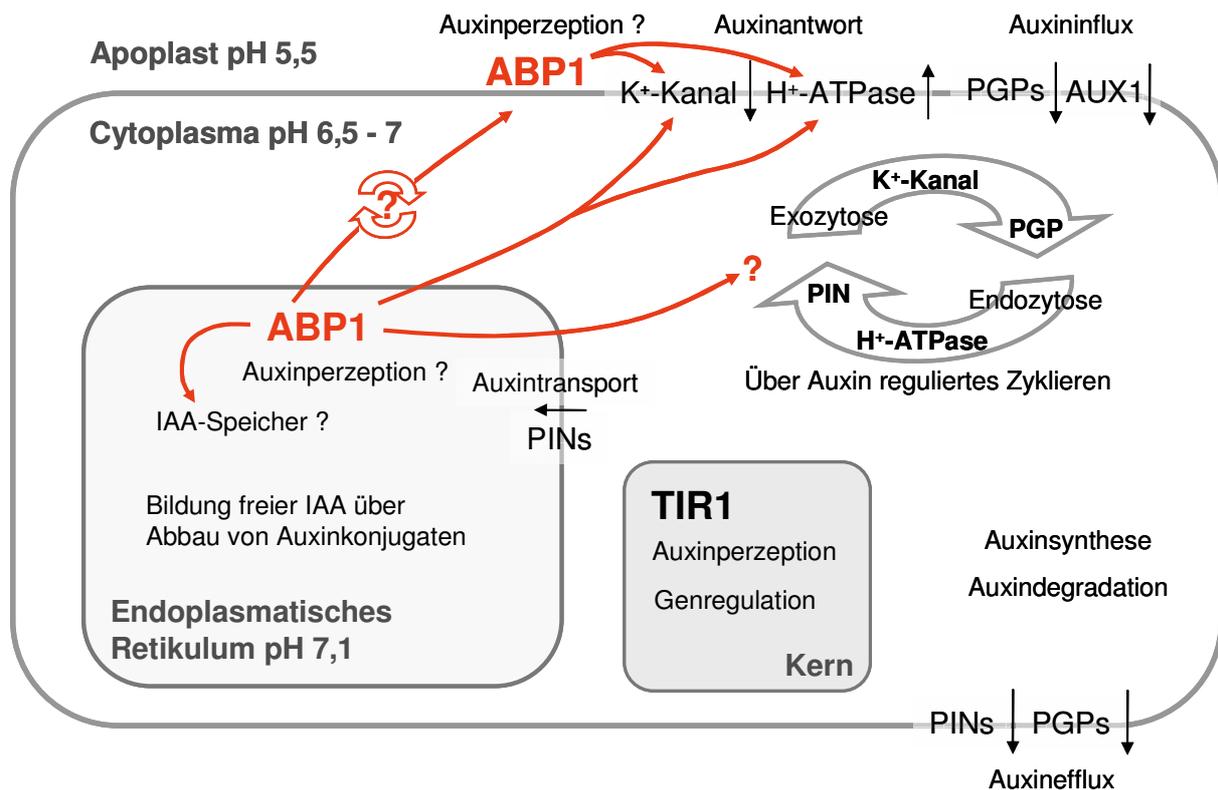


Abbildung 32: Modell des Auxinmetabolismus und der Auxinperzeption und -transduktion. In Orange ist der mögliche Signalweg von ABP1 hervorgehoben. Dieser verläuft zwischen dem ER und der Plasmamembran. In beiden Kompartimenten ist eine Auxinperzeption möglich. Auch der Transport von ABP1 vom ER zur Plasmamembran und ein mögliches Zyklieren scheinen vorstellbar. Der Auxinsignalweg über die F-Box Auxinrezeptor-Familie, am Beispiel von TIR1, verläuft über Expression auxinregulierter Gene. Eine Verbindung von ABP1 und Genregulation wurde bis jetzt nicht nachgewiesen. Auxin wird im Cytoplasma synthetisiert und abgebaut. Der Import von Auxin erfolgt über AUX1 und PGP, der Export über PINs und PGP. PGP sind ABC-Transporter und dienen für Auxin sowohl als Influx- wie auch als Efflux-Transporter. Die Aktivität der Transporter wird unter anderem über das Zyklieren zwischen Endosomen und Plasmamembran reguliert. Einige PIN-Proteine transportieren Auxin in das ER. Im ER werden IAA-Konjugate abgebaut, wodurch wahrscheinlich die Konzentration an IAA zusätzlich erhöht wird.

Es bleibt weiterhin interessant zu klären, mit welchen Komponenten ABP1 interagiert. Diesbezügliche Untersuchungen könnten helfen, zu verstehen, ob ABP1 ein Auxinrezeptor, ein Auxintransporter oder eventuell auch ein Auxinspeicherprotein ist (Abbildung 32). Da ABP1 zu der Superfamilie der Germinale gehört, die Speicherproteine in Samen sind (Dunwell *et al.*, 2000), ist für ABP1 eine entsprechende Funktion nicht auszuschließen. Dagegen spricht jedoch, dass die bekannten IAA-Speicherproteine in *Phaseolus vulgaris* (Cohen *et al.*, 1988; Ljung *et al.*, 2002; Walz *et al.*, 2002) und *Fragaria vesca* (Park *et al.*, 2006) IAA nicht binden, sondern mit IAA konjugierte Aminosäuren enthalten. Die Funktion von ABP1 ist also weiterhin offen.

Literatur

- Abel S, Oeller PW, Theologis A (1994) Early auxin-induced genes encode short-lived nuclear proteins. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* 91: 326-330.
- Abel S, Nguyen MD, Theologis A (1995) The PS-IAA4/5-like family of early auxin-inducible mRNAs in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Molecular Biology* 251: 533-549.
- Abel S und Theologis A (1996) Early genes and auxin action. *Plant Physiology* 111: 9-17.
- Ahmadabadi M, Ruf S und Bock R (2007) A leaf-based regeneration and transformation system for maize (*Zea mays* L.). *Transgenic Research* 16 (4): 437-448.
- Aloni R (2001) Foliar and axial aspects of vascular differentiation: hypotheses and evidence. *Journal of Plant Growth Regulation* 20: 22-34.
- Alonso JM, Hirayama T, Roman G, Nourizadeh S und Ecker JR (1999) EIN2, a bifunctional transducer of ethylene and stress responses in *Arabidopsis*. *Science* 284: 2148-2152.
- Austin MJ, Muskett P, Kahn K, Feys BJ, Jones JD und Parker JE (2002) Regulatory role of SGT1 in early *R* gene-mediated plant defenses. *Science* 295: 2077-2080.
- Badescu GO und Napier M (2006) Receptors for auxin: will it all end in TIRs? *Trends in Plant Science* 11: 217-223.
- Baluška F, Šamaj J, Wojtaszek P, Volkmann D und Menzel D (2003) Cytoskeleton-plasma membrane-cell wall continuum in plants. *Emerging links revisited*. *Plant Physiology*, 133: 482-491.
- Barbier-Brygoo H, Ephritikhine G, Klämbt D, Ghislain M und Guern J (1989) Functional evidence for an auxin receptor at the plasmalemma of tobacco mesophyll protoplasts. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* 86: 891-895.
- Barbier-Brygoo H, Ephritikhine G, Klämbt D, Maurel C, Palme K, Schell J, Guern J (1991) Perception of the auxin signal at the plasma membrane of tobacco mesophyll protoplasts. *The Plant Journal* 1: 83-93.
- Bartel B und Fink G (1995) ILR1, an amidohydrolase that releases active indole-3-acetic acid from conjugates. *Science* 268: 1745-1748.
- Baulry J, Roux C, Dargeviciute A und Perrot-Rechenmann C (2002) Identification of a novel marker for auxin and ethylene cross-talk from tobacco seedlings. *Plant Physiology and Biochemistry* 40: 803-811.

- 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 (20): 4057-4067.
- Benkirane M, Neuveut C, Chun RF, Smith SM, Samuel CE, Gatignol A und Jeang KT (1997) Oncogenic potential of TAR RNA binding protein TRBP and its regulatory interaction with RNA-dependent protein kinase PKR. *EMBO Journal* 16: 611-624.
- Bennett SRM, Alvarez J, Bossinger G und Smyth DR (1995) Morphogenesis in PINOID mutants of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 8: 505-520.
- Bennett MJ, Marchant A, Green HG, May ST, Ward SP, Millner PA, Walker AR, Schultz B und Feldmann KA (1996) *Arabidopsis* AUX1 gene: a permease-like regulator of root gravitropism. *Science* 273: 948-950.
- Bertoša B, Kojić-Prodić B, Wade RC und Tomić S (2007) Mechanism of auxin interaction with auxin binding protein (ABP1): a molecular dynamics simulation study. *Biophysical Journal*, DOI: 10.1529/biophysj.107.109025
- Birnboim HD und Doly J (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research* 7: 1513-1523.
- Bishopp A, Mähönen AP und Helariutta Y (2006) Signs of change: hormone receptors that regulate plant development. *Development* 133: 1857-1869.
- Blakeslee JJ, Bandyopadhyay A, Lee OR, Mravec J, Titapiwatanakun B, Sauer M, Makam SN, Cheng Y, Bouchard R, Adamec J, Geisler M, Nagashima A, Sakai T, Martinoia E, Friml J, Peer WA und Murphy AS (2007) Interactions among PIN-FORMED and P-glycoprotein auxin transporters in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 19: 131-147.
- Blatt MR und Thiel G (1994) K⁺ channels of stomatal guard cells: bimodal control of the K⁺ inward-rectifier evoked by auxin. *The Plant Journal* 5: 55-68.
- Bleecker AB, Estelle MA, Somerville C und Kende H (1988) Insensitivity to ethylene conferred by a dominant mutation in *Arabidopsis thaliana*. *Science* 241: 1086-1089.
- Blilou I, Xu J, Wildwater M, Willemsen V, Paponov I, Friml J, Heidstra R, Aida M, Palme K und Scheres B (2005) The PIN auxin efflux facilitator network controls growth and patterning in *Arabidopsis* roots. *Nature* 433: 39-44.
- Bolte S, Talbot C, Boutte Y, Catrice O, Read ND und Satiat-Jeunemaitre B (2004) FM-dyes as experimental probes for dissecting vesicle trafficking in living plant cells. *Journal of Microscopy* 214: 159-173.
- Boutté Y, Ikeda Y und Grebe M (2007) Mechanismus of Auxin-dependent cell and tissue polarity. *Current Opinion in Plant Biology* 10: 1-8.

- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* 72: 248-254.
- Brière C, Barthou H und Petitprez M (2004) A new tool for plant cell biology: in vivo antibody uptake in plant protoplasts. *Plant cell reports* 22: 878-884.
- Brown JM und Jones AM (1994) Mapping the auxin-binding site of auxin-binding protein 1. *The Journal of Biological Chemistry* 269: 21136-21140.
- Büchschütz K, Marten I, Becker D, Phillipar K, Ache P und Hedrich R (2005) Differential expression of K⁺ channels between guard cells and subsidiary cells within maize stomatal complex. *Planta* 222: 968-976.
- Busch M, Mayer U und Jürgens G (1996) Molecular analysis of the Arabidopsis pattern formation of gene GNOM: gene and intragenic complementation. *Molecular and general genetics* 250: 681–691.
- Cancel JD und Larsen PB (2002) Loss-of-function mutations in the ethylene receptor ETR1 cause enhanced sensitivity and exaggerated response to ethylene in Arabidopsis. *Plant Physiology* 129: 1557-1567.
- Caño-Delgado A, Yin Y, Yu C, Vafeados D, Mora-Garcia S, Cheng JC, Nam KH, Li J und Chory J (2004) BRL1 and BRL3 are novel brassinosteroid receptors that function in vascular differentiation in Arabidopsis. *Development* 131: 5341-5351.
- Cao D, Cheng H, Wu W, Soo HM und Peng J (2006) Gibberellin mobilizes distinct DELLA-dependent transcriptomes to regulate seed germination and floral development in Arabidopsis. *Plant Physiology* 142: 509-525.
- Chan CS, Gup L, Shih MC (2001) Promoter analysis of the nuclear gene encoding the chloroplast glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase B subunit of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology* 46: 131-141.
- Chang C, Kwok SF, Bleecker AB und Meyerowitz EM (1993) Arabidopsis ethylene-response gene ETR1: similarity of product to two-component regulators. *Science* 262: 539-544.
- Chang CW und Sun TP (2002) Characterization of cis-regulatory regions responsible for developmental regulation of the gibberellin biosynthetic gene GA1 in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology* 49: 579-589.
- Chen H, Cheng H und Bjercknes (1993) One-step coomassie brilliant blue R-250 staining of proteins in polyacrylamide gel. *Analytical Biochemistry* 212: 295-296.
- Chen YF, Matsubayashi Y und Sakagami Y (2000) Peptide growth factor phytosulfokine- α contributes to the pollen population effect. *Planta* 211: 752-755.

- Chen YF, Randlett MD, Findell JL und Schaller GE (2002) Localization of the ethylene receptor ETR1 to the endoplasmic reticulum of Arabidopsis. *The Journal of Biological Chemistry* 277: 19861-19866.
- Chen YF, Etheridge N und Schaller GE (2005) Ethylene Signal Transduction. *Annals of Botany* 95: 901–915.
- Chen JG, Shimomura S, Sitbon F, Sandberg G und Jones AM (2001a) The role of auxin-binding protein 1 in the expansion of tobacco leaf cells. *The Plant Journal* 28: 607-617.
- Chen JG, Ullah H, Young JC, Sussman MR und Jones AM (2001b) ABP1 is required for organized cell elongation and division in Arabidopsis embryogenesis. *Genes and development* 15: 902-911.
- Chen JG, Wang S, Lazarus CM, Napier RM und Jones AM (2006) Altered expression of auxin-binding protein 1 affects cell expansion and auxin pool size in tobacco cells. *Journal of Plant Growth Regulation* 25: 69-78.
- Chen YM, Lin CY, Chang H, Guilfoyle TJ, und Key JL (1975) Isolation and properties of nuclei from control and auxin-treated soybean hypocotyl. *Plant Physiology* 56: 78-82.
- Christensen SK, Dagenais N, Chory J und Weigel D (2000) Regulation of auxin response by the protein kinase PINOID. *Cell* 100: 469-478.
- Christian M und Lüthen H (2000) New methods to analyse auxin-induced growth I: Classical auxinology goes Arabidopsis. *Plant Growth Regulation* 32: 107-114.
- Christian M, Steffens B, Schenck D und Lüthen H (2003) The diageotropica mutation of tomato disrupts a signalling chain using extracellular auxin binding protein 1 as a receptor. *Planta* 218: 309-314.
- Christian M, Steffens B, Schenck D, Burmester S, Böttger M und Lüthen H (2006) How Does auxin enhance cell elongation? Roles of auxin-binding proteins and potassium channels in growth control. *Plant Biology* 8: 346-352.
- Chuong SD, Mullens RT und Muench DG (2002) Identification of a rice RNA- and microtubule-binding protein as the multifunctional protein, a peroxisomal enzyme involved in the β -oxidation of fatty acids. *The Journal of Biological Chemistry* 277: 2419-2429.
- Chuong SD, Park NI, Freeman MC, Mullen RT und Muench DG (2005) The peroxisomal multifunctional protein interacts with cortical microtubules in plant cells. *BMC Cell Biology* 28, volume 6, article 40.
- Clark KL, Larsen PB, Wang X und Chang C (1998) Association of the Arabidopsis CTR1 raf-like kinase with the ETR1 and ERS1 ethylene receptors. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* 95: 5401-5406.

- Clark SE, Jacobsen SE, Levin JZ und Meyerowitz EM (1996) The CLAVATA and SHOOT MERISTEMLESS loci competitively regulate meristem activity in Arabidopsis. *Development* 122: 1567-1575.
- Cleland RE (1976) Rapid stimulation of K⁺-H⁺-exchange by a plant growth hormone. *Biochemical and biophysical research communications* 69: 333-338.
- Clough SJ (2005) Floral dip: Agrobacterium-mediated germ line transformation. *Methods of Molecular Biology* 286: 91-102.
- Clouse SD, Langford M und McMorris TC (1996) A brassinosteroid insensitive mutant in *Arabidopsis thaliana* exhibits multiple defects in growth and development. *Plant Physiology* 111: 671-678.
- Coenen C, Bierfreund N, Lüthen H und Neuhaus G (2002) Developmental regulation of proton ATPase dependent auxin responses in the *diageotropica* mutant of tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Physiologia plantarum* 114: 461-471.
- Cohen JD, Slovin JP, Bialek K, Chen KH und Derbyshire M (1988) Mass spectrometry, genetics and biochemistry: understanding the metabolism of indole-3-acetic acid. In *Biomechanisms Regulating Growth and Development* (Steffens GL and Rumsey TS, eds.), Dordrecht, Niederlande, Kluwer, 229-241.
- Cosentino GP, Venkatesan S, Serluca FC, Green S, Mathews MB und Sonenberg N (1995) Double-stranded-RNA-dependent protein kinase and TAR RNA-binding protein from homo- and heterodimers *in vivo*. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* 92: 9445-9449.
- Cosgrove DJ, Li LC, Cho HT, Hoffmann-Benning S, Moore RC und Blecker D (2002) The growing world of expansins. *Plant Cell Physiology* 43: 1436-1444.
- David KM, Carnero-Diaz E, Leblanc N, Monestiez M, Grosclaude J und Perrot-Rechenmann C (2001) Conformational dynamics underlie the activity of the auxin-binding protein, Nt-abp1. *The Journal of Biological Chemistry* 276: 34517-34123.
- David KM, Couch D, Braun N, Brown S, Grosclaude J und Perrot-Rechenmann C (2007) The Auxin-binding protein 1 is essential for the control of cell cycle. *The Plant Journal* 50: 197-206.
- Davies RT, Goetz DH, Lasswell J, Anderson MN und Bartel B (1999) IAR3 encodes an auxin conjugate hydrolase from Arabidopsis. *The Plant Cell* 11: 365-376.
- Dharmasiri N, Dharmasiri S und Estelle M (2005a) The F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature* 435: 441-445.
- Dharmasiri N, Dharmasiri S, Weijers D, Lechner E, Yamada M, Hobbie L, Ehrismann JS, Jürgens G und Estelle M (2005b) Plant development is regulated by a family of auxin receptor F Box proteins. *Developmental Cell* 9: 109-119.

- Diekmann W, Venis MA und Robinson DG (1995) Auxins induce clustering of the auxin-binding protein at the surface of maize coleoptile protoplasts. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* 92: 3425-3429.
- Dombeck DA, Sacconi L, Blanchard-Desce M und Webb WW (2005) Optical recording of fast neuronal membrane potential transients in acute mammalian brain slices by Second-harmonic generation microscopy. *Journal of Neurophysiology* 94: 3628-3636.
- Donaldson JG und Jackson CL (2000) Regulators and effectors of the ARF GTPases. *Current Opinion Cell Biology* 12: 475-482.
- Dreyer I, Antunes S, Hoshi T, Müller-Röber B, Palme K, Pongs O, Reintanz B und Hedrich R (1997) Plant K⁺ channel alpha-subunits assemble indiscriminately. *Biophysical Journal* 72: 2143-2150.
- Dunwell JM, Khuri S und Gane PJ (2000) Microbial relatives of the seed storage proteins of higher plants: conservation of structure and diversification of function during evolution of the cupin superfamily. *Microbiology and molecular biology reviews* 64: 153-179.
- Edgerton MD, Tropsha A und Jones AM (1994) Modelling the auxin-binding site of auxin-binding protein 1 of maize. *Phytochemistry* 35: 1111-1123.
- Ephritikhine G, Barbier-Brygoo H, Müller JF und Guern J (1987) Auxin effect on the transmembrane potential difference of wild-type and mutant tobacco protoplasts exhibiting a differential sensitivity to auxin. *Plant Physiology* 83: 801-804.
- Fatland BL, Ke J, Anderson MD, Mentzen WI, Cui LW, Allred CC, Johnston JL, Nikolau BJ und Wurtele ES (2002) Molecular characterisation of a heteromeric ATP-citrate lyase that generates cytosolic acetyl-coenzyme A in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 130: 740-756.
- Fatland BL, Ke J, Anderson MD, Mentzen WI, Cui LW, Allred CC, Johnston JL, Nikolau BJ und Wurtele EV (2005) Reverse genetic characterisation of cytosolic acetyl-CoA generation by ATP-citrate lyase in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 17: 182-203.
- Feckler C, Muster M, Feser W, Römer A und Palme K (2001) Mass spectrometric analysis reveals a cysteine bridge between residues 2 and 61 of the auxin-binding protein from *Zea mays* L. *FEBS Letters* 509: 446-450.
- Feldwisch J, Zettl R, Hesse F, Schell J und Palme K (1992) Novel auxin binding proteins are localised to the plasma membrane of maize coleoptile cells: identification by photoaffinity labeling and purification of a 23 kDa polypeptide. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* 89: 475-479.

- Felle H, Peters WS, und Palme K (1991) The electrical response of maize to auxin. *Biochimica et Biophysica Acta* 1064: 199-204.
- Ferrando A, Koncz-Lalman Z, Farras R, Tiburcio A, Schell J und Koncz C (2001) Detection of in vivo protein interactions between Snf1-related kinase subunits with intron-tagged epitope-labeling in plant cells. *Nucleic Acids Research* 29: 3685-3693.
- Ferreira FJ und Kieber JJ (2005) Cytokinin signaling. *Current Opinion in Plant Biology* 8: 518-525.
- Friedrichsen DM, Joazeiro CA, Li J, Hunter T und Chory J (2000) Brassinosteroid-insensitive-1 is a ubiquitously expressed leucine-rich repeat receptor serine/threonine kinase. *Plant Physiology* 123: 1247-1256.
- Friml J, Wisniewska J, Benková E, Mendgen K und Palme K (2002) Lateral relocation of auxin efflux regulator PIN3 mediates tropism in Arabidopsis. *Nature* 415: 806-809.
- Friml J (2003) Auxin transport-shaping the plant. *Current Opinion in Plant Biology* 6: 7-12.
- Friml J, Vieten A, Sauer M, Weijers D, Schwarz H, Hamann T, Offringa R und Jürgens G (2003) Efflux-dependent auxin gradients establish the apical-basal axis of Arabidopsis. *Nature* 426: 147–153.
- Friml J, Yang X, Michniewicz M, Weijers D, Quint A, Tietz O, Benjamins R, Ouwerkerk PBF, Ljung K, Sandberg G, Hooykaas PJJ, Palme K und Offringa R (2004) A PINOID-dependent binary switch in apical-basal PIN polar targeting directs auxin efflux. *Science* 306: 862-865.
- Fuchs I, Philippar K, und Hedrich R (2006) Ion channels meet auxin action. *Plant Biology* 8: 353-359.
- 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.
- Gao Z, Chen YF, Randlett MD, Zhao XC, Findell JL, Kieber JJ und Schaller GE (2003) Localization of the raf-like kinase CTR1 to the endoplasmic reticulum of Arabidopsis through participation in ethylene receptor signalling complexes. *The Journal of Biological Chemistry* 278: 34725-34732.
- Gao D, Knight MR, Trewavas AJ, Sattelmacher B und Plieth C (2004) Self-reporting Arabidopsis expressing pH and [Ca²⁺] indicators unveil ion dynamics in the cytoplasm and in the apoplast under abiotic stress. *Plant Physiology* 134: 898-908.
- Geisler M, Kolukisaoglu HU, Bouchard R, Billion K, Berger J, Saal B, Frangne N, Koncz-Lalman Z, Koncz C, Dudler R, Blakeslee JJ, Murphy AS, Martinoia E und Schulz B (2003) TWISTED DWARF1, a unique plasma membrane-anchored immunophilin-like protein, interacts with Arabidopsis multidrug resistance-like transporters AtPGP1 and AtPGP19. *Molecular Biology of the Cell* 14: 4238-4249.

- Geisler M, Blakeslee JJ, Bouchard R, Lee OR, Vincenzetti V, Bandyopadhyay A, Peer WA, Bailly A, Richards EL, Edjendal KF, Smith AP, Baroux C, Grossniklaus U, Muller A, Hrycyna CA, Dudler R, Murphy AS und Martinoia E (2005) Cellular export of auxin by MDR-type ATP-binding cassette transporters of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 44: 179-194
- Geisler M und Murphy AS (2006) The ABC of auxin transport: the role of p-glycoproteins in plant development. *FEBS Letters* 580: 1094-1102.
- Geldner N, Friml J, Stierhof YD, Jürgens G und Palme K (2001) Auxin transport inhibitors block PIN1 cycling and vesicle trafficking. *Nature* 413: 425-428
- Geldner N, Anders N, Wolters H, Keicher J, Kornberger W, Muller P, Delbarre A, Ueda T, Nakano A und Jürgens G (2003) The Arabidopsis GNOM ARF-GEF mediates endosomal recycling, auxin transport, and auxin-dependent plant growth. *Cell* 112: 219-230.
- Geldner N, Derek L, Hyman DL, Wang X, Schumacher K und Chory J (2007) Endosomal signaling of plant steroid receptor kinase BRI1. *Genes and Development* 21:1598-1602.
- Gendreau E, Hofte H, Grandjean O, Brown S, Traas J (1998) Phytochrome controls the number of endoreduplication cycles in the *Arabidopsis thaliana* hypocotyl. *The Plant Journal* 13: 221-230.
- Gil P, Liu Y, Orbovic V, Verkamp E, Poff KL und Green PJ (1994) *Plant Physiology* 104: 777-784.
- Gilissen LJW, van Staveren MJ, Hakkert JC und Smulders MJM (1996) Competence for regeneration during tobacco internodal development. Involvement of plant age, cell elongation stage, and degree of polysomaty. *Plant Physiology* 111: 1243-1250.
- Golz JF (2006) Signalling between the shoot apical meristem and developing lateral organs. *Plant Molecular Biology* 60: 889-903.
- Gray WM, Kepinski S, Rouse D, Leyser O und Estelle M (2001) Auxin regulates SCF^{TIR1}-dependent degradation of AUX/IAA proteins. *Nature* 414: 271-276.
- Grebe M, Xu J, Mobius W, Ueda T, Nakano A, Geuze H, Rook M und Scheres B (2003) Arabidopsis sterol endocytosis involves actin-mediated trafficking via ARA6-positive early endosomes. *Current biology* 13: 1378-1387.
- Griffiths J, Murase K, Rieu I, Zentella R, Zhang ZL, Powers SJ, Gong FG, Phillips AL, Hedden P, Sun T und Thomas SG (2007) Genetic characterization and functional analysis of the GID1 gibberellin receptors in Arabidopsis. *The Plant Cell* 18: 3399-3414.

- Guo H und Ecker JR (2003) Plant responses to ethylene gas are mediated by SCF^(EBF1/EBF2)-dependent proteolysis of EIN3 transcription factor. *Cell* 115: 667-677.
- Hagen G, Kleinschmidt A und Guilfoyle T (1984) Auxin-regulated gene expression in intact soybean hypocotyl and excised hypocotyl sections. *Planta* 162: 147-153.
- Hager A, Menzel H und Krauss A (1971) Experimente und Hypothese zur Primärwirkung des Auxins beim Streckungswachstum. *Planta* 100: 47-75.
- Hager A, Debus G, Edel HG, Stransky H und Serrano R (1991) Auxin induces exocytosis and the rapid synthesis of a high-turnover pool of plasma membrane H⁺-ATPase. *Planta* 185: 527-537.
- Hager A (2003) Role of the plasma membrane H⁺-ATPase in auxin-induced elongation growth: historical and new aspects. *Journal of Plant Research* 116: 483-505.
- Hamann T, Mayer U und Jürgens G (1999) The auxin-insensitive *bodenlos* mutation affects primary root formation and apical-basal patterning in the Arabidopsis embryo. *Development* 126: 1387-1395.
- Hamann T, Benkova E, Bäurle I, Kientz M und Juergens G (2002) The *Arabidopsis* BODENLOS gene encodes an auxin response protein inhibiting MONOPTEROS-mediated embryo patterning. *Genes and Development* 16: 1610-1615.
- Hamblett KJ, Kegley BB, Hamlin DK, Chyan MK, Hyre DE, Press OW, Wilbur DS und Stayton PS (2002) A streptavidin-biotin binding system that minimizes blocking by endogenous biotin. *Bioconjugate Chemistry* 13: 588-598.
- Hanai H, Matsuno T, Yamamoto M, Matsubayashi Y, Kobayashi T, Kamada H, Sakagami Y (2000) A secreted peptide growth factor, phytosulfokine, acting as a stimulatory factor of carrot somatic embryo formation. *Plant Cell Physiology* 41: 27-32.
- Harata NC, Aravanis AM und Tsien RW (2006) Kiss-and-run and full-collapse fusion as modes of exo-endocytosis in neurosecretion. *Journal of Neurochemistry* 97: 1546-1570.
- Hardtke CS, Ckurshumova W, Vidaurre DP, Singh S, Stamatiou G, Tiwari SB, Hagen G, Guilfoyle TJ und Berleth T (2004) Overlapping and non-redundant functions of the Arabidopsis auxin response factors MONOPTEROS and NONPHOTOTROPIC HYPOCOTYL 4. *Development* 131: 1089-1100.
- Haschke HP und Lüttge U (1973) β -Indolyllessigsäure (IES) abhängiger K⁺-H⁺-Austauschmechanismus und Streckungswachstum bei *Avena*-Koleoptilen. *Zeitschrift für Naturforschung* 28c: 555-558.
- He JX, Gendron JM, Sun Y, Gampala SS, Gendron N, Sun CQ und Wang ZY (2005) BZR1 is a transcriptional repressor with dual roles in brassinosteroid homeostasis and growth responses. *Science* 307: 1634-1638.

- Heisler MG, Ohno C, Das P, Sieber P, Reddy GV, Long JA und Meyerowitz EM (2005) Patterns of auxin transport and gene expression during primordium development revealed by live imaging of the Arabidopsis inflorescence meristem. *Current biology* 15: 1899-1911.
- Henderson J, Baulry JM, Ashford DA, Oliver SC, Hawes CR, Lazarus CM und Venis MA (1997) Retention of maize auxin-binding protein in the endoplasmic reticulum: quantifying escape and role of auxin. *Planta* 202: 313-323.
- Hertel, R, Thomas, K und Russo, VEA (1972) *In vitro* auxin binding to particulate cell fractions from corn coleoptiles. *Planta* 107: 325-340.
- Hesse T, Feldwisch J, Balschuseraann D, Bauw G, Puype M, Vandekerckhove J, Löbler 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 Journal* 8: 2453-2461.
- Higuchi M, Pischke MS, Mähönen AP, Miyawaki K, Hashimoto Y, Seki M, Kobayashi M, Shinozaki K, Kato T, Tabata S, Helariutta Y, Sussman MR und Kakimoto T (2004) In planta functions of the Arabidopsis cytokinin receptor family. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* 101: 8821-8826.
- Holton N, Caño-Delgado A, Harrison K, Montoya T, Chory J und Bishop GJ (2007) Tomato BRASSINOSTEROID INSENSITIVE1 is required for systemin-induced root elongation in *Solanum pimpinellifolium* but is not essential for wound signaling. *The Plant Cell* 19: 1709-1717.
- Homann U und Thiel G (2002) The number of K⁺ channels in the plasma membrane of guard cell protoplasts changes in parallel with the surface area. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* 99: 10215-10220.
- Hou ZX und Huang WD (2005) Immunohistochemical localization of IAA and ABP1 in strawberry shoot apices during floral induction. *Planta* 222: 678-687.
- Hou HW, Zhou YZ, Mwange KNK, Li WF, He XQ und Cui KC (2006) ABP1 expression regulated by IAA and ABA is associated with the cambium periodicity in *Eucommia ulmoides* Oliv. *Journal of Experimental Botany* 57: 3857-3867.
- Hua J, Chang C, Sun Q und Meyerowitz EM (1995) Ethylene sensitivity conferred by Arabidopsis ERS gene. *Science* 269: 1712-1714.
- Huang Y, Li H, Hutchison CE, Laskey J und Kieber JJ (2003) Biochemical and functional analysis of CTR1, a protein kinase that negatively regulates ethylene signalling in Arabidopsis. *The Plant Journal* 33: 221-233.
- Hurst AC, Meckel T, Tayefeh S, Thiel G, Homann U (2004) Trafficking of the plant potassium inward rectifier KAT1 in guard cell protoplasts of *Vicia faba*. *The Plant Journal* 37: 391-397.

- Hwang I und Sheen J (2001) Two-component circuitry in *Arabidopsis* cytokinin signal transduction. *Nature* 413: 383-389.
- Hwang I, Chen HC, Sheen J (2002) Two-component signal transduction pathways in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 129: 500-515.
- Igasaki T, Akashi N, Ujino-Ihara T, Matsubayashi Y, Sakagami Y, Shinohara K (2003) Phytosulfokine stimulates somatic embryogenesis in *Cryptomeria japonica*. *Plant Cell Physiology* 44: 1412-1416.
- Ilić N, Normanly J und Cohen JD (1996) Quantification of free plus conjugated indoleacetic acid in *Arabidopsis* requires correction for the nonenzymatic conversion of indolic nitriles. *Plant Physiology* 111: 781-788.
- Ilić N und Cohen JD (2004) Synthesis of [¹³C]-isotopomers of indole and tryptophan for use in the analysis of indole-3-acetic acid biosynthesis. *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals* 47: 635-646.
- Inohara N, Shimomura S, Fukui T und Futai M (1989) Auxin binding protein located in the endoplasmic reticulum of maize shoots: molecular cloning and complete primary structure. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* 83: 3654-3658.
- Inoue T, Higuchi M, Hashimoto Y, Seki M, Kobayashi M, Kato T, Tabata S, Shinozaki K und Kakimoto T (2001) Identification of CRE1 as a cytokinin receptor from *Arabidopsis*. *Nature* 409: 1060-1063.
- Itoh H, Ueguchi-Tanaka M, Kawaide H, Chen X, Kamiya Y und Matsuoka M (1999) The gene encoding tobacco gibberellin 3 β -hydroxylase is expressed at the site of GA action during stem elongation and flower organ development. *The Plant Journal* 20: 15-24.
- Jakubowska A und Kowalczyk S (2004) The auxin conjugate 1-O-indole-3-acetyl-b-D-glucose is synthesized in immature legume seeds by IAGlc synthase and may be used for modification of some high molecular weight compounds. *Journal of Experimental Botany* 55: 791-801.
- Jiang J, Eisinger KB und Yuste R (2007) Second harmonic generation in neurons: electro-optic mechanism of membrane potential sensitivity. *Biophysical Journal-Biophysical Letters* L01-L03.
- Johnson MA, Pérez-Amador MA, Lidder P und Green PJ (2000) Mutants of *Arabidopsis* defective in a sequence-specific mRNA degradation pathway. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* 97: 13991-13996.
- Jones AM (1994) Auxin-binding proteins. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 45: 393-420.

- Jones AM und Herman EM (1993) KDEL-containing auxin-binding protein is secreted to the plasma membrane and cell wall. *Plant Physiology* 101: 595-606.
- Jones AM, Im KH, Savka MA, Wu MJ, DeWitt G, Shillito R und Binns AN (1998) Auxin dependent cell expansion mediated by overexpressing auxin-binding protein 1. *Science* 282: 1114-1117.
- Katekar GF (1979) Auxins: on the nature of the receptor site and molecular requirements for auxin activity. *Phytochemistry* 18: 223-233.
- Kepinski S und Leyser O (2005) The Arabidopsis F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature* 435: 446-451.
- Kieber JJ, Rothenberg M, Roman G, Feldmann KA und Ecker JR (1993) CTR1, a negative regulator of the ethylene response pathway in Arabidopsis, encodes a member of the Raf family of protein kinases. *Cell* 72: 427-441.
- Kim J, Harter K und Theologis A (1997) Protein-protein interactions among the Aux/IAA proteins. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* 94: 11786-11791.
- Kim JH, Johannes L, Goud B, Antony C, Lingwood CA, Daneman R und Grinstein S (1998) Noninvasive measurement of the pH of the endoplasmic reticulum at rest and during calcium release. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* 95: 2997-3002.
- Kinoshita T, Caño-Delgado A, Seto H, Hiranuma S, Fujioka S, Yoshida S und Chory J (2005) Binding of brassinosteroids to the extracellular domain of plant receptor kinase BRI1. *Nature* 433: 167-171.
- Klämbt, D (1990) A view about the function of auxin binding proteins at the plasma membrane. *Plant Molecular Biology* 14: 1045-1050.
- Kleine-Vehn J, Dhonukshe P, Swarup R, Bennett M, und Friml J (2006) Subcellular trafficking of the Arabidopsis auxin influx carrier AUX1 uses a novel pathway distinct from PIN1. *The Plant Cell* 18: 3171-3181.
- Klumpp S und Krieglstein J (2002) Serine/threonine protein phosphatases in apoptosis. *Current opinion in pharmacology* 2: 458-462.
- Kobayashi T, Eun C, Hanai H, Matsubayashi Y, Sakagami Y und Kamada H (1999) Phytosulphokine- α , a peptidyl plant growth factor, stimulates somatic embryogenesis in carrot. *Journal of Experimental Botany* 50: 1123-1128.
- Kobe B und Kajava AV (2001) The leucine-rich repeat as a protein recognition motif. *Current opinion in structural biology* 11: 725-732.

- Koncz C und Shell J (1986) The promoter of TL-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. *Molecular and general genetics* 204: 383-396.
- Korndörfer IP und Skerra A (2001) Improved affinity of engineered Streptavidin for the Strep-tag II peptide is due to a fixed open conformation of the lid-like loop at the binding site. *Protein Science* 11: 883-893.
- Kowalczyk M und Sandberg G (2001) Quantitative analysis of indole-3-acetic acid metabolites in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 127: 1845-1853.
- Leblanc N, David K, Grosclaude J, Pradier JM, Barbier-Brygoo H, Labiau S und Perrot-Rechenmann C (1999a) A novel immunological approach establishes that the auxin-binding protein, Nt-abp1, is an element involved in auxin signaling at the plasma membrane. *The Journal of Biological Chemistry* 274: 28314-28320.
- Leblanc N, Perrot-Rechenmann C und Barbier-Brygoo H (1999b) The auxin-binding protein Nt-ERabp1 alone activates an auxinlike transduction pathway. *FEBS Letters* 449: 57-60.
- Li J und Chory J (1997) A putative leucine-rich repeat receptor kinase involved in brassinosteroid signal transduction. *Cell* 90: 929-938.
- Liscum E und Reed JW (2002) Genetics of Aux/IAA and ARF action in plant growth and development. *Plant Molecular Biology* 49: 387-400.
- Liu X, Yue Y, Li B, Nie Y, Li W, Wu WH und Ma L (2007) A G protein-coupled receptor is a plasma membrane receptor for the plant hormone abscisic acid. *Science* 315: 1712-1716.
- Ljung K, Bhalerao RP und Sandberg G (2001) Sites and homeostatic control of auxin biosynthesis in *Arabidopsis* during vegetative growth. *The Plant Journal* 28: 465-474.
- Ljung K, Hull AK, Kowalczyk M, Marchant A, Celenza J, Cohen JD und Sandberg G (2002) Biosynthesis, conjugation, catabolism and homeostasis of indole-3-acetic acid in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology* 49: 249-272.
- Löbler M und Klämbt D (1985) Auxin-binding protein from coleoptile membranes of corn (*Zea mays* L.): purification by immunological methods and characterization. *The Journal of Biological Chemistry* 260: 9848-9853.
- Lomax TL, Muday GK und Rubery PH (1995) Auxin transport. In: Davies PJ, ed. *Plant hormones*. Dordrecht, Niederlande, Kluwer, 509-530.
- Long JA, Moan EI, Medford JI und Barton MK (1996) A member of the KNOTTED class of homeodomain proteins encoded by the SHOOTMERISTEMLESS gene of *Arabidopsis*. *Nature* 379: 66-69.

- Lorbiecke R und Sauter M (2002) Comparative analysis of PSK peptide growth factor precursor homologs. *Plant Science* 163: 321-332.
- Lüthen H, Bigdon M und Böttger M (1990) Reexamination of acid growth theory of auxin action. *Plant Physiology* 93: 931-939.
- Lucas, WJ und Lee JY (2004) Plasmodesmata as a supracellular control network in plants. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 5: 712-726.
- MacDonald H (1997) Auxin perception and signal transduction. *Physiologia Plantarum* 100: 423-433.
- Madlung A, Behringer FJ und Lomax TL (1999) Ethylene plays multiple nonprimary roles in modulating the gravitropic response in tomato. *Plant Physiology* 120: 897-906.
- Marchant A, Bhalerao O, Casimiro I, Eklof J, Casero PJ, 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.
- Marrè E, Lado P, Caldugno R und De Michaelis MI (1974) Evidence for the coupling of proton extrusion to K⁺ uptake in pea internode segments treated with fusaric acid or auxin. *Plant Science Letters* 3: 365-379.
- Massotte D, Fleig U und Palme K (1995) Purification and characterization of an auxin-binding protein from Arabidopsis thaliana expressed in baculovirus-infected insect cells. *Protein expression and purification* 6: 220-227.
- Matsubayashi Y und Sakagami Y (1996) Phytosulfokine, sulfated peptides that induce the proliferation of single mesophyll cells of *Asparagus officinalis* L. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* 93: 7623-7627.
- Matsubayashi Y, Takagi L, Omura N, Morita A und Sakagami Y (1999) The endogenous sulfated pentapeptide phytosulfokine- α stimulates tracheary element differentiation of isolated mesophyll cells of zinnia. *Plant Physiology* 120: 1043-1048.
- Matsubayashi Y, Ogawa M, Morita A und Sakagami Y. (2002) An LRR receptor kinase involved in perception of a peptide plant hormone, phytosulfokine. *Science* 296: 1470-1472.
- Matsubayashi Y, Ogawa M, Kihara H, Niwa M und Sakagami Y (2006) Disruption and overexpression of Arabidopsis phytosulfokine receptor gene affects cellular longevity and potential for growth. *Plant Physiology* 142: 45-53.
- Maxfield FR und McGraw TE (2004) Endocytic recycling. *Nature reviews. Molecular cell biology* 5: 121-132.
- McClure BA und Guilfoyle TJ (1987) Characterisation of a class of small auxin-inducible soybean polyadenylated RNAs. *Plant Molecular Biology* 9: 611-623.

- McQueen-Mason S, Durachko DM und Cosgrove DJ (1992) Two endogenous proteins that induce cell wall extension in plants. *The Plant Cell* 4: 1425-1433.
- Meckel T, Hurst AC, Thiel G und Homann U (2004) Endocytosis against high turgor: intact guard cells of *Vicia faba* constitutively endocytose fluorescently labelled plasma membrane and GFP-tagged K⁺-channel KAT1. *The Plant Journal* 39: 182-193.
- Meindl T, Boller T und Felix G (1998) The plant wound hormone systemin binds with the N-terminal part to its receptor but needs the C-terminal part to activate it. *The Plant Cell* 10: 1561-1570.
- Merril CR, Goldman D, Sedman SA und Ebert MH (1981) Ultrasensitive stain for proteins in polyacrylamide gels shows regional variation in cerebrospinal fluid proteins. *Science* 211: 1437-1438.
- Michaels SD und Amasino RM (1999) FLOWERING LOCUS C encodes a novel MADS domain protein that acts as a repressor of flowering. *The Plant Cell* 11: 949-956.
- Mochizuki N, Brusslan JA, Larkin R, Nagatani N und Chory J (2001) Arabidopsis genomes uncoupled 5 (GUN5) mutant reveals the involvement of Mg-chelatase H subunit in plastid-to-nucleus signal transduction. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* 98: 2053-2058.
- Mockaitis K und Howell SH (2000) Auxin induces mitogenactivated protein kinase (MAPK) activation in roots of Arabidopsis seedlings. *The Plant Journal* 24: 785-796.
- Montoya T, Nomura T, Farrar K, Kaneta T, Yokota T und Bishop GJ (2002) Cloning the tomato curl3 gene highlights the putative dual role of the leucine-rich repeat receptor kinase tBRI1/SR160 in plant steroid hormone and peptide hormone signaling. *The Plant Cell* 14: 3163-3176.
- Moore LR und King J (2003) Investigating the regulation of one-carbon metabolism in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiology* 44: 233-241.
- Mullen RT (2002) Targeting and import of matrix proteins into peroxisomes. *In Plant peroxisomes: biochemistry, cell biology and biotechnological applications*. Kluwer Academic Publishers, 339-385.
- Munro S und Pelham HRB (1987) A C-terminal signal prevents secretion of luminal ER proteins. *Cell* 48: 899-907.
- Murphy E, Hieny S, Sher A und O'Garra A (1993) Detection of in vivo expression of interleukin-10 using semi-quantitative polymerase chain reaction method in *Schistosoma mansoni* infected mice. *Journal of Immunological Methods* 162: 211-223.
- Murphy AS, Hoogner KR, Peer WA und Taiz L (2002) Identification, purification, and molecular cloning of N-1-naphthylphthalamic acid-binding plasma membrane-associated aminopeptidases from Arabidopsis. *Plant Physiology* 128: 935-950.

- Nikolau BJ, Ohlrogge JB und Wurtele ES (2003) Plant biotin-containing carboxylases. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 414: 211-222.
- Nakajima, M, Shimada, A, Takashi, Y, Kim, YC und Park, SH (2006). Identification and characterization of *Arabidopsis* gibberellin receptors. *The Plant Journal* 46: 880-889.
- Nam KH und Li J (2002) BRI1/BAK1, a receptor kinase pair mediating brassinosteroid signaling. *Cell* 110: 203-212.
- Napier RM und Venis MA (1990) Monoclonal antibodies detect an auxin-induced conformational change in the maize auxin-binding protein. *Planta* 182: 313-318.
- Napier RM, Fowke LC, Hawes C, Lewis M und Pelham HRB (1992) Immunological evidence that plants use both HDEL and KDEL for targeting proteins to the endoplasmic reticulum. *Journal of Cell Science* 102: 261-271.
- Napier RM (2001) Models of auxin binding. *Journal of Plant Growth Regulation* 20: 244-254.
- Napier RM, David KM und Perrot-Rechenmann C (2002) A short history of auxin-binding proteins. *Plant Molecular Biology* 49: 339-348.
- Noh B, Murphy AS und Spalding EP (2001) Multidrug resistance-like genes of *Arabidopsis* required for auxin transport and auxin-mediated development. *The Plant Cell* 13: 2441-2454.
- Normanly J, Cohen JD und Fink GR (1993) *Arabidopsis thaliana* auxotrophs reveal a tryptophan-independent biosynthetic pathway for indole-3-acetic acid. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* 90: 10355-10359.
- Normanly J, Grisafi P, Fink GR und Bartel B (1997) *Arabidopsis* mutants resistant to the auxin effects of indole-3-acetonitrile are defective in the nitrilase encoded by the NIT1 gene. *The Plant Cell* 9:1781-1790.
- Nott A, Jung HS, Koussevitzky S und Chory J (2006) Plastid-to-nucleus retrograde signaling. *Annual Reviews of Plant Biology* 57: 730-759.
- Nuriya M, Jiang J, Nemet B, Eisenthal KB und Yuste R (2006) Imaging membrane potential in dendritic spines. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* 103: 786-790.
- Orozco-Cárdenas M, McGurl B und Ryan CA (1993) Expression of an antisense prosystemin gene in tomato plants reduces resistance toward *Manduca sexta* larvae. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* 90: 8273-8276.
- Ouaked F, Rozhon W, Lecourieux D und Hirt H (2003) A MAPK pathway mediates ethylene signalling in plants. *EMBO Journal* 22: 1282-1288.
- Ouellet F, Overvoorde PJ und Theologis A (2001) IAA17/AXR3: Biochemical insight into an auxin mutant phenotype. *The Plant Cell* 13: 829-841.

- Paciorek T, Zažímalová E, Ruthardt N, Petrášek J, Stierhof YD, Kleine-Vehn J, Morris DA, Emans N, Jürgens G, Geldner N und Friml J (2005) Auxin inhibits endocytosis and promotes its own efflux from cells. *Nature* 435: 1251-1256.
- Palme K, Hesse T, Campos N, Garbers C, Yanofsky MF und Schell J (1992) The auxin-binding protein from *Arabidopsis thaliana* is located on chromosome 4. *The Plant Cell* 4: 193-201.
- Palme K und Gälweiler L (1999) PIN-pointing the molecular basis of auxin transport. *Current Opinion in Plant Biology* 2: 375-381.
- Paponov IA, Teale WD, Trebar M, Blilou I und Palme K (2005) The PIN auxin efflux facilitators: evolutionary and functional perspectives. *Trends in Plant Science* 10: 170-177.
- Park JE, Kim YS, Yoon HK und Park CM (2007) Functional characterization of *small auxin-up RNA* gene in apical hook development in *Arabidopsis*. *Plant Science* 172: 150-157.
- Park S, Cohen JD und Slovin PS (2006) Strawberry fruit protein with a novel indole-acyl modification. *Planta* 224: 1015-1022.
- Park WJ, Kriechbauer V, Müller A, Piotrowski M, Meeleym RB, Gierl A und Glawischnig E (2003) The nitrilase ZmNIT2 converts indole-3-acetonitrile to indole-3-acetic acid. *Plant Physiology* 133: 794-802.
- Parton RM, Fischer-Parton S, Watahiki MK und Trewavas AJ (2001) Dynamics of the apical vesicle accumulation and the rate of growth are related in individual pollen tubes. *Journal of Cell Science* 114: 2685-2695.
- Peer WA, Bandyopadhyay A, Blakeslee JJ, Makam SN, Chen RJ, Masson PH und Murphy AS (2004) Variation in expression and protein localization of the PIN family of auxin efflux facilitator proteins in flavonoid mutants with altered auxin transport in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell* 16: 1898-1911.
- Philippart K, Fuchs I, Lüthen H, Hoth S, Bauer CS, Haga K, Thiel G, Ljung K, Sandberg G, Böttger M, Becker D und Hedrich R (1999) Auxin-induced K⁺ channel expression represents an essential step in coleoptile growth and gravitropism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 96: 12186-12191.
- Pollmann S, Müller A, Piotrowski M und Weiler EW (2002) Occurrence and formation of indole-3-acetamide in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 216: 155-161.
- Pollmann S, Neu D und Weiler EW (2003) Molecular cloning and characterization of an amidase from *Arabidopsis thaliana* capable of converting indole-3-acetamide into the plant growth hormone, indole-3-acetic acid. *Phytochemistry* 62: 293-300.

- Ponce G, Barlow PW, Feldman LJ, Cassab GI (2005) Auxin and ethylene interactions control mitotic activity of the quiescent centre, root cap size, and pattern of cap cell differentiation in maize. *Plant Cell Environment* 28: 719-732.
- Potuschak T, Lechner E, Parmentier Y, Yanagisawa S, Grava S, Koncz C und Genschik P (2003) EIN3-dependent regulation of plant ethylene hormone signaling by two Arabidopsis F box proteins: EBF1 and EBF2. *Cell* 115: 679-689.
- Prabhu V, Chatson KB, Abrams GD und King J (1996) ^{13}C nuclear magnetic resonance detection of interactions of serine hydroxymethyltransferase with C1-tetrahydrofolate synthase and glycine decarboxylase complex activities in Arabidopsis. *Plant Physiology* 112: 207-216.
- Preisig-Müller R, Gühneemann-Schäfer K und Kindl H (1994) Domains of the tetrafunctional protein acting in glyoxysomal fatty acid beta-oxidation. Demonstration of epimerase and isomerase activities on a peptide lacking hydratase activity. *The Journal of Biological Chemistry* 269: 20475-20481.
- Rahmat A (2002) Somatische Embryogenese und Gentransfer bei ausgewählten Tannenarten (Gattung *Abies* Mill.), Dissertation, Humboldt-Universität zu Berlin
- Ramos JA, Zenser N, Leyser O und Callis J (2001) Rapid degradation of auxin/indoleacetic acid proteins requires conserved amino acids of domain II and is proteasome dependent. *The Plant Cell* 13: 2349-2360.
- Rayle DL (1973) Auxin induced hydrogen ion secretion in *Avena* coleoptiles and its implication. *Planta* 114: 63-73.
- Rayle DL und Cleland RE (1977) Control of plant cell enlargement by hydrogen ions. *Curr Top Development Biology* 11: 187-214.
- Rayle DL und Cleland RE (1992) The acid growth theory of Auxin-induced cell elongation is alive and well. *Plant Physiology* 99: 1271-1274.
- Razem FA, El-Kereamy A, Abrams SR und Hill RD (2006) The RNA-binding protein FCA is an abscisic acid receptor. *Nature* 439: 290-294.
- Reed RC, Brady SR, Muday GK (1998) Inhibition of auxin movement from the shoot into the root inhibits lateral root development in Arabidopsis. *Plant Physiology* 118: 1369-1378.
- Remington DL, Vision TJ, Guilfoyle TJ und Reed JW (2004) Contrasting modes of diversification in the Aux/IAA and ARF gene families. *Plant Physiology* 135: 1738-1752.
- Rice MS und Lomax TL (2000) The auxin-resistant *diageotropica* mutant of tomato responds to gravity via an auxin-mediated pathway. *Planta* 210: 906-913.

- Romeis T, Ludwig AA, Martin R und Jones JDG (2001) Calcium-dependent protein kinases play an essential role in a plant defence response. *EMBO Journal* 20: 5556-5567.
- Rück A, Palme K, Venis MA, Napier RM und Felle RH (1993) Patch-clamp analysis establishes a role for an auxin-binding protein in the auxin stimulation of plasma membrane current in *Zea mays* protoplasts. *The Plant Journal* 4: 41-46.
- Russinova E, Borst JW, Kwaaitaal M, Cano-Delgado A, Yin Y, Chory J, und de Vries SC (2004) Heterodimerization and endocytosis of *Arabidopsis* brassinosteroid receptors BRI1 and AtSERK3 (BAK1). *The Plant Cell* 16: 3216-3229.
- Sabatini S, Beis D, Wolkenfelt H, Murfett J, Guilfoyle T, Malamy J, Benfey P, Leyser O, Bechtold N, Weisbeek P und Scheres B (1999) An auxin-dependent distal organizer of pattern and polarity in *Arabidopsis* root. *Cell* 99: 463-472.
- Sablowski R (2002) The dynamic plant stem cell niches. *Current Opinion in Plant Biology* 10: 1-6.
- Sambrook J and Russell DW (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Sauter M (1997) Differential expression of a CAK (cdc2-activating kinase)-like protein kinase, cyclins and cdc2 genes from rice during the cell cycle and in response to gibberellin. *The Plant Journal* 11: 181-190.
- Schaller F und Weiler EW (1997) Molecular cloning and characterization of 12-oxophytodienoate reductase, an enzyme of the octadecanoid signalling pathway from *Arabidopsis thaliana*. *The Journal of Biological Chemistry* 272: 28066-28072.
- Scheer JM und Ryan CA (2002) The systemin receptor SR160 from *Lycopersicon peruvianum* is a member of the LRR receptor kinase family. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* 99: 9585-9590.
- Scheer JM, Pearce G und Ryan CA (2003) Generation of systemin signaling in tobacco by transformation with the tomato systemin receptor kinase gene. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* 100: 10114–10117.
- Schiebl C, Walther A, Rescher U und Klämbt D (1997) Interaction of auxin-binding protein 1 with maize coleoptile plasma membranes in vitro. *Planta* 201: 470-476.
- Schmidt TGM und Skerra A (1993) The random peptide library-assisted engineering of a C-terminal affinity peptide, useful for the detection and purification of a functional Ig Fv fragment. *Protein Engineering Design and Selection* 6: 109-122.
- Schmidt TGM, Koepke J, Frank R und Skerra A (1996) Molecular interaction between the Strep-tag affinity peptide and its cognate target, Streptavidin. *Journal of Molecular Biology* 255: 753-766.

- Sedbrook JC, Carroll KL, Hung KF, Masson PH und Somerville CR (2002) The *Arabidopsis* SKU5 gene encodes an extracellular glycosyl phosphatidylinositol-anchored glycoprotein involved in directional root growth. *The Plant Cell* 14: 1635-1648.
- Seidel C, Walz A, Park S, Cohen JD, und Ludwig-Müller J (2005) Indole-3-acetic acid protein conjugates: novel players in auxin homeostasis. *Plant Biology* 8: 340-345.
- Sheldon CC, Rouse DT, Finnegan EJ, Peacock WJ und Dennis ES (2000) The molecular basis of vernalization: the central role of FLOWERING LOCUS C (FLC). *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* 97: 3753-3758.
- Shen YY, Wang XF, Wu FQ, Du SY, Cao Z, Shang Y, Wang XL, Peng CC, Yu XC, Zhu SY, Fan RC, Xu YH und Zhang DP (2006) The Mg-chelatase H subunit is an abscisic acid receptor. *Nature* 443: 823–826.
- Shimomura S, Sotobayashi T, Futai M und Fukui T (1986) Purification and properties of an auxin-binding protein from maize shoot membranes. *Journal of Biochemistry* 99: 1513-1524.
- Shimomura S, Watanabe S und Ichikawa H (1999) Characterization of auxin-binding protein 1 from tobacco: content, localization and auxin-binding activity. *Planta* 209: 118-125.
- Shimomura S (2006) Identification of a glycosylphosphatidylinositol-anchored plasma membrane protein interacting with the C-terminus of auxin-binding protein 1: a photoaffinity crosslinking study. *Plant Molecular Biology* 60: 663-677.
- Shinohara H, Ogawa M, Sakagami Y und Matsubayashi Y (2007) Identification of ligand binding site of phytoalexin receptor by on-column photoaffinity labeling. *The Journal of Biological Chemistry* 282: 124-131.
- Shiu SH und Bleecker AB (2001) Receptor-like kinases from *Arabidopsis* form a monophyletic gene family related to animal receptor kinases. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* 98: 10763-10768.
- Silverstone AL, Jung HS, Dill A, Kawaide H, Kamiya Y und Sun T (2001) Repressing a repressor: Gibberellin-induced rapid reduction of the RGA protein in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 13: 1555-1566.
- Skerra A und Schmidt TGM (2000) Use of the Strep-tag and streptavidin for detection and purification of recombinant proteins. *Methods in Enzymology* 326: 271-304.
- Sobajima H, Takeda M, Sugimori M, Kobashi N, Kiribuchi K, Cho EM, Akimoto C, Yamaguchi T, Minami E, Shibuya N, Schaller F, Weiler EW, Yoshihara T, Nishida H, Nojiri H, Omori T, Nishiyama M und Yamane H (2002) Cloning and characterization of a jasmonic acid-responsive gene encoding 12-oxophytodienoic acid reductase in suspension-cultured rice cells. *Planta* 216: 692-698.

- Staswick PE, Tiryaki I und Rowe ML (2002) Jasmonate response locus JAR1 and several related Arabidopsis genes encode enzymes of the firefly luciferase superfamily that show on jasmonic, salicylic, and indole-3-acetic acids in an assay for adenylation. *The Plant Cell* 14: 1405-1415.
- Staswick PE und Tiryaki I (2004) The oxylipin signal jasmonic acid is activated by an enzyme that conjugates it to isoleucine in Arabidopsis. *The Plant Cell* 16: 2117-2127.
- Staswick PE, Serban B, Rowe M, Tiryaki I, Maldonado MT, Maldonado MC und Suza W (2005) Characterization of an Arabidopsis enzyme family that conjugates amino acids to indole-3-acetic acid. *The Plant Cell* 17: 616-627.
- Steffens B und Lüthen H (2000) New methods to analyse Auxin-induced growth. II. The swelling reaction of protoplasts: a model system for the analysis of auxin signal transduction? *Plant Growth Regulation* 32: 115-122.
- Steffens B, Feckler C, Palme K, Christian M, Böttger M und Lüthen H (2001) The auxin signal for protoplast swelling is perceived by extracellular ABP1. *The Plant Journal* 27: 591-599.
- Steinmann T, Geldner N, Grebe M, Mangold S, Jackson CL, Paris S, Gälweiler L, Palme K und Jürgens G (1999) Coordinated polar localization of auxin efflux carrier PIN1 by GNOM ARF GEF. *Science* 286: 316-318.
- Strand Å, Asami T, Alonso J, Ecker JR und Chory J (2003) Chloroplast to nucleus communication triggered by accumulation of Mg-protoporphyrin IX. *Nature* 421: 79-83.
- Strassner J, Schaller F, Frick UB, Howe GA, Weiler EW, Amrhein N, Macheroux P und Schaller A (2002) Characterization and cDNA-microarray expression analysis of 12-oxophytodienoate reductases reveals differential roles for octadecanoid biosynthesis in the local versus the systemic wound response. *The Plant Journal* 32: 585-601.
- Subramani S, Koller A und Snyder WB (2000) Import of peroxisomal matrix and membrane proteins. *Annual Reviews of Plant Biology* 69: 399-418.
- Sutter JU, Campanoni P, Tyrrell M und Blatt MR (2006) Selective mobility and sensitivity to SNAREs is exhibited by the Arabidopsis KAT1 K1 channel at the plasma membrane. *The Plant Cell* 18: 935-954.
- Suzuki T, Miwa K, Ishikawa K, Yamada H, Aiba H und Mizuno T (2001) The Arabidopsis sensor his-kinase, AHK4, can respond to cytokinins. *Plant Cell Physiology* 42: 107-113.
- Suzuki T, Ishikawa K und Mizuno T (2002) An Arabidopsis histidine containing phosphotransfer (Hpt) factor implicated in phosphorelay signal transduction: overexpression of AHP2 in plants results in hypersensitivity to cytokinin. *Plant Cell Physiology* 43: 123-129.

- Swarup R, Friml J, Marchant A, Ljung K, Sandberg G, Palme K, Bennett M (2001) Localization of the auxin permease AUX1 suggests two functionally distinct hormone transport pathways operate in the Arabidopsis root apex. *Genes and Development* 15: 2648–2653.
- Swarup, R und Bennett M (2003) Auxin transport: the fountain of life in plants? *Developmental Cell* 5: 824-826.
- Swarup R, Kargul J, Marchant A, Zadik D, Rahman A, Mills R, Yemm A, May S, Williams L, Millner P, Tsurumi S, Moore I, Napier R, Kerr ID und Bennett MJ (2004) Structure-function analysis of the presumptive Arabidopsis auxin permease AUX1. *The Plant Cell* 16, 3069-3083.
- Sztein AE, Ilic N, Cohen JD und Cooke TJ (2002) Indole-3-acetic acid biosynthesis in isolated axes from germinating bean seeds: the effect of wounding on the biosynthetic pathway. *Plant Growth Regulation* 36: 201-207.
- Tam YY, Epstein E und Normanly J (2000) Characterization of auxin conjugates in Arabidopsis. Low steady-state levels of indole-3-acetylaspartate, indole-3-acetylglutamate, and indole-3-acetylglucose. *Plant Physiology* 123: 589-595.
- Tan X, Calderon-Villalobos LIA, Sharon M, Zheng C, Robinson CV, Estelle M und Zheng N (2007) Mechanism of auxin perception by the TIR1 ubiquitin ligase. *Nature* 446: 640-645.
- Nakamura K, Tanaka T, Kuwahara A und Takeo K (1985) Microassay for proteins on nitrocellulose filter using protein dye-staining procedure. *Analytical biochemistry* 148: 311-319.
- Terasaka K, Blakeslee JJ, Bandyopadhyay A, Peer WA, Murphy AS, Sato F und Yazaki K (2005) Involvement of AtPGP4, a P-glycoprotein-type ATP binding cassette protein, in the root basipetal auxin transport in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell* 17: 2922-2939.
- Terpe K (2003) Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Applied microbiology and biotechnology* 60: 523-533.
- Thiel G, Blatt MR, Fricker MD, White IR und Miller P (1993) Modulation of K⁺ channels in Vicia stomatal guard cells by peptide homologs to the auxin-binding protein C terminus. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* 90: 11493-11497.
- Thimann KV (1936) Auxin and the growth of roots. *American Journal of Botany* 23: 561-570.
- Tian H, Klämbt D und Jones AM (1995) Auxin-binding protein 1 does not bind auxin within the endoplasmic reticulum despite this being the predominant subcellular location for this hormone receptor. *The Journal of Biological Chemistry* 270: 26962-26969.

- Tissot G, Douce R und Alban C (1997) Evidence for multiple forms of biotin holocarboxylase synthetase in pea (*Pisum sativum*) and in *Arabidopsis thaliana*: subcellular fractionation studies and isolation of a cDNA clone. *Biochemical Journal* 323: 179-188.
- Tiwari SB, Hagen G und Guilfoyle T (2003) The roles of auxin response factor domains in auxin-responsive transcription. *The Plant Cell* 15: 533-543.
- Tiwari SB, Hagen G und Guilfoyle TJ (2004) Aux/IAA proteins contain a potent transcriptional repression domain. *The Plant Cell* 16: 533-543.
- Towbin H, Staehelin T und Gordon J. (1992) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. 1979. *Biotechnology* 24: 145-149.
- Traas J, Hulskamp M, Gendreau E und Hofte H (1998) Endoreduplication and development: rule without dividing. *Current Opinion in Plant Biology* 1: 498-503.
- Tse YC, Mo BX, Hillmer S, Zhao M, Lo SW, Robinson DG und Jiang L (2004). Identification of multivesicular bodies as prevacuolar compartments in *Nicotiana tabacum* BY-2 cells. *The Plant Cell* 16: 672-693.
- Ueguchi-Tanaka M, Ashikari M, Nakajima M, Itoh H und Katoh E (2005) GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF1 encodes a soluble receptor for gibberellin. *Nature* 437: 693-698.
- Ulmasov T, Murfett J, Hagen G und Guilfoyle TJ (1997) Aux/IAA proteins repress expression of reporter genes containing natural and highly active synthetic auxin response elements. *The Plant Cell* 9: 1963-1971.
- Ulmasov T, Hagen G und Guilfoyle TJ (1999) Activation and repression of transcription by auxin-response factors. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* 96: 5844-5849.
- Umehara M, Ogita S, Sasamoto H, Eun CH, Matsubayashi Y, Sakagami Y und Kamada H (2005) Two stimulatory effects of the peptidyl growth factor phytosulfokine during somatic embryogenesis in Japanese larch (*Larix leptolepis* Gordon). *Plant Science* 169: 901-907.
- Varshavsky A (1991) Naming a targeting signal. *Cell* 64: 13-15.
- Veit B (2006) Stem cell signalling networks in plants. *Plant Molecular Biology* 60: 793-810.
- Venis MA, Napier RM, 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. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* 89: 7208-7212.

- Voss S und Skerra A (1997) Mutagenesis of a flexible loop in streptavidin leads to higher affinity for the Strep-tag II peptide and improved performance in recombinant protein purification. *Protein Engineering Design and Selection* 10: 975-982.
- Walker CJ und Key JL (1982) Isolation of cloned cDNAs to auxin-responsive poly(A)⁺ RNAs of elongating soybean hypocotyl. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* 79: 7185-7189.
- Walker CJ und Willows RD (1997) Mechanism and regulation of Mg-chelatase. *Biochemical Journal* 327: 321-333.
- Walz A, Park S, Slovin JP, Ludwig-Müller J, Momonoki YS und Cohen JD (2002) A gene encoding a protein modified by the phytohormone indoleacetic acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 99: 1718-1723.
- Wang X, Goshe MB, Soderblom EJ, Phinney BS, Kuchar JA, Li J, Asami T, Yoshida S, Huber SC und Clouse SD (2005) Identification and functional analysis of in vivo phosphorylation sites of the Arabidopsis BRASSINOSTEROID-INSENSITIVE1 receptor kinase. *The Plant Cell* 17: 1685-1703.
- Wang XQ, Ullah H, Jones AM und Assmann SM (2001) G protein regulation of ion channels and abscisic acid signaling in Arabidopsis guard cells. *Science* 292: 2070-2072.
- Wang ZY, Seto H, Fujioka S, Yoshida S und Chory J (2001) BRI1 is a critical component of a plasma-membrane receptor for plant steroids. *Nature* 410: 380-383.
- Wang ZY, Nakano T, Gendron J, He J, Chen M, Vafeados D, Yang Y, Fujioka S, Yoshida S, Asami T und Chory J (2002). Nuclear-localized BZR1 mediates brassinosteroid-induced growth and feedback suppression of brassinosteroid biosynthesis. *Developmental Cell* 2: 505-513.
- Ward JM, Pei ZM und Schroeder JI, (1995) Roles of Ion Channels in Initiation of Signal Transduction in Higher Plants. *The Plant Cell* 7:833-844.
- Watanabe E, Shimada T, Tamura K, Matsushima R, Koumoto Y, Nishimura M und Hara-Nishimura I (2004) An ER-localized form of PV72, a seed-specific vakuolar sorting receptor, interferes the transport of an NPIR-containing proteinase in Arabidopsis leaves. *Plant Cell Physiology* 45: 9-17.
- Weigel D und Glazebrook J (2002) Whole-mount GUS Staining. *Arabidopsis: A Laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 243-247.
- Weiler EW (2003) Sensoric principles of higher plants. *Angewandte Chemie International Edition* 42: 2-23.
- Wickham L, Duchaine T, Luo M, Nabi IR und DesGroseillers L (1999) Mammalian Staufen is a double-stranded-RNA- and tubulin-binding protein which localizes to the rough endoplasmic reticulum. *Molecular and Cellular Biology* 19: 2220-2230.

- Willige BC, Ghosh S, Nill C, Zourelidou M, Dohmann EMN, Maier A und Schwechheimer C (2006) The DELLA Domain of GA INSENSITIVE Mediates the Interaction with the GA INSENSITIVE DWARF1A Gibberellin Receptor of Arabidopsis. *The Plant Cell* 19: 1209–1220.
- Wilson DW, Lewis MJ und Pelham HRB (1993) pH-dependent binding of KDEL to its receptor *in vitro*. *The Journal of Biological Chemistry* 268: 7465-7468.
- Witte CP, Noël LD, Gielbert J, Parker JE und Romeis T (2004) Rapid one-step protein purification from plant material using the eight-amino acid StrepII epitope. *Plant Molecular Biology* 55: 135-147.
- Woo EJ, Baully J, Chen JG, Marshall J, Macdonald H, Lazarus C, Goodenough P, Venis M, Napier R und Pickersgill R (2000) Crystallization and preliminary X-ray analysis of the auxin receptor ABP1. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography* 56: 1476-1478.
- Woo EJ, Marshall J, Baully J, Napier RM und Pickersgill R W (2002) Crystal structure of auxin-binding protein 1 in complex with auxin. *EMBO Journal* 21: 2877-2885.
- Woodward AW und Bartel B (2005) Auxin: regulation, action, and interaction. *Annals of Botany (London)* 95: 707-735.
- Worley CK, Zenser N, Ramos J, Rouse D, Leyser O, Theologis A und Callis J (2000) Degradation of Aux/IAA proteins is essential for normal auxin signaling. *The Plant Journal* 21: 553-562.
- Yamada, H, Suzuki, T, Terada, K, Takei, K, Ishikawa, K, Miwa, K, Yamashino, T und Mizuno, T (2001) The Arabidopsis AHK4 histidine kinase is a cytokinin-binding receptor that transduces cytokinin signals across the membrane. *Plant Cell Physiology* 42: 1017-1023.
- Yamagami M, Haga K, Napier RM, Iino M (2004) Two distinct signaling pathways participate in auxin-induced swelling of pea epidermal protoplasts. *Plant Physiology* 134: 735-747.
- Yang H, Matsubayashi Y, Nakamura K und Sakagami Y (1999) *Oryza sativa* PSK encodes a precursor of phytosulfokine- α sulfated peptide growth factor found in plants. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* 96: 13560-13565.
- Yang H, Matsubayashi Y, Hanai H und Sakagami Y (2000) Phytosulfokine- α , a peptide growth factor found in higher plants: its structure, functions, precursor and receptors. *Plant Cell Physiology* 41: 825-830.
- Yang H, Matsubayashi Y, Nakamura K und Sakagami Y (2001) Diversity of Arabidopsis genes encoding precursors for phytosulfokine, a peptide growth factor. *Plant Physiology* 127: 842–851.

- Yin Y, Wang ZY, Mora-Garcia S, Li J, Yoshida S, Asami T und Chory J (2002) BES1 accumulates in the nucleus in response to brassinosteroids to regulate gene expression and promote stem elongation. *Cell* 109: 181-191.
- Yin Y, Vafeados D, Tao Y, Yoshida S, Asami T und Chory J (2005) A new class of transcription factors mediates brassinosteroid-regulated gene expression in *Arabidopsis*. *Cell* 120: 249-259.
- Zal, T, Zal, MA, Lotz, C, Goergen, CJ and Gascoigne, NJR (2006) Spectral Shift of Fluorescent Dye FM4-64 Reveals Distinct Microenvironment of Nuclear Enveloping Living Cells *Traffic* 7: 1607.1613.
- Zeevaart JAD und Talon M (1992) Gibberellin mutants in *Arabidopsis thaliana*. In: Karsen CM, van Loon D, Vreugdenhil D, eds. *Progress in plant growth regulation*. Dordrecht, Niederlande, Kluwer Academic Publishers, 34-42.

Abkürzungsverzeichnis

% (v/v)	Volumenprozent
% (w/v)	Gramm Substanz in 100 ml Lösung
ABA	Abscisinsäure
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BASTA	Glufosinatammonium
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
BY-2	bright yellow 2, Tabaksuspensionszellen
C2	diploid
C4	tetraploid
CLSM	Konfokales Laser Scanning Mikroskop
DFC	Druckflusscytometer
dsPSK	unsulfatiertes PSK
FM4-64	N-(3-triethyl-ammoniumpropyl)-4-(p-diethylaminophenylhexatrienyl)-pyridium dibromid
g	einfache Gravitationsbeschleunigung
G	Gesamtfraktion
GA	Gibberellinsäure
GUS	β -Glucuronidase
HRP	Horse-raddish peroxidase
IAA	Indol-3-Essigsäure
IAN	Indol-3-Acetonitril
kDa	kilo Dalton
LB	Medium nach Luria-Bertani
MS	Massenspektrometrie
MSMO	Nährmedium nach Murashige und Skoog, Minimal Organic
NAA	Naphthylessigsäure
NBT	Nitroblau Tetrazolium Chlorid
NPA	1-N-Naphthylphalat
OD	optische Dichte
P ₁₀₀	Pellet nach Zentrifugation mit 100000 g
P ₈	Pellet nach Zentrifugation mit 8000 g
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion

PSK- α	Phytosulfokin- α
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>revolutions per minute</i>)
RT-PCR	Reverse Transkriptase PCR
scFv	<i>single chain fragment</i>
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBS	Tris-Puffer mit Kochsalz (<i>Tris-buffered saline</i>)
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit
Ü	Überstand
Ü ₁₀₀	Überstand vom P ₁₀₀
X-Gluc	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -D-Glucuronsäure

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit „Charakterisierung des Auxin-bindenden Proteins 1“ selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe.

Kiel, den

Renate Dahlke

Danksagung

Als erstes möchte ich Prof. Dr. Margret Sauter für die Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe danken. Durch ihre gute Betreuung, fachliche Beratung und Unterstützung musste ich es nicht bereuen in den weiten Norden gezogen zu sein.

Als zweites möchte ich mich bei Dr. Bianka Steffens, meiner „kleinen Chefin“, bedanken, die mich in die Geheimnisse des ABP1 und den Geheimbund von Origin und ImageJ einführte und mich mit ihrer unvergleichlichen Art für das Thema begeisterte. Danke auch für die Unterstützung in allen Lagen, ein Lachen war immer zu haben.

Ebenso möchte ich der gesamten Arbeitsgruppe „Entwicklungsphysiologie der Pflanzen“ für die Unterstützung und Hilfe jeglicher Art danken, besonders den beiden TAs Michael Motzkus und Timo Staffel, die mir mit Rat und Tat zur Seite standen.

Auch hatte mich meine alte Arbeitsgruppe „über den Dächern von Berlin“ nicht vergessen und schickte mir einige „Care Pakete“. Für die weiterhin herzlichen Verbindung und gedankliche Unterstützung möchte ich mich bedanken.

Auch danke ich der Prof. Dr. Karsten Niehaus und seiner Arbeitsgruppe für die Kooperation bei der Proteinidentifizierung.

Nicht zu vergessen, da so wichtig, danke ich meiner Schwester Kerstin, meinen Eltern und all meinen Freunden, die mir trotz der wenigen Zeit, die ich mit ihnen verbringen konnte, stets verständnis- und liebevoll zur Seite standen. Auch gedankt sei meiner Frühstücksgemeinschaft, die mich nicht nur auf kulinarische Weise versorgte.

Lebenslauf

Name: **Renate Irmgard Dahlke**
Geburtsdatum: 08.06.1976
Geburtsort: Berlin
Staatsangehörigkeit: deutsch

Ausbildung:

1996 Abitur
Lise-Meitner-Schule
Oberstufenzentrum Chemie, Physik und Biologie Gymnasiale Oberstufe,
Berlin

1996-1997 Ausbildung zur Biologisch-technischen Assistentin
Lise-Meitner-Schule
Berufsfachschule, Berlin
Abschluss: Staatlich geprüfte Biologisch-technische Assistentin

1997-2003 Studium der Biologie an der Humboldt-Universität zu Berlin

2003 Diplomarbeit in der Arbeitsgruppe der „Angewandten Botanik“
Thema: Untersuchungen zu Einflußfaktoren der somatischen Embryogenese
bei *Pseudotsuga menziesii* (Carrière)

2004-2007 Promotionsstudium an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

2007 Dissertation in der Arbeitsgruppe „Entwicklungsphysiologie der Pflanze“
Thema: Funktionelle Charakterisierung des Auxin-bindenden Proteins 1

