

Institut für Landwirtschaftliche Botanik

**Die Signaltransduktion über Inositol-1,4,5-*tris*phosphat in Sonnenblumen-
Hypokotylprotoplasten am Beispiel des Schwerkraftreizes**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades
Doktor der Agrarwissenschaften
(Dr. agr.)
der
Hohen Landwirtschaftlichen Fakultät
der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
zu Bonn

vorgelegt
im
Januar 2000
von
Georg Müller
aus Altrich

Referent: Frau Prof. Dr. H. Schnabl

Korreferent: Herr Prof. Dr. H. Goldbach

Tag der mündlichen Prüfung: 27.04.2000

Zusammenfassung

Sonnenblumen-Hypokotylprotoplasten (HCPs) wurden als Model zur Prüfung der Hypothese verwendet, daß das PI-System Bestandteil der schwerkraftinduzierten Signaltransduktion ist. Hierzu wurde der *second messengers* $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$, als ein zentrales Intermediärprodukt der PI-System abhängigen Signaltransduktion quantitativ in HCP-Extrakten analysiert.

Zunächst wurde eine Methode entwickelt, mit der sich vitale Protoplasten schnell und in ausreichender Menge isolieren ließen. Zur Vitalitätsbeurteilung wurde neben den üblichen Vitalitätstests (lichtmikroskopische Beurteilung, FDA-Test), eine weitere Methode etabliert, mit der die Auxin-abhängige Aktivierung der *PM/H⁺-ATPase in vivo* gemessen werden konnte. Diese berücksichtigt auch mögliche Rezeptorschäden an der Plasmamembran und ermöglicht es zudem die Versuchsbedingungen des Protoplasten-Systems zu verbessern.

Mit dem optimierten Protoplasten-System konnte eine konzentrationsabhängige Aktivierung der *PM/H⁺-ATPase* durch Auxin gemessen werden, die sich durch den H^+ -ATPase-Inhibitor DCCD inhibieren ließ. Eine Inhibierung durch den PI-System-Inhibitor Neomycin war unter den gegebenen Bedingungen nicht nachweisbar. Daher ist eine Beteiligung des PI-Systems an der Auxin-abhängigen Aktivierung der *PM/H⁺ATPase* eher unwahrscheinlich. Dennoch ergaben Zeitreihenuntersuchungen quantitative Veränderungen der $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ -Gehalte in Auxin-stimulierten (100 μM) HCPs.

Mit der *mda*-HPLC (metal-dye-detection HPLC) wurde eine Methode zur nicht-radioaktiven Detektion und Quantifizierung von $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ in HCP-Extrakten etabliert. Nach einer erforderlichen Optimierung der Hardware konnte $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ isomerspezifisch und hoch sensitiv (10 pmol) detektiert werden. Die Analysen von HCP-Extrakten mit der alkalischen *mda*-HPLC zeigten einen mit $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ koeluiender Peak, dessen Identität durch drei unabhängige Methoden (3-Phytase-Abbau, UV-Absorption, Rechromatographie) bestätigt wurde.

Experimente mit simulierter Schwerelosigkeit sowie mikro-Gravitation ergaben erste Hinweise, daß HCPs als autonome Einheit Veränderungen des *g*-Vektors wahrnehmen können und stützen somit die Hypothese, daß das PI-System an der Umsetzung des physikalischen Reizes Schwerkraft in ein chemisches Signal beteiligt ist. Ferner konnte gezeigt werden, daß auch eine mechanische Stimulation zu einer Aktivierung des PI-Systems in HCPs führt.

Abstract

Protoplasts of sunflower hypocotyls (HCPs) were used as a model to prove the hypothesis that the PI-System is part of the gravi-induced signal-transduction. Therefore a method had to be developed to isolate a large quantity of vital protoplasts.

To investigate the vitality of the protoplasts a further method beside the classical tests (light- microscopy, FDA-test) has been established, which measures the auxin-dependent activation of the *PM/H⁺-ATPase in vivo*. This method also considers a defective receptor at the plasmamembrane and is a useful tool to optimise the conditions of the protoplast-system.

Using the optimized protoplast-system, a concentration-dependent activation of the *PM/H⁺-ATPase* in response to auxin was observed. The effect could be repressed by the H⁺-ATPase inhibitor DCCD. Since neomycin (an inhibitor of the PI-system) did not inhibit the auxin-dependent activation of the *PM/H⁺-ATPase*, there is no evidence that the PI-System is part of the auxin-induced signal-transduction which leads to an activation of the *PM/H⁺-ATPase*. Nevertheless, auxin (100 µM) also causes time-dependent changes of free Ins(1,4,5)P₃, the main intermediate product of the PI-System dependent signal-transduction, in auxin-stimulated HCPs.

To detect and quantify the *second messenger* Ins(1,4,5)P₃ in HCP-extracts a non-radioactive method called metal-dye-detection HPLC (*mdd*-HPLC) has been established. After optimising the hardware this highly isomer-specific method could detect Ins(1,4,5)P₃ down to 10 pmol. Running HCP-extracts through the alkaline *mdd*-HPLC one peak showed co-elution with Ins(1,4,5)P₃. Three newly developed, independent methods (3-phytase-breakdown, UV-absorption, rechromatography) confirmed the identity.

Experiments with simulated weightlessness and micro-gravity gave first indications that HCPs present autonomous units, which are capable of sensing a changing *g*-vector. Moreover, they enforce the hypothesis that the PI-system is part of the signal-transduction-chain, converting the physical stimulus into a chemical signal. Furthermore it has been shown that a simple mechanical stimulation of HCPs leads to an activation of the PI-system.

Auszüge dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Müller, G. , Hübel, F., Klever, W. and Schnabl, H. (1999): Signal transduction during gravi-response. Proceedings 14th ESA Symposium on European Rocket and Balloon Programmes and Related Research, Potsdam, Germany, 13 May – 3 June 1999, (ESA SP-437, September 1999), 487 - 488

Gliederung

	Seite
1 Einleitung	1
1.1 Gravitropismus	1
1.2 Gravi-Perception	1
1.3 Modulation gravitroper Reaktionen durch Auxin.....	4
1.3.1 Mechanismen und Modulation des polaren Auxintransportes.....	6
1.3.2 Auxin und Zellstreckung.....	7
1.3.3 Auxin und Genexpression	8
1.4 Signaltransduktion über das Phosphoinositid-System	9
1.5 Zielsetzung.....	13
2 Material und Methoden	15
2.1 Pflanzenmaterial und Pflanzenanzucht.....	15
2.2 Protoplastierung der <i>Helianthus annuus</i> Hypokotyle.....	16
2.2.1 Vitalitätsbestimmung der Protoplasten.....	19
2.2.1.1 Vitalfärbung	19
2.2.1.2 Cytoplasmaströmung.....	19
2.3 Messung der <i>in vivo</i> PM/H ⁺ -ATPase Aktivität von HCPs	20
2.3.1 Versuchsaufbau	20
2.3.2 Versuchsdurchführung.....	21
2.3.2.1 Einfluß der Puffer.....	22
2.3.2.2 Einfluß der Auxinkonzentration und des H ⁺ -ATPase-Inhibitors <i>DCCD</i>	22
2.3.2.3 Einfluß des Phosphoinositid-System Inhibitors <i>Neomycin</i>	23
2.4 Extraktion der Inositolphosphate	23
2.4.1 Fixierung der Proben	23
2.4.2 Extraktion der Trichloressigsäure.....	24
2.4.3 Aktivkohlebehandlung.....	24
2.4.3.1 Ansetzen der Aktivkohlesuspension	24
2.4.4 Festphasenextraktion.....	24
2.5 Quantitativer Nachweis der Inositolphosphate	25
2.5.1 Aufbau der <i>mdd</i> -HPLC.....	25
2.5.1.1 Maßnahmen zur Optimierung des verwendeten <i>mdd</i> -HPLC-Systems.....	28
2.5.2 Trennung der Inositolphosphate über die alkalische und saure <i>mdd</i> -HPLC	29
2.5.3 Herstellung der InsP ₆ -Hydrolysate	30
2.5.4 Detektion der Inositolphosphate.....	31
2.6 Qualitativer Nachweis von Ins(1,4,5)P ₃	32
2.6.1 Interne Standardisierung nach saurer <i>mdd</i> -HPLC	32
2.6.2 Rechromatographie der InsP ₃ -Fraktion.....	32
2.6.3 <i>mdd</i> -HPLC und UV-Absorption von HCP-Extrakten	32

2.6.4	3-Phytase Abbau von HCP-Extrakten	33
2.7	Versuche zur Stimulation des pflanzlichen Phosphoinositidsystems in HCPs	34
2.7.1	Stimulation der Protoplasten durch Auxin	34
2.7.2	Mechanische Stimulation von Protoplasten	34
2.7.3	Stimulation von Protoplasten durch simulierte Schwerelosigkeit	35
2.7.4	Hyperg Stimulation von Protoplasten	36
2.7.5	µg-Flugexperiment <i>TEXUS 35</i>	36
3	Ergebnisse	39
3.1	Reinigung und Vitalität der Hypokotylprotoplasten	39
3.2	Einfluß von Auxin auf die <i>PM/H⁺-ATPase</i> in HCP-Suspensionen	41
3.2.1	Einfluß der Pufferzusammensetzung auf die Auxin-abhängige Aktivierbarkeit der <i>PM H⁺-ATPase</i>	41
3.2.2	Wirkung der Auxinkonzentration auf die Aktivität der <i>PM/H⁺-ATPase</i>	42
3.2.3	Wirkung des <i>H⁺-ATPase</i> –Inhibitors DCCD auf die Auxin-abhängige Aktivierbarkeit der <i>PM/H⁺-ATPase</i>	44
3.2.4	Vergleich der Auxin- und Fusicoccin-abhängigen Aktivierbarkeit der <i>PM/H⁺-ATPase</i>	45
3.2.5	Einfluß des Phosphoinositid-System-Inhibitors Neomycin auf die Auxin- abhängige Aktivierung der <i>PM/H⁺-ATPase</i>	46
3.3	Nachweis von Inositolphosphaten	48
3.4	Qualitativer Nachweis von <i>Ins(1,4,5)P₃</i> in HCP-Extrakten.	50
3.4.1	Identifizierung von <i>Ins(1,4,5)P₃</i> über die Retentionszeit und die interne Standardisierung	51
3.4.2	3- Phytase-Abbau von HCP-Extrakten	52
3.4.3	UV/VIS-Analyse von HCP-Extrakten	54
3.4.4	Rechromatographie von HCP-Extrakten	55
3.5	Untersuchungen zur Aktivierung des pflanzlichen Phosphoinositid-Systems	58
3.5.1	Auxin-induzierte Aktivierung des pflanzlichen Phosphoinositid-Systems	58
3.5.2	Aktivierung des pflanzlichen Phosphoinositid-Systems durch mechanische Stimulation.	60
3.6	Einfluß von hyper- und mikro-Gravitation auf das pflanzliche Phosphoinositid-System	63
3.6.1	Simulierte Schwerelosigkeit (schnelldrehender Klinostat)	63
3.6.2	Einfluß von hyperg auf das PI-System	64
3.6.3	Untersuchungen zum Einfluß von mikro-Gravitation auf das Phosphoinositid-System	65
4	Diskussion	67
4.1	Isolation und Vitalität der Hypokotylprotoplasten	67
4.2	Auxin-abhängige Aktivität der <i>in vivo PM/H⁺-ATPase</i>	68
4.3	Inositolphosphat-Analytik	71
4.3.1	Nachweis von Inositolphosphaten über Radiotracer	71
4.3.2	Nachweis von Inositolphosphaten ohne Radiotracer	71
4.4	Nachweis von Inositolphosphaten über die <i>mdd</i> -HPLC	75

4.5	Nachweis von Ins(1,4,5)P ₃ in HCP-Extrakten	75
4.5.1	3-Phytase-Abbau:	76
4.5.2	UV-Detektion.....	77
4.5.3	Rechromatographie	77
4.6	Auxin-abhängige Aktivierung des PI-Systems.....	78
4.7	Einfluß von Änderungen des Schwerkraftvektors und mechanischer Stimulation auf das PI-System	80
5	Zusammenfassung.....	84
6	Literaturverzeichnis.....	86

Abbildungsverzeichnis

	Seite
Abb. 1: Das Phosphoinositid-System.....	10
Abb. 2: Sonnenblumenkeimlinge.....	15
Abb. 3: Sonnenblumen-Hypokotyl Schneidegrät	16
Abb. 4: Hypocotylprotoplasten aus <i>Helianthus annuus</i> nach Zentrifugation (50g, 5 min) im KCl/Saccharose-Stufengradienten.	18
Abb. 5: pH-Meßplatz	21
Abb. 6: Schematische Darstellung der <i>mdd</i> -HPLC , die entweder unter alkalischen oder sauren Bedingungen betrieben wurde.....	27
Abb. 7: Alkalische <i>mdd</i> -HPLC von Inositolphosphat-Standards vor () und nach (----) Optimierung der Standard-HPLC sowie des KCl-Gradienten. (HPLC-System: mikro bore (Biotec/ Kontron); Säule: miniQ PC (Pharmacia)).....	28
Abb. 8: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus zur mechanischen Stimulation von HCP-Suspensionen. Protoplasten wurden in 2 ml Reaktionsgefäßen auf einer vertikalen Kursbahn (Hub: 0,32 m, 0,176 Hz) geschüttelt und zu vorgegebenen Zeitpunkten fixiert.	35
Abb. 9: Nutzlast der <i>TEXUS 35</i> Rakete	38
Abb.10: Licht und Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen zur Reinheit (a und b) und Vitalität (b und c) von HCPs (Nikon Eclipse TE 300 mit Phasenkontrast, 100 fach)	40
Abb. 11: Einfluß der Saccharose- und KCl-Konzentration des Puffers auf die Aktivierbarkeit der <i>PM/H⁺-ATPase</i> durch Auxin (IAA, 100 µM) und Fusicoccin (FC, 10 µM)	42
Abb. 12: Einfluß von Auxin (IAA) auf die <i>in vivo PM/H⁺-ATPase</i> von HCPs. A: Aktivierung der <i>PM/H⁺-ATPase</i> durch IAA (100 µM) zu unterschiedlichen Zeitpunkten im Vergleich zur Kontrolle (8 µl KCl-Meßpuffer II); B. Einfluß unterschiedlicher IAA-Konzentrationen auf die Aktivität der <i>PM/H⁺-ATPase</i> . 43	
Abb. 13: Inhibierung der Auxin (IAA, 100 µM)-induzierten Aktivierung der <i>PM/H⁺-ATPase</i> durch N,N'-Dicyclohexylcarbodiimide (DCCD, 50 µM). --- Kontrolle 1 (IAA 100 µM), ---- Kontrolle 2 (Ethanol, 1 µl), — DCCD (50 µM).....	44
Abb. 14: Stimulation von Protoplastensuspensionen mit Fusicoccin (FC 10 µM, ---), Auxin (IAA 100 µM,---) und Inhibierung der <i>PM/H⁺-ATPase</i> durch N,N'-Dicyclohexylcarbodiimide (DCCD 50 µM,—). Die Protonenabgabe und Pufferkapazität wurde für alle Varianten durch Titration (80 nmol H ⁺) bestimmt.	45
Abb. 15.: Einfluß von Neomycin (NE, 10 und 100 µM) auf die Aktivierbarkeit der <i>PM/H⁺-ATPase</i> von HCPs durch Auxin (IAA, 100 µM).....	46
Abb. 16: Saure <i>mdd</i> HPLC. Auftrennung eines InsP ₆ -Hydrolysates mit dem micro-bore-System (Biotec Kontron, Pump 422).....	48
Abb. 17: Alkalische <i>mdd</i> HPLC. Auftrennung eines InsP ₆ -Hydrolysates mit dem micro-bore-System (Biotec Kontron, Pump 422).....	49
Abb. 18: Alkalische <i>mdd</i> -HPLC von HCP-Extrakten. Unteres Chromatogramm ohne Ins(1,4,5)P ₃ -Standard (—) und oberes Chromatogramm mit Ins(1,4,5)P ₃ (20 pmol) als internem Standard (----).....	51
Abb. 19: Abbau von HCP-Extrakten. HCP-Extrakte wurden mit einer 3-Phytase inkubiert und zu unterschiedlichen Zeitpunkten (A. = 0 min, B. = 10 min, C. = 30 min, D. = 60 min) fixiert und mittels alkalischer <i>mdd</i> -HPLC analysiert.	53

Abb. 20: Zwei-Wellenlängen HPLC-Analyse. A.: Inositolphosphat- und Nukleotid-Standards (Ins(1,4,5)P ₃ , InsP ₆ und ATP) und B.: HCP-Extrakte wurden mit intergrierter UV-Detektion ($\lambda = 254$ nm) und nachgeschalteter Nachsäulenreaktion (metal-dye-detection, $\lambda = 520$ nm) analysiert.	54
Abb. 21: Saure <i>mdd</i> -HPLC eines InsP ₆ -Hydrolysates und HCP-Extraktes sowie Rechromatographie der Fraktion I und alkalische <i>mdd</i> -HPLC eines entsprechend Fraktion I behandelten Ins(1,4,5)P ₃ -Standards..	56
Abb. 22: Alkalische Rechromatographie der Fraktion I und InsP ₃ -Isomere eines InsP ₆ Hydrolysates. A. Rechromatographie ohne (----) und mit (—) Ins(1,4,5)P ₃ als internem Standard. B. Rechromatographie (----) und InsP ₃ -Isomere (—).	57
Abb.23: Alkalische <i>mdd</i> .HPLC von Auxin (100 μ M) stimulierten (oberes Chromatogramm) und unstimulierten HCPs (Kontrolle, unteres Chromatogramm).....	58
Abb. 24: Ins(1,4,5)P ₃ -Gehalte in HCPs nach Auxin-Stimulation (100 μ M), die zu unterschied-lichen Zeitpunkten fixiert wurden (15s, 30s, 60s; n = 3, \pm sd).	59
Abb. 25: Alkalische <i>mdd</i> -HPLC von HCP-Extrakten.....	61
Abb. 26: Einfluß mechanischer Stimulation auf die Ins(1,4,5)P ₃ -Gehalte (\pm sd) in HCPs.....	62
Abb. 27: Einfluß simulierter Schwereelosigkeit (schnelldrehender Klinostat) auf die Ins(1,4,5)P ₃ -Gehalte in HCPs (Küvettdurchmesser: 2mm; Rotation: 60 U/min, n = 3, \pm sd).	63
Abb. 28: Ins(1,4,5)P ₃ -Gehalte in HCPs nach hyperg-Stimulation (n= 4, \pm sd)64	
Abb. 29: Ins(1,4,5)P ₃ -Gehalte von HCPs des μ g-Flugexperimentes <i>TEXUS 35</i> . Während des Fluges wurden die Proben unterschiedlichen g-Leveln ausgesetzt (1g, 8g, μ g, 13g) und fixiert. Die Ergebnisse wurden mittels ANOVA analysiert. Signifikante Unterschiede (n=4, $\alpha = 5$ %) sind mit unterschiedlichen Buchstaben markiert.....	65
Abb. 30: Inositolphosphat-Analytik.....	72

Abkürzungsverzeichnis

CE	= Kapillarzonenelektrophorese
DAG	= Dialacetylgerin
DCCD	= N,N'-Dicyclohexylcarbodiimide
FC	= Fusicoccin
GC	= Gaschromatograph
GCP	= Schließzellprotoplast
HCP	= Hypokotylprotoplast
IAA	= Indol-3-Essigsäure
Ins(1,4,5)P ₃	= D <i>myo</i> inositol-1,4,5-trisphosphat
InsP ₃	= D <i>myo</i> inositoltrisphosphat
InsP ₄	= D <i>myo</i> inositoltetakisphosphat
InsP ₅	= D <i>myo</i> inositopentakisphosphat
InsP ₆	= D <i>myo</i> inositol-1,2,3,4,5,6-hexakisphosphat
mdd-HPLC	= metal-dye-detection HPLC
NE	= Neomycin
PAR	= 4-2-Pyridylazoresorzinol
PI	= Phosphatidylinositol
PIP	= Phosphatidylinositol-4-phosphat
PIP ₂	= Phosphatidylinositol-4,5-phosphat
PI-System	= Phosphatidylinositolphosphat-System
PM/H ⁺ -ATPase	= Plasmamembran/H ⁺ -ATPase
µg	= mikro Gravitation

1 Einleitung

1.1 Gravitropismus

Höhere Pflanzen reagieren auf Umweltreize (Licht, Wasser, Schwerkraft, etc...) mit einem gerichteten Wachstum. Dieses gerichtete Wachstum wird allgemein als Tropismus bezeichnet (Poff et al., 1994). Tropismen bestimmen das Wachstum und die Orientierung des Kormus und sichern somit das Überleben der Pflanze in der unbelebten Umwelt (Sack, 1991). Ein an der Schwerkraft orientiertes Wachstum (Gravitropismus) zeigen vor allem die Hauptwurzeln sowie die Hauptsprosse. So können Pflanzenwurzeln, die positiv gravitrop reagieren, den Bodenraum erschließen und vorhandene Ressourcen (Wasser, Nährstoffe) nutzen. Im Gegensatz dazu reagiert der Sproß negativ gravitrop. Bereits kurz nach der Keimung wird er so sicher zur Erdoberfläche und zum Licht geführt. Letzteres bestimmt dann im Zusammenhang mit der Schwerkraft die Orientierung des Sprosses im Raum. Doch obwohl Thomas Knight schon 1806 mit seinen Experimenten das Phänomen der abwärtswachsenden Wurzeln und aufwärtswachsenden Sprosse der Wahrnehmung von Gravitation zuordnen konnte, sind die beteiligten Mechanismen nach wie vor weitgehend ungeklärt.

Sack (1991) unterteilt den Prozeß gravitroper Reaktionen in drei Phasen. Während der ersten Phase wird die Lage in Bezug zum Schwerkraftvektor wahrgenommen (Gravi-Perception) und es findet die Umsetzung des physikalischen Reizes Schwerkraft in einen physiologischen Gradienten statt. Dieser Gradient wird in Phase 2 vom Ort der Wahrnehmung zum Ort der Reaktion verlagert, wo es in Phase 3 zu einer Modulation von Wachstum auf Organ- bzw. Zellebene kommt.

1.2 Gravi-Perception

Die bisher vorgeschlagenen Komponenten, die der Schwerkraftwahrnehmung in Pflanzen dienen, können nach Sack (1991) in 5 Kategorien unterteilt werden:

- Statolithen; sedimentierende, intrazelluläre Partikel
- nicht-sedimentierende intrazelluläre Partikel, die ziehen, dehnen oder drücken
- intrazelluläre Partikel, die aufsteigen
- der ganze Protoplast (Czapek; *in* Wayne et al., 1990)
- extrazelluläre Komponenten an der Plasmamembran

Dehnecke konnte 1880 die Existenz sedimentierender Stärkekörner in Pflanzenzellen nachweisen. Nemeč (1900) sowie Haberland (1900) gelang es schließlich eine Korrelation zwischen der Sedimentation der Stärkekörner und gravitropen Reaktionen nachzuweisen. Sie formulierten die Hypothese, daß die Schwerkraftwahrnehmung mit dem Sedimentieren der Amyloplasten beginnt. Sedimentierende Amyloplasten finden sich allerdings nur in spezialisierten Zellen in der Wurzelspitze (Columella-Zellen) (Sack und Kiss, 1989; Sievers und Braun, 1996) und in der Stärkescheide des Sprosses, wobei sie hier primär auf die Streckungszone beschränkt sind (Sack, 1987). Über die Sedimentation der Amyloplasten und deren Auflagerung auf eine sensitive Oberfläche (Rezeptor) soll eine Umsetzung des Reizes Schwerkraft in einen physiologischen Gradienten erfolgen. Die als *Stärke-Statolithen Theorie* bezeichnete Hypothese wird heute als Erklärungsansatz akzeptiert, konnte aber bisher nicht schlüssig bewiesen werden (Audus, 1962; Barlow, 1995; Sack, 1997; Sievers et al., 1991).

Stark angezweifelt wurde die Stärke-Statolithen Theorie von Pickard (1971) und Thimann (Pickard und Thimann, 1966), nachdem sie nachweisen konnten, daß Weizenkoleoptilen nach experimentell erhaltener Stärkelosigkeit weiterhin gravitrop reagieren. Eine Wiederholung der Versuche zeigte jedoch, daß nach den entsprechenden Protokollen in den Zellen um die vaskulären Bündel weiterhin geringe Mengen an Stärke erhalten bleiben. Auch andere Experimente, die in diesem Zusammenhang durchgeführt wurden, stützten eher die Stärke-Statolithen Theorie (*in*: Volkmann und Sievers, 1979).

Neue Impulse ergaben sich, nachdem stärkearme und stärkefreie Mutanten gefunden wurden, deren Wurzeln jedoch gravitrop reagieren (stärkefrei: Caspar and Pickard, 1989; stärkearm: Hanson und McHale, 1988; Kiss und Sack, 1989; Kiss et al., 1996). Untersuchungen mit diesen Mutanten zeigten, daß der Zeitverlauf der Krümmungsreaktion mit dem Gehalt an Stärke in den Columella-Zellen streng korreliert, wobei die *Arabidopsis* Mutante ACG 27 mit einem Stärkegehalt von 60 % in ihrer Krümmungsreaktion keine Unterschiede im Vergleich zum Wildtyp mehr zeigt (Kiss et al., 1996). Sack (1991) schließt aus den Untersuchungen mit stärkearmen Mutanten, daß erstens der Sensor zur Schwerkraftwahrnehmung sensitiver als notwendig ausgebildet ist und zweitens in der Lage ist, Informationen zu integrieren. Die dem Stärke-Statolithen-Modell zugrundeliegenden experimentellen Daten sind jedoch primär

korrelativer Natur, da der postulierte Schwerkraftrezeptor bisher nicht identifiziert werden konnte.

Zu den Organellen, die neben den Amyloplasten potentiell der Schwerkraftwahrnehmung dienen können und deren Lage innerhalb der Zelle nicht durch Sedimentation bestimmt wird, zählen z. B. der Zellkern und die eine geringe spezifische Dichte besitzenden Spherosomen. Jedoch konnte für keine dieser Komponenten bisher eine eindeutige Korrelation zwischen der Richtung des Schwerkraftvektors und der Lage der Organellen innerhalb der Zelle nachgewiesen werden (*in*: Sack, 1991). Auch haben diese Komponenten nach Berechnungen von Björkmann (1988) nicht genügend Potentialenergie, um gegen das Hintergrundrauschen - verursacht durch die Cytoplasmaströmung - als Schwerkraftsensor zu fungieren.

Bisher liegen nur für die zu den niederen Pflanzen zählenden *Euglenen* und *Chara* Internodialzellen Hinweise vor, die vermuten lassen, daß hier über die Masse des Protoplasten Schwerkraft wahrgenommen wird. In *Euglenen* werden wahrscheinlich über die Masse des Protoplasten *stretch*-sensitive Ionenkanäle der Plasmamembran reguliert, die bei verändertem *g*-Vektor für eine Reorientierung der *Euglenen* verantwortlich sind (Häder 1997; Häder et al., 1995; Lebert und Häder, 1996). Auch in *Chara* Internodialzellen ist möglicherweise die Masse des Protoplasten für die gravi-Perception von Bedeutung. Hier scheinen allerdings in Abhängigkeit des *g*-Vektors Bestandteile der Plasmamembran die Cytoplasmaströmung zu beeinflussen (Staves, 1997; Staves et al., 1997; Staves et al., 1995; Wayne und Staves, 1996).

Untersuchungen von Staves et al., (1997) sowie Wayne und Staves, (1996) an *Chara* Internodialzellen zeigen, daß möglicherweise auch Elemente der extrazellulären Matrix an der gravi-Perception beteiligt sind. Sie vermuten, daß über integrale Rezeptoren der Plasmamembran (*Integrine*), die eine Verbindung der extrazellulären Matrix zum Zellinneren herstellen, der physikalische Reiz Schwerkraft an der Zelloberfläche wahrgenommen wird und im Zellinneren bisher unbekannt Signaltransduktions-Prozesse auslöst. Für die hier als Gravi-/Mechanorezeptoren postulierten *Integrine* konnte an tierischen Zellen eine Beteiligung an Signaltransduktions-Prozessen bei mechanischem Stress nachgewiesen werden (Ingber, 1999; Clark und Brugge, 1995; Richardson und Parson, 1995; Wang, 1993). Mittlerweile konnten *Integrin*-ähnliche

Proteine auch in bei *Arabidopsis* und *Chara* nachgewiesen werden (Katembe et al., 1997).

1.3 Modulation gravitroper Reaktionen durch Auxin

Bereits im ersten Drittel dieses Jahrhunderts konnten Cholodny (1927) und Went (1928) unabhängig voneinander einen Zusammenhang zwischen Phototropismus und der polaren Verteilung eines bis dahin unbekanntes Wachstumsstoffes nachweisen. In einem ähnlichen Versuchsansatz mit Maiskoleoptilen zeigte Dolk (1936), daß auch gravitrope Reaktionen mit der polaren Verteilung eines Wachstumsstoffes verbunden sind, der später als Indol-3-Essigsäure (Auxin) identifiziert werden konnte. Die Hypothese, daß die asymmetrische Verteilung von Auxin an der Modulation gravitroper Reaktionen beteiligt ist (Cholodny-Went Theorie), konnte mittlerweile durch zahlreiche Studien gestützt werden.

So konnte nachgewiesen werden, daß asymmetrisch appliziertes Auxin sowohl bei Wurzeln als auch im Sproß zu einem differenziellen Flankenwachstum führt und damit eine Krümmung des Organs bewirkt (Gougler und Evans, 1981; Migliaccio und Rayle, 1989). Hingegen werden durch Auxin-Transportinhibitoren gravitrope Reaktionen inhibiert (Thomson and Leopold, 1974; Schneider, 1969). Weiterhin konnte über radioaktiv markiertes Auxin nachgewiesen werden, daß im Verlauf der gravitropen Reaktion Auxin in der unteren Organseite von Wurzeln und Spross akkumuliert (Harrison und Pickard, 1989; Young et al., 1990). Über die asymmetrische Verteilung von Auxin soll es auch zu einer differenziellen Genexpression kommen (McClure und Guilfoyle, 1989).

Obwohl es damit sehr starke Hinweise für eine Modulation gravitroper Reaktionen durch Auxin gibt, wurde die Idee, daß Auxin der primäre *messenger* (Botenstoff) gravitroper Reaktionen ist, immer wieder angezweifelt. So wurde als Kritikpunkt angeführt, daß die erforderliche Magnitude und/oder Kinetik der Auxin-Asymmetrie nicht ausreichen, um das beobachtete differenzielle Längenwachstum zu bewirken (Firn und Digby, 1980; Evans, 1991). An transgenem Tabak konnten Li et al. (1991) über eine gekoppelte Sequenz aus *small auxin up RNAs* (SAUR) Promotor- β - Glucoronidase (GUS)-Sequenz jedoch *in situ* zeigen, daß zumindest in Tabaksprossen in der Organunterseite während

gravitroper Reaktionen Auxin ausreichend akkumuliert, um ein differenzielles Flankenwachstum zu bewirken. Auch konnten sie zeigen, daß die polare Verteilung von Auxin gut mit der Krümmung des Organs korreliert. Damit bildet die asymmetrische Verteilung von Auxin möglicherweise jenen physiologischen Gradienten, über den die erforderliche Signalweiterleitung vom Ort der Wahrnehmung zum Ort der Reaktion erfolgt (Evans und Ishikawa, 1997).

Zumindest in Wurzeln scheint allerdings die erste Phase einer gravitropen Reorientierung unabhängig von Auxin zu erfolgen (Ishikawa und Evans, 1993). Mit zeitlich hoch auflösenden Videoanalysen konnten Ishikawa und Evans (1993) dokumentieren, daß sich nach Gravistimulation zunächst die Zellen der DEZ (Distale Elongation Zone) an der Organoberseite rasch strecken, was eine erste Krümmung der Wurzelspitze bewirkt. Anschließend wird die Zellstreckung an der Organunterseite des CEZ (Centrale Elongation Zone) inhibiert, wobei sich die Zellen der Organoberseite unvermindert weiter strecken, was schließlich eine vollständige Reorientierung des Organs entsprechend des g -Vektors zur Folge hat. Damit steht diese Phase der Reorientierung im Einklang mit der Hypothese, daß über die polare Verteilung von Auxin in Wurzeln eine, die Zellstreckung inhibierende Konzentration an Auxin in der Organ-unterseite erreicht wird. Weiterhin konnten Ishikawa und Evans (1993) allerdings zeigen, daß exogen appliziertes Auxin, das eine vollständige Inhibierung der Zellstreckung bewirkte, die Streckungsreaktion der Zellen des DEZ nach Gravistimulation nicht beeinflusste. Sie folgerten aus den Ergebnissen, daß die erste Phase gravitroper Reaktionen bei Wurzeln Auxin-unabhängig erfolgt.

Weitere Untersuchungen deuten darauf hin, daß Gravistimulation zur Etablierung eines apoplastischen Ca^{2+} -Gradienten in der Wurzelspitze führt (Lee et al., 1984; Björkman und Cleland, 1991) und Ca^{2+} -Chelatoren gravitrope Reaktionen in Wurzeln vollständig inhibieren. Auch konnten diese Autoren zeigen, daß asymmetrisch appliziertes Ca^{2+} eine Krümmungsreaktion auslöst. Möglicherweise wird über apoplastisches Ca^{2+} die Sensitivität von Wurzelzellen gegenüber Auxin beeinflusst. Allerdings scheint auch der Aufbau des Ca^{2+} -Gradienten von einem aktiven Auxintransport abhängig zu sein (Lee et al., 1984; Björkman und Cleland, 1991). Dies läßt vermuten, daß dem Auxin in Wurzeln während der frühen Phase gravitroper Reaktionen eine von der Wachstumsregulierung unabhängige Funktion zukommt (Chen et al., 1999).

1.3.1 Mechanismen und Modulation des polaren Auxintransportes

In der Regel wird Auxin im Phloem aus der Triebspitze und jungen Blättern bis in die Wurzelspitze transportiert (Ziegler, 1998). Dieser Transport ist unipolar und rein von den source/sink-Verhältnissen in der Pflanze abhängig. Demgegenüber wurde für den polaren Transport ein chemiosmotisches Modell postuliert (Goldsmith, 1977), nach dem über spezifische Influx- und Efflux-Carrier der Plasmamembran (Cen et al., 1999) Auxin einem chemiosmotischen Gradienten folgend verlagert wird. Hierbei wird Auxin über einen Influx-Carrier in der Säureform (protoniert) aufgenommen. Im Cytosol liegt es aufgrund des hohen pH-Wertes in der dissoziierten Form vor und kann so gegenüber dem Apoplasten um den Faktor 20 angereichert werden (Jones, 1998). Die Validität des chemiosmotischen Modells konnte erst in jüngster Zeit bestätigt werden, als in *Arabidopsis* das AUX 1 Gen identifiziert wurde, das für einen postulierten Auxin-Influx-Carrier in der Wurzel zu kodieren scheint (Yamamoto und Yamamoto, 1998; Bennett et al., 1996). Mutationen dieses Gens führen zu verminderter Sensitivität gegenüber Auxin und die Wurzeln sind agravitrop. Ein weiteres Indiz dafür, daß die asymmetrische Verteilung von Auxin an der Regulation von gravitropen Reaktionen beteiligt ist.

Wie die Modulation des polaren Auxintransportes während gravitroper Reaktionen erfolgt ist allerdings weitgehend unbekannt. Möglicherweise hat aber schon die Verteilung der Efflux-Carrier einen wesentlichen Einfluß auf die Etablierung des Auxingradienten (Chen et al., 1999). So zeigen Studien von Lomax et al. (1995) und Bennett et al. (1996), daß der funktionale Efflux-Carrier primär in den Basal-Membranen von Zellen zu finden ist. Auch für den AGR1/EIR1/PIN2-locus, der in *Arabidopsis* für eine Komponente eines Auxin-Efflux-Carriers kodiert und primär in Wurzeln exprimiert wird (Chen et al., 1999; Müller et al., 1998; Sedbrook et al., 1998; Utsuno et al., 1998), konnte nachgewiesen werden, daß das AGR1/EIR1/PIN2-Protein in den Basal-Membranen der Zellen des DEZ und CEZ lokalisiert ist (Müller et al., 1998). Allerdings soll die Etablierung des Auxingradienten von den Statolithen enthaltenden Zellen ausgehen (Chen et al., 1999). Dies sind im Sproß die Zellen der Stärkescheide und in den Wurzeln die Amyloplasten enthaltenden Zellen der Wurzelspitze. Weder das AUX1- noch das AGR1/EIR1/PIN2-Gen werden jedoch in der Wurzelspitze exprimiert, was

vermuten läßt, daß weitere bisher unbekannte Gen-Produkte an der Etablierung des Auxingradienten beteiligt sind (Chen et al., 1999).

Neben der Verteilung der Efflux-Carrier trägt wahrscheinlich aber auch deren Aktivität im Zuge gravitroper Reaktionen zur polaren Verteilung von Auxin bei, wobei die Regulationsmechanismen bisher unklar sind (Chen et al., 1999). Möglicherweise ist hier der in Wurzeln und Sprossen nach Gravistimulation nachgewiesene Ca^{2+} -Gradient (Arslan-Cerim, 1966; Goswami und Audus, 1976; Lee und Evans, 1985; Björkman und Cleland, 1991) von Bedeutung.

1.3.2 Auxin und Zellstreckung

Die im Zuge gravitroper Reaktionen zu beobachtende Krümmungsreaktion der Organe erfolgt im Sproß über eine Auxin-induzierte Zellstreckung an der Organunterseite. In Pflanzenzellen wirkt allerdings die Zellwand einer Zellstreckung entgegen, so daß eine Auxin-induzierte Zellstreckung mit Prozessen verbunden sein muß, die die Elastizität der Zellwand erhöhen (Rayle und Cleland, 1992; Cosgrove, 1997). Da Auxin nicht direkt Zellwandverbindungen beeinflusst, sondern die Wirkung an der Plasmamembran ansetzt, setzt die Auxin-induzierte Zellstreckung eine Kommunikation zwischen Protoplast und Zellwand voraus (Rayle und Cleland, 1992).

Nachdem gezeigt werden konnte, daß Auxin den Transport von Protonen aus dem Cytosol in den Apoplasten aktiviert und die Applikation von Säure (H^+) eine Zellstreckung bewirkt, wurden Protonen als der zellwandlösende Faktor postuliert (Acid Growth Theory; Hager et al., 1971; Rayle, 1973; Rayle und Cleland, 1970, Rayle und Cleland, 1977). Zwischenzeitlich konnte bestätigt werden, daß Auxin eine H^+ -ATPase der Plasmamembran aktiviert (Jahn et al., 1996). Auxin scheint aber nicht für eine *de novo* Synthese der PM/H^+ -ATPase verantwortlich zu sein (Jahn et al., 1996). Es ist hingegen wahrscheinlich, daß die Aktivierung der PM/H^+ -ATPase über einen Plasmamembran-ständigen Auxinrezeptor unter Beteiligung der Phospholipase A_2 erfolgt (Scherer und Arnold, 1997; Scherer, 1995; Yi et al., 1996; Löbler und Klämbt, 1985; Libbenga und Mennes, 1995).

Weiterhin konnte bei *in vitro* Experimenten gezeigt werden, daß sich Zellwände aus wachsendem Gewebe in Abhängigkeit des pH-Wertes dehnen (Rayle und Cleland, 1972; Cleland et al. 1987; Cosgrove, 1989). Diese Dehnung zeigt jedoch keine strenge Korrelation zum pH-Wert. Erstaunlicherweise inhibieren sehr niedrige pH-Werte eine Säure-induzierte Zellwanddehnung (Cosgrove, 1997). Da bei diesen pH-Werten Proteine denaturieren, wurde aus den Beobachtungen gefolgert, daß an den zellwandlösenden Prozessen zellwandgebundene Proteine (Expansine) beteiligt sind, deren Aktivität über den pH-Wert reguliert wird (McQueen-Mason et al., 1992). *In vivo* Aktivität von Expansinen konnte bisher sowohl an monokotylen als auch dikotylen Pflanzen nachgewiesen werden (Cosgrove und Li, 1993; Li et al., 1993; Keller und Cosgrove, 1995). Die Expansine stellen damit eine Gruppe von Proteinen dar, die möglicherweise den Auxin induzierten pH-Wert-Gradienten während gravitroper Reaktionen in ein differenzielles Flankenwachstum umsetzen (Cosgrove, 1997).

1.3.3 Auxin und Genexpression

Bisher konnten zwar zahlreiche Auxin-bindende Proteine identifiziert und charakterisiert werden (Napier und Venis, 1995). Ob diese Proteine aber tatsächlich als Auxinrezeptoren in einer Signaltransduktionskette fungieren, die eine Auxin-abhängige Genexpression reguliert, ist nicht bekannt (Guilfoyle et al., 1998). Zahlreiche Studien belegen jedoch, daß Auxin die Expression spezieller Gene in verschiedenen Organen und Geweben reguliert, wobei die molekularen Mechanismen der Auxin-Wirkung weitgehend unbekannt sind (Guilfoyle et al., 1998; Abel und Theologis, 1996). Im Zusammenhang mit gravitropen Reaktionen konnte eine Beteiligung der Auxin-abhängigen Gene AXR1 und AXR3 gezeigt werden (Chen et al., 1999; del-Pozo et al., 1998; Leyser et al., 1996; Rowse et al., 1998). Bisher konnte jedoch noch kein direkter Zusammenhang zwischen Genexpression und differenzieller Wachstumsregulation gezeigt werden (Abel und Theologis, 1996).

1.4 Signaltransduktion über das Phosphoinositid-System

Die Signaltransduktion beinhaltet, daß die auf die belebte Umwelt einwirkenden Stimuli/Reize (Signal(e)) über spezielle Rezeptoren von den Zellen wahrgenommen werden (Signal-Perception), die physiologische Prozesse regulieren (Signaltransduktion), was schließlich zu einer Adaption an die neuen Umweltbedingungen führt. Signale können auch als Botenstoffe (*first-messenger*) vom Ort der Wahrnehmung verlagert werden. Am Ort der Reaktion findet dann über sekundäre Botenstoffe (*second messenger*) die Umsetzung des Signals in eine physiologische Reaktion statt.

Im Gegensatz zur Zoologie schien noch vor 20 Jahren das Wort *transduktion* für die Botanik keine Bedeutung zu besitzen. Forciert durch den Nachweis von Proteinkinasen in Pflanzen (Trewavas, 1976), die Isolation von Calmodulin aus Pflanzenzellen (Anderson und Cormier, 1978) und der Nachweis Ca^{2+} -abhängiger Proteinkinasen (Hetherington und Trewavas, 1982) beinhalten heute auch im Bereich der Botanik die meisten Forschungsprojekte Aspekte der Signaltransduktion (Trewavas und Malhó, 1997).

In tierischen Zellen intensiv untersucht ist die Signaltransduktion über das Phosphoinositid-System (PI-System, Abb. 1), das seit Beginn der 50er Jahre einen Forschungsschwerpunkt bildete und heute sehr gut charakterisiert ist (Berridge, 1993; Tsunoda, 1993; Tkachuk, 1998): Ausgehend vom Phosphatidylinositol (PI), das als Strukturlipid Bestandteil aller biologischen Membranen ist, erfolgt im Bereich der Plasmamembran in zwei Schritten die Phosphorylierung des Inositolrestes in der 4- und 5-Stellung durch spezifische PI-4- und PI-5-Kinasen. Das resultierende Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2) ist das Substrat der plasmamembranständigen Phospholipase C (PLC). Diese wird als Reaktion auf spezielle, von außen einwirkende Signale durch Rezeptoren der Plasmamembran aktiviert, wobei bisher eine Aktivierung durch Tyrosinkinaserzeptoren sowie Rezeptoren, die trimere G-Proteine aktivieren, nachgewiesen ist. Aus der enzymatischen Hydrolyse des PIP_2 durch die PLC gehen als Reaktionsprodukte die beiden *second messenger* Inositol(1,4,5) P_3 und Diacetylglycerin (DAG) hervor. Das in der Plasmamembran verblei-

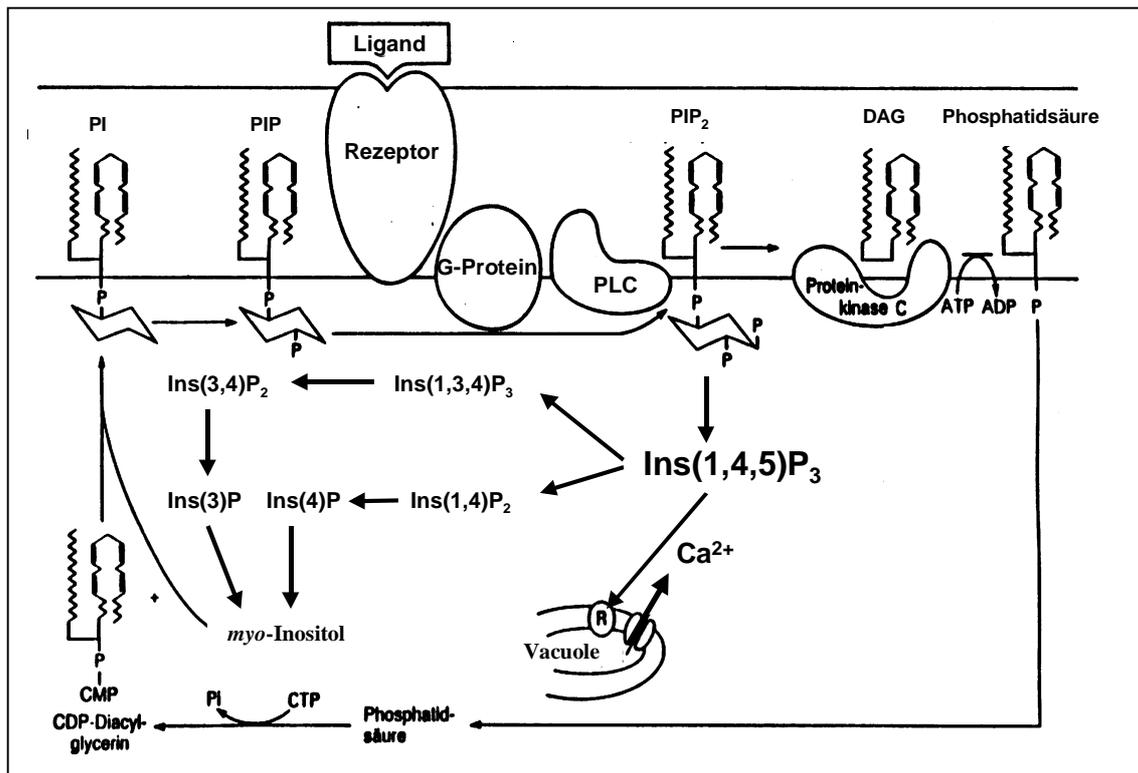


Abb. 1: Das Phosphoinositid-System

(PI= Phosphatidylinositol, PIP= Phosphatidylinositol-4-phosphat, PIP₂= Phosphatidylinositol-4,5-phosphat, DAG= Diacylglycerin)

bende lipophile DAG moduliert die Aktivität der Proteinkinase C, während das hydrophile Ins(1,4,5)P₃ ins Cytoplasma diffundiert. Mittlerweile konnte nachgewiesen werden, daß Ins(1,4,5)P₃ an Rezeptoren des endoplasmatischen Retikulums bindet, die die Aktivität von Ca²⁺-Kanälen regulieren. Ein Ins(1,4,5)P₃ induziertes Öffnen der Kanäle führt zu einem raschen und deutlichen Anstieg der cytosolischen Ca²⁺-Konzentration (Ferris und Snyder, 1992; Zhang, et al.; 1995; Yoshida und Imai, 1997), wodurch Zielproteine entweder direkt oder aber über Ca²⁺-bindende Proteine (z.B. Calmodulin) beeinflusst werden (Berridge, 1993; Tsunoda, 1993; Tkachuk, 1998).

Ausgehend vom Nachweis von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat durch Boss und Massel (1985) in Pflanzen konnten in der Folgezeit nahezu alle Komponenten des PI-Systems auch in Pflanzen nachgewiesen werden:

Rezeptor: Ein G-Protein gekoppelter Rezeptor (GPCR) der Plasmamembran konnte bisher nicht direkt identifiziert werden. Untersuchungen an Tabakpflanzen, die mit bekannten tierischen GPCRs transformiert wurden, ergaben, daß die entsprechenden Gene zwar exprimiert wurden, eine Stimulation von G-Proteinen jedoch nicht nachzuweisen war (Mu et al., 1997). Diese Experimente sprechen dafür, daß G-Proteine in Pflanzen über Rezeptoren reguliert werden, die nicht die für tierische Rezeptoren typische Struktur aufweisen. In *Arabidopsis* wurden allerdings mittlerweile das GCR1-Gen und die cDNA isoliert, die für ein Protein kodiert, welches bezüglich der Aminosäure-Sequenz eine große Ähnlichkeit mit bekannten GPCRs aufweist (Josefsson und Rask, 1997; Hooley, 1998; Plakidou-Dymock et al., 1998).

Phosphoinositide: Sowohl Phosphatidylinositol-4-phosphat (PIP) und Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) als auch die zugehörige Kinaseaktivität konnten in Pflanzen nachgewiesen werden (Sommarian und Sandelius, 1988; Kamada und Muto, 1991; Hannenberg et al., 1995; Yang et al., 1993; Okpodu et al., 1995). Beide Verbindungen scheinen neben der Funktion als Substrat auch direkte regulierende Funktionen zu übernehmen. So konnten Memon und Boss (1990) an isolierten Plasmamembranen aus *Helianthus annuus* eine PIP- und PIP₂-abhängige Aktivität der *PM/H⁺-ATPase* nachweisen. Die Regulation der PIP 5-Kinaseaktivität erfolgt möglicherweise auch durch äußere Reize. So konnten Perrera et al. (1999) an Maisknollen eine Aktivitätssteigerung nach Gravistimulation nachweisen.

G-Proteine: Biochemische und immunologische Untersuchungen ergaben erste Hinweise, daß Pflanzen auch über trimere G-Proteine verfügen. So konnte an einer Vielzahl von Pflanzenspezies gezeigt werden, daß Microsomen- und Plasmamembranen ($\alpha^{32}\text{P}$)GTP- und (^{35}S)GTP- γ -S mit hoher Affinität binden und Peptide enthalten, die mit Antikörpern gegen die G $_{\alpha}$ - bzw. G $_{\beta}$ -Untereinheit kreuzreagieren (*in*: Ma, 1994). Die Ergebnisse konnten auch durch molekularbiologische Untersuchungen gestützt werden. So konnten cDNA Clone isoliert werden, die für G $_{\alpha}$ - und G $_{\beta}$ -Untereinheiten kodieren (Ma et al., 1990, 1991; Poulsen et

al., 1994; Weiss et al., 1994; Kim et al., 1995; Ishikawa et al., 1995; Seo et al., 1995). Gene, die für eine G_γ -Untereinheit kodieren, wurden bisher allerdings in Pflanzen noch nicht nachgewiesen (Hooley, 1998).

Phospholipase C: Phospholipase C-Aktivität konnte mittlerweile in zahlreichen Pflanzenspezies nachgewiesen werden (Sandelius und Sommarin, 1990 als Übersichtsartikel). PLCs konnten auch bereits zum Teil sequenziert werden (Shi et al., 1995; Williams und Katan, 1996; Hirayama et al., 1997). Phosphatidylinositol ist das bevorzugte Substrat einer löslichen PLC die millimolare Ca^{2+} -Konzentrationen benötigt (Helsper et al., 1986, 1987; Pfaffmann et al., 1987). Demgegenüber erreicht eine plasmamembrangebundene PLC, die spezifisch Phosphatidylinositol-4-phosphat und Phosphatidylinositol-4,5-phosphat hydrolysiert, ihre volle Aktivität bei mikromolaren Ca^{2+} -Konzentrationen. Eine G-Protein-abhängige Aktivierung der PLC konnte bisher nicht direkt nachgewiesen werden. Allerdings gelang Cho et al. (1995) der Nachweis einer PI-System Aktivierung in *Daucus carota* Zellen durch den G-Proteinaktivator Mastoparan und Einspahr et al. (1989) konnten eine GTP-abhängige Aktivität der PLC in der Alge *Dunaliella salina* nachweisen.

Ins(1,4,5)P₃: Auch $Ins(1,4,5)P_3$ als das zentrale Intermediärprodukt der PI-System-abhängigen Signaltransduktion konnte mittlerweile in Pflanzen identifiziert werden (Huang et al, 1994; Martinoia et al., 1993; Memon et al., 1989). Die $Ins(1,4,5)P_3$ -induzierte Freisetzung von Ca^{2+} konnte für Pflanzen an Membranvesikeln (Brosnan und Sanders, 1990; Canut et al., 1993; Lommel und Felle, 1997) und isolierten Vakuolen (Drobak und Ferguson, 1985; Alexandre et al., 1990; Allen et al., 1995; Lommel und Felle, 1997) nachgewiesen werden. Die bisherigen Untersuchungen lassen vermuten, daß der $Ins(1,4,5)P_3$ -Rezeptor bei Pflanzen am Tonoplasten lokalisiert ist und nicht, wie in tierischen Zellen, im ER (Webb, 1996). Hinsichtlich der Kinetik der $Ins(1,4,5)P_3$ -induzierten Ca^{2+} -Freisetzung zeigen tierische und pflanzliche Zellen große Übereinstimmungen (Alexandre und Lassalles, 1992; Scanlon et al., 1996). Im Unterschied zu tierischen Zellen wird aber die $Ins(1,4,5)P_3$ -sensitive Ca^{2+} -Freisetzung scheinbar nicht durch hohe extravakuoläre Ca^{2+} -Konzentrationen inhibiert (Webb, 1996; Alexandre et al., 1990).

Der Ins(1,4,5)P₃-Rezeptor konnte in Pflanzen bisher nicht eindeutig nachgewiesen werden. Allerdings gelang Brosnan und Sanders (1993) sowie Scanlon et al. (1996) der Nachweis eines Proteins in *Beta vulgaris* und *Chenopodium rubrum* das Ins(1,4,5)P₃ mit einer ähnlichen Kinetik bindet wie tierische Ins(1,4,5)P₃-Rezeptoren. Weiterhin konnten Biswas et al. (1995) ein Protein reinigen, das Ins(1,4,5)P₃-abhängig Ca²⁺ aus artifiziellen Vesikeln freisetzte. Schließlich konnten Cramer et al. (1998) zwei Proteine in *Vicia faba* Mikrosomen und Vakuolen sowie *Zea mays* Mikrosomen nachweisen, die mit einem Antikörper gegen Ins(1,4,5)P₃-Rezeptoren aus tierischen Geweben kreuzreagierten.

Die Bedeutung einer Signaltransduktion über das PI-System ist für Pflanzen jedoch bisher weitgehend unbekannt. Erste Hinweise für eine mögliche Beteiligung des PI-Systems gibt es für die Auxin-abhängige Signaltransduktion (Ettliger und Lehle, 1988) sowie für die Abscisinsäure-abhängige Signaltransduktion in Schließzellen (Lee et al., 1996) und für *motor cells* (Kim et al., 1996). Weiterhin konnten Perera et al. (1999) kürzlich in Maisknotten nach gravi-Stimulation einen Anstieg von Ins(1,4,5)P₃ nachweisen.

1.5 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war es, die Signaltransduktion über Inositol-1,4,5-*tris*phosphat in Sonnenblumen-Hypokotylprotoplasten am Beispiel des Schwerkraftreizes näher zu charakterisieren.

Voraussetzung für die Untersuchungen war die Etablierung einer Methode mit der Protoplasten in ausreichender Menge und Qualität gewonnen werden konnten. Des weiteren mußte eine hoch sensitive Analytik zur Quantifizierung des *second messengers* Ins(1,4,5)P₃ in HCP-Extrakten etabliert werden, die es zudem ermöglichte Inositolphosphate isomerspezifisch zu untersuchen. Aufgrund der geplanten mikrogravitations-Experimente konnte dabei der sehr empfindliche Nachweis über Radiotracer nicht angewendet werden.

Geklärt werden sollte die Fragestellung, ob Protoplasten als kleinste pflanzliche Einheit Änderungen des Schwerkraftvektors autonom wahrnehmen und möglicher Weise das PI-System ein Element der beteiligten Signaltransduktionskette bildet. Hierzu waren

Experimente bei simulierter Schwerelosigkeit, mikro-Gravitation und hyperg erforderlich. Da ferner zahlreiche Hinweise aus der Literatur vorliegen, die eine Beteiligung von Auxin an gravitropen Reaktionen belegen, sollte eine mögliche Beteiligung des PI-Systems an der Auxin-abhängigen Signaltransduktion untersucht werden. Zur Optimierung des Protoplastensystems war es dabei erforderlich neben den klassischen Vitalitätstests eine Methode zu entwickeln, die auch mögliche Rezeptorschäden an der Plasmamembran berücksichtigt.

2 Material und Methoden

2.1 Pflanzenmaterial und Pflanzenanzucht

Für die physiologischen Untersuchungen wurden Protoplasten verwendet, die aus Sonnenblumen-Hypokotylen (*Helianthus annuus*; var. Albena, KWS) isoliert wurden. Da das Hypokotyl der Keimlinge nach gravi-Stimulation eine deutliche negativ-gravitrope Reaktion zeigt und die Keimlinge einfach kultiviert werden konnten, stellte dieses Organ ein besonders geeignetes Basismaterial für die Experimente dar.

Zur Anzucht wurden die Samen zunächst für eine Stunde in Natriumhypochlorit (5 %) oberflächensterilisiert. Danach wurden die Samen intensiv mit Leitungswasser gespült und in Saatschalen (20 cm x 40 cm) ausgesät, wobei Vermiculit als Kultursubstrat eingesetzt wurde. Die Anzucht der Keimlinge erfolgte dann im Dunkeln in einem Brutschrank (25 °C/ 80 % R.H.). Unter den angegebenen Anzuchtbedingungen waren die Keimlinge nach 7 Tagen ausreichend entwickelt (Abb. 2) und konnten für die Isolation der Hypokotylprotoplasten (Kapitel 2.2) geerntet werden.



Abb. 2: Sonnenblumenkeimlinge

2.2 Protoplastierung der *Helianthus annuus* Hypokotyle

Die Isolation der Hypokotylprotoplasten (HCPs) erfolgte in Anlehnung an Lenne et al. (1983) sowie Schmitz und Schnabl (1989). Dazu wurden 7 Tage alte Sonnenblumenkeimlinge verwendet (Kapitel 2.1), von denen zunächst Wurzel und Keimblätter abgetrennt wurden. Die Hypokotyle (\varnothing 2,6mm; Länge 10 cm – 12 cm) konnten dann mit einem speziell entwickelten Schneidegerät (Abb. 3) in Streifen geschnitten werden. Die Hypokotyle wurden hierbei durch eine zentrale Bohrung (\varnothing 2,8 mm) zugeführt und mit zwei parallel angeordneten Rasierklingen in drei Streifen geschnitten. So konnte die Enzymlösung (Tabelle 1) ungehindert das ganze Rindenparenchym und Zentralzylinder angreifen. Zur Protoplastierung wurden diese Hypokotylabschnitte (20 g FM) in Plastikschaalen (Gerda-Box; 20 cm x 10 cm) zu 33 ml Enzymlösung gegeben. Hierbei waren die Hypokotylabschnitte nur leicht mit Enzymlösung bedeckt, tauchten sie demgegenüber tief in der Enzymlösung unter, sank die Ausbeute an vitalen Protoplasten dramatisch. Anschließend wurden die Hypokotyle für 5,5 h bei 25 °C unter leichtem Schütteln inkubiert.

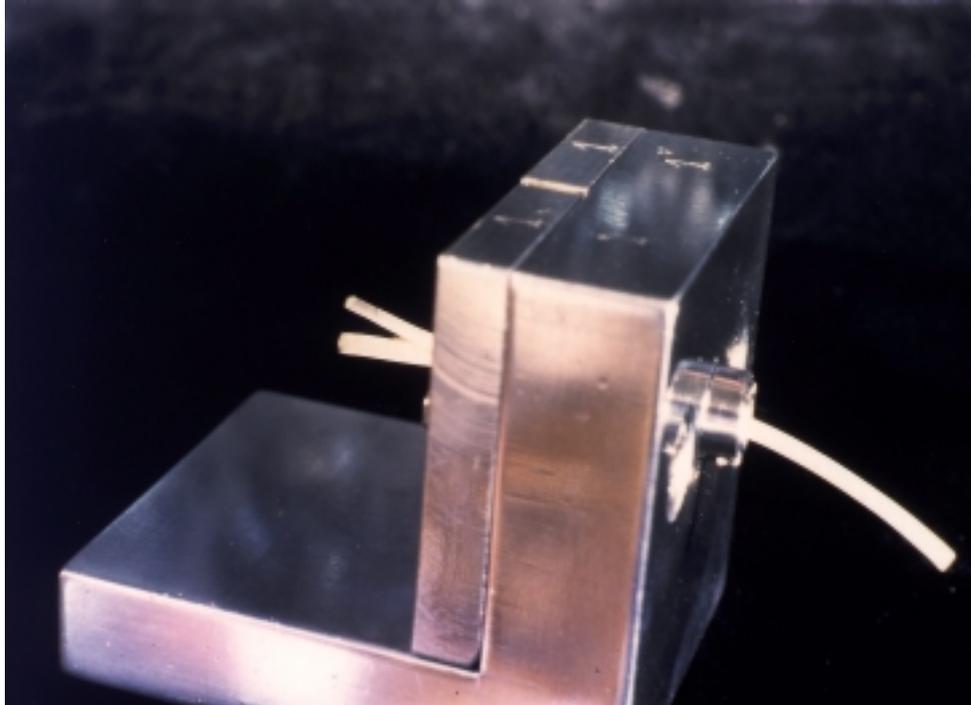


Abb. 3: Sonnenblumen-Hypokotyl Schneidegerät

Nach der Inkubation wurden die Hypokotyle zunächst in der Enzymlösung mit einem Spatel leicht bewegt, um ein Lösen der HCPs aus dem nicht vollständig verdauten Gewebe zu unterstützen. Unverdautes Pflanzenmaterial wurde mit einem Nylonnetz (200 µM) abgetrennt, bevor die Protoplasten-Suspension zur weiteren Reinigung in 50 ml Zentrifugengläser gefüllt wurde.

Tabelle 1: Enzymlösung für die Isolation der Hypokotylprotoplasten

Enzymlösung	
Substanz	Konzentration
Puffer	KCl-Puffer I
Cellulase (aus <i>Trichoderma viride</i>), (Merck)	0,5 % (w/v)
Macerozym R10, (Merck)	0,02 % (w/v)
Driselase (from Basidiomycetes), (Sigma)	0,05 % (w/v)
BSA, (Sigma)	1 % (w/v)
pH-Wert	5,6 (KOH)

Tabelle 2: Saccharose- und KCl-Puffer

	Saccharose- Puffer I [mM]	Saccharose- Puffer II [mM]	KCl- Puffer I [mM]	KCl- Puffer II [mM]
Saccharose (Merck)	500	500		
KCl (Merck)			337	337
CaCl ₂ (Merck)	1	1	13,6	13,6
MES (Biomol)	10	0,5	10	0,5
pH-Wert (KOH)	5,6	5,6	5,6	5,6

Durch Zentrifugieren (50 g, 5 min, Heraeus; Minifuge GL) wurden die HCPs sedimentiert und konnten anschließend in 20 ml Saccharose-Puffer I (Dichte 1,08 g/ml) resuspendiert werden. Von dieser Suspension wurden jeweils 10 ml in kleinere Zentrifugengläser (13 ml) überführt und vorsichtig mit 2 ml KCl-Puffer I überschichtet. Durch Zentrifugieren (50 g, 5 min) wurden grobe Verunreinigungen (Zellwandfragmente, Plastiden) sedimentiert, während sich die HCPs in der Interphase sammelten (Abb. 4) und mit einer 1000 µl Pipette (Spitze abgeschnitten) vorsichtig abgenommen werden konnten.



Abb. 4: Hypokotylprotoplasten aus *Helianthus annuus* nach Zentrifugation (50g, 5 min) im KCl/Saccharose-Stufengradienten.

Um den Saccharose-Puffer I auszuwaschen, wurden die abgenommenen HCPs anschließend zweimal in KCl-Puffer I sedimentiert (50 g, 5 min). Nach der letzten Zentrifugation wurde das HCP-Pellet in KCl-Puffer I resuspendiert und die gereinigten HCPs über Nacht im Kühlschrank (5°C) gelagert.

Im Verlauf der Arbeit stellte sich heraus, daß die über den Saccharose-Stufengradienten erzielte Reinheit der Protoplasten für die angestrebten physiologischen Untersuchungen nicht ausreichte. Daher wurde ein weiterer Reinigungsschritt etabliert, der unmittelbar vor der Durchführung der Experimente erfolgte. Hierzu wurde zunächst der Überstand der über Nacht sedimentierten HCP-Suspension abgenommen und das HCP-Pellet in 30 ml KCl-Saccharose-Puffer II (50:50; Tabelle 2) resuspendiert. Von der Suspension wurden jeweils ca. 10 ml in 13 ml Zentrifugengläser überführt und mit 1 ml KCl-Puffer II überschichtet. Nach erneuter Zentrifugation (5 min, 50 g) wurden die HCPs der Interphase mit einer Pipette abgenommen und die für die jeweiligen Versuche erforderliche HCP-Konzentration eingestellt. Diese wurde mit einem Hämocytometer (Fuchs-Rosenthal) bestimmt.

2.2.1 Vitalitätsbestimmung der Protoplasten

Die Vitalität der Protoplasten wurde nach verschiedenen Methoden bestimmt.

2.2.1.1 Vitalfärbung

Mit einer Fluorescein-Diacetat-Färbung (FDA) wurde die Semipermeabilität der Plasmamembran geprüft. Fluorescein-Diacetat passiert als unpolares Molekül die Plasmamembran ungehindert. Im Cytoplasma vitaler Protoplasten erfolgt die Abspaltung des Acetatrestes durch Esterasen, wodurch sich Fluorescein als polares Molekül im Cytoplasma anreichert (Widholm, 1972; Larkin, 1976; Seitz et al., 1985). In toten Protoplasten ist im Gegensatz dazu eine Akkumulation von Fluorescein nicht mehr gegeben.

Zur Färbung wurden die Protoplasten fünf Minuten in FDA inkubiert (0,01 % [w/v], 0,5 %ige [w/v] Stammlösung in Aceton). Anschließend konnte die gelb-grüne Fluoreszenz des Farbstoffes bei violett-Anregung im Mikroskop (Nikon Eclipse TE 300) beobachtet werden.

2.2.1.2 Cytoplasmaströmung

Aufgrund der geringen Anzahl an Plastiden in den Hypokotylprotoplasten war es möglich, die Cytoplasmaströmung im Lichtmikroskop (250-fache Vergrößerung, Leitz Laborlux) zu beobachten und als Vitalitätskriterium heranzuziehen. Vitale Protoplasten zeigen eine deutliche Cytoplasmaströmung.

2.3 Messung der *in vivo* PM/H⁺-ATPase Aktivität von HCPs

Zur Bestimmung der PM/H⁺-ATPase Aktivität wurden die Änderungen der extrazellulären pH-Werte einer HCP-Suspension gemessen. Dazu wurde das im folgenden dargestellte Meßsystem aufgebaut.

2.3.1 Versuchsaufbau

Das System besteht aus einem Flachsreiber, PC, Digitalvoltmeter, pH-Meter und einem Küvettenhalter. Als Meßküvette wurde ein Eppendorf Reaktionsgefäß (2 ml) verwendet, das auf einem Getriebemotor angebracht war. Um einem Sedimentieren der Protoplasten und der Ausbildung von pH-Gradienten vorzubeugen, wurde die Meßküvette in leichter Schräglage rotiert (28 rpm, Abb. 5). Unter diesen Bedingungen konnten auch die verschiedenen Effektoren rasch eingemischt werden, deren Zugabe mit einer Hamilton-Spritze erfolgte. Die Reaktion der Suspension auf die Effektorzugabe wurde mit einer mikro-pH-Elektrode (Mettler Toledo) und pH-Meter (Orion) gemessen. Die Meßwerte wurden sowohl über ein Digitalmultimeter (VOLTCRAFT M-4660A) mit serieller Schnittstelle als auch analog (Analogschreiber; Bachhofer SE 120) dokumentiert.

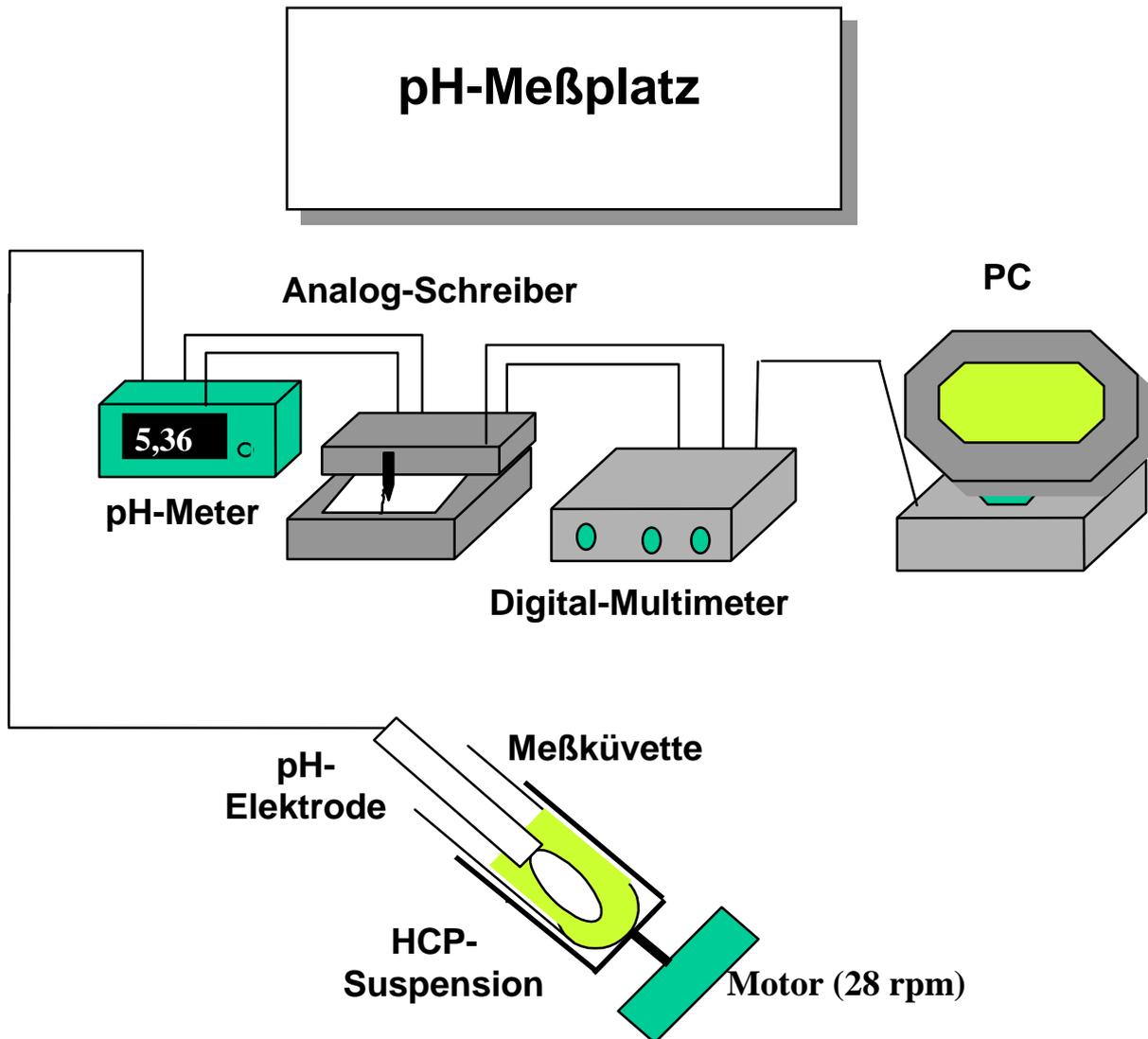


Abb. 5: pH-Meßplatz

2.3.2 Versuchsdurchführung

Für die Auxin-Experimente wurde das Natriumsalz der Indol-3-Essigsäure (Sigma) eingesetzt, da es im Gegensatz zur freien Säure wasserlöslich ist. Die verwendeten Auxin-Stammlösungen (1 und 10 mM IAA) wurden in KCl-Puffer II angesetzt und entsprachen in ihrer Konzentration dem 100-fachen der Finalkonzentration.

Entsprechend den Auxin-Experimenten erfolgte die Fusicoccin-Zugabe aus einer 100-fach konzentrierten Stammlösung. Im Gegensatz zu Auxin mußte Fusicoccin (Sigma) allerdings zuerst in 100 % Ethanol vorgelöst werden und konnte dann in KCl-Puffer II

aufgenommen werden. Hierbei lag die Finalkonzentration an Ethanol in der HCP-Suspension unter 0,15 % (vol/vol).

Die Stammlösung des *PM/H⁺-ATPase*-Inhibitors (N,N'-Dicyclohexylcarbodiimide (DCCD), 50 mM, Sigma) wurde in Ethanol angesetzt, während die Stammlösungen des PI-System-Inhibitors Neomycin (1 und 10 mM, Sigma) in KCl-Puffer II angesetzt wurden.

2.3.2.1 Einfluß der Puffer

In Vorexperimenten wurde zunächst der Einfluß des Puffers auf die Auxin- (100 µM final) und Fusicoccin-abhängige (10 µM final) Aktivierbarkeit der *PM/H⁺-ATPase* untersucht. Hierzu wurden die gereinigten und umgepufferten HCPs (Kapitel 2.2) mit KCl-Puffer II (Tabelle 2) auf eine Konzentration von $3 \cdot 10^6$ HCPs/ml eingestellt. Anschließend wurde die kalibrierte Suspension im Verhältnis 1:4 mit einem Gemisch aus Saccharose- und KCl-Puffer II (Tabelle 2) so verdünnt, daß sich drei unterschiedliche Saccharose- und KCl-Konzentrationen ergaben (250 mM Sac./165 mM KCl; 175 mM Sac./215 mM KCl; 50 mM Sac./298 mM KCl). Zur Messung wurden 800 µl der verdünnten HCP-Suspension in die Meßküvette gefüllt und sofort die Dokumentation des extrazellulären pH-Wertes gestartet. Systembedingt kam es dabei zunächst zu sehr raschen Änderungen der pH-Werte, so daß vor Zugabe der Effektoren (Auxin und Fusicoccin) eine Vorlaufzeit eingehalten werden mußte. Die Zugabe von Auxin und Fusicoccin erfolgte aus den oben beschriebenen Stammlösungen.

Da gezeigt werden konnte, daß bei hohen Saccharosekonzentrationen die Auxin-abhängige Aktivierung der *PM/H⁺-ATPase* inhibiert wird (Kapitel 3.2.1), wurde für alle folgenden Experimente die kalibrierte HCP-Suspension ausschließlich mit KCl-Puffer II im Verhältnis 1:4 verdünnt.

2.3.2.2 Einfluß der Auxinkonzentration und des H⁺-ATPase-Inhibitors DCCD

In zweiphasigen Experimenten wurde der Einfluß der Auxinkonzentration (10 und 100 µM) auf die Aktivierbarkeit der *PM/H⁺-ATPase* untersucht.

In einem weiteren Kontrollexperiment erfolgte eine Vorinkubation der HCP-Suspensionen mit dem H⁺-ATPase-Inhibitor N,N'-Dicyclohexylcarbodiimide (DCCD, final 50 µM). Die Zugabe von DCCD erfolgte hierbei unmittelbar zu Experimentbeginn, wobei die Vorlaufphase als Inkubationsphase genutzt wurde. Dadurch konnte sichergestellt werden, daß die Zugabe von Auxin bei allen Experimenten zum gleichen Zeitpunkt erfolgte.

2.3.2.3 Einfluß des Phosphoinositid-System Inhibitors *Neomycin*

Um eine Beteiligung des PI-Systems an der Auxin-abhängigen Aktivierung der *PM/H⁺-ATPase* zu überprüfen, wurden die HCPs vor der Zugabe von Auxin (final 100 µM) für 10 min mit dem Inhibitor des PI-Systems Neomycin (final 10 und 100 µM) inkubiert.

2.4 Extraktion der Inositolphosphate

Die Extraktion der Inositolphosphate aus dem Pflanzenmaterial erfolgte in Anlehnung an Mayr (1990), wobei Trichloressigsäure (TCA) zum Fixieren der Proben eingesetzt wurde. Die Extraktion läßt sich in vier Teilschritte gliedern: Fixierung, Extraktion der TCA, Aktivkohlebehandlung, Festphasenextraktion.

2.4.1 Fixierung der Proben

Zur Bestimmung der Ins(1,4,5)P₃-Gehalte in HCPs wurden die Protoplasten zunächst mit Trichloressigsäure (final 8 %, w/v) fixiert. Dazu wurde die HCP-Suspension mit konzentrierter TCA (100 %, w/v) versetzt und mit einem Schüttler intensiv gemischt. Anschließend wurden die fixierten Proben in N₂ eingefroren, um eine unspezifische Hydrolyse zu verhindern. Zur vollständigen Protein-Fällung wurden die tiefgefrorenen HCP-Suspensionen später zügig (in ca. 3 – 4 min) unter ständigem Schütteln aufgetaut und auf Eis gelagert. Nach weiteren 20 min wurden die Proben in einer vorgekühlten Kühlzentrifuge (Hettich; Mikro rapid/K; 5 min, 16000g, 3°C) zentrifugiert. Die Überstände wurden zur Extraktion der TCA abgenommen und in Reagenzgläser (15 ml) mit Schliff überführt.

2.4.2 Extraktion der Trichloressigsäure

Die Extraktion der TCA (final 0,48 M) war erforderlich, da hohe Ionenkonzentrationen in den Proben den quantitativen Nachweis der Inositolphosphate stören. Einerseits hemmen sie die Sorption der Inositolphosphate am Anionenaustauscher und andererseits fördern niedrige pH-Werte die Hydrolyse der Inositolphosphate. Zur Extraktion der TCA wurden die Überstände mit wassergesättigtem Diethylether ausgeschüttelt (4 x 2,5 faches Probenvolumen). Nach jedem Schritt wurde der Diethylether mit einer 2 ml Pasteurpipette abgenommen. Nach der letzten Waschprozedur wurden die Proben in 2 ml Reaktionsgefäße überführt. Der restliche Diethylether in den Proben wurde im Unterdruck (Speed-Vac 43 °C, 100 mbar, 3 min) abgezogen, da schon geringe Mengen an Diethylether die Sedimentation der Aktivkohle (Kapitel 2.4.3) stören.

2.4.3 Aktivkohlebehandlung

2.4.3.1 Ansetzen der Aktivkohlesuspension

Die Aktivkohle (Fluka) wurde für 2 h in 3 M HCl gekocht, anschließend abfiltriert und mit H₂O dest. so lange gespült, bis der pH-Wert nahe dem Neutralpunkt lag. Nach Trocknung der Aktivkohle (120°C, 24 h) wurde die Aktivkohle (20 % w/v) in einem Ammoniumacetat-Puffer (50 mM NH₄-Acetat (pH-Wert 5,0; Essigsäure); 100 mM NaCl) suspendiert.

2.4.4 Festphasenextraktion

Zwar erhöhen hohe Salzgehalte in den Proben während der Aktivkohlebehandlung die Wiederfindungsraten für InsP_x, die anschließende Chromatographie beeinflussen sie jedoch negativ. Denn einerseits verhindern sie eine vollständige Sorption der InsP_x am Anionenaustauscher, andererseits führen sie zu starken Retentionszeitverschiebungen und damit zu nicht-reproduzierbaren Ergebnissen. Vor der Analyse mittels *mda*-HPLC mußten die Proben daher entsalzt werden. Hierzu wurden Einwegspritzen (5 ml) mit einem Anionenaustauscher (Q-Sepharose HP, Pharmacia) gefüllt (1,5 ml/Säule). Zur Konditionierung wurden diese Säulen nacheinander mit 6 ml HCl (0,6 M) HCl, H₂O und einem Ammoniumacetat-Puffer (1,5 M; pH 5,5) bei einer Flußrate von 12 ml*h⁻¹ eluiert,

wobei nur gekühlte Puffer eingesetzt wurden und auch die Säulen durch einen eisgekühlten Aluminiumblock temperiert waren. Nachdem der Austauscher in die Acetat-Form überführt worden war, wurde überschüssiges Acetat mit 6 ml H₂O entfernt, bevor die mit H₂O verdünnten Proben (1,5:5) aufgetragen wurden. Schwach sorbierte Anionen wurden anschließend mit 6 ml HCl (20 mM) eluiert. Zur Desorption der InsP_x wurde ein flüchtiges Puffersystem verwendet (Ammoniumacetat; 1,5 M, pH 5,5; 6 ml), das sich im Unterdruck abziehen lässt. Die eluierten Proben wurden auf jeweils 3 e-cups verteilt und innerhalb von 15 Stunden im Unterdruck getrocknet (speed-vac, 1 mbar, 43 °C).

Trotz des verwendeten flüchtigen Puffersystems wiesen die getrockneten Proben noch geringe NH₄Cl-Kontaminationen auf. Diese waren unproblematisch, sofern die Proben mit einer analytischen Säule (Source Q 15 (Pharmacia), 4,6 mm*250 mm) gemessen wurden. Große Probleme bereiteten NH₄Cl-Reste demgegenüber bei der Verwendung von micro-bore Säulen (miniQ PE bzw. miniQ PC (Pharmacia)), da die InsP_x hier nach dem Probenauftrag nicht vollständig gebunden werden konnten. Bei Verwendung dieser Säulen wurde daher zur Verdrängung des Cl⁻ ein weiterer Elutionsschritt (6 ml Ammoniumacetat 0,3 M, pH 5,5) etabliert.

2.5 Quantitativer Nachweis der Inositolphosphate

2.5.1 Aufbau der *mdd*-HPLC

Zum quantitativen und isomerspezifischen Nachweis der Inositolphosphate wurde ein modifiziertes *metal-dye-detection*-HPLC-System (*mdd*-HPLC; Mayr, 1990) verwendet (Abb. 6).

Es handelt sich hierbei um eine selektive Nachweismethode für Phosphorsäureester mit der die Inositolphosphate im pmolaren-Bereich detektiert werden konnten, wobei die Sensitivität der Nachweisreaktion (Kapitel 2.5.4) allein durch das Rauschen der Basislinie beschränkt wurde (Kapitel 2.5.1.1). Als HPLC-Systeme zur Inositolphosphat-Analytik wurden sowohl ein analytisches-System der Firma Beckmann (System Gold; Pumpe A/B: pump 126; Pumpe C: pump 110 B) als auch ein inertes microbore HPLC-System der Firma Bio-Tek Kontron (Pumpe A/B/C: pump 422) eingesetzt.

Die isomerspezifische Trennung der Inositolphosphate erfolgte mittels Anionenaustausch-Chromatographie, wobei die Elution sowohl unter schwach alkalischen als auch sauren Bedingungen (alkalische/saure *mdd*-HPLC, Kapitel 2.5.2) durchgeführt werden konnte.

Als Anionenaustauscher wurden eine analytische Säule (4,6 mm * 250 mm gefüllt mit Source 15 Q (Pharmacia)) sowie eine miniQ PE-Säule (Pharmacia) und eine miniQ PC-Säule (Pharmacia) eingesetzt.

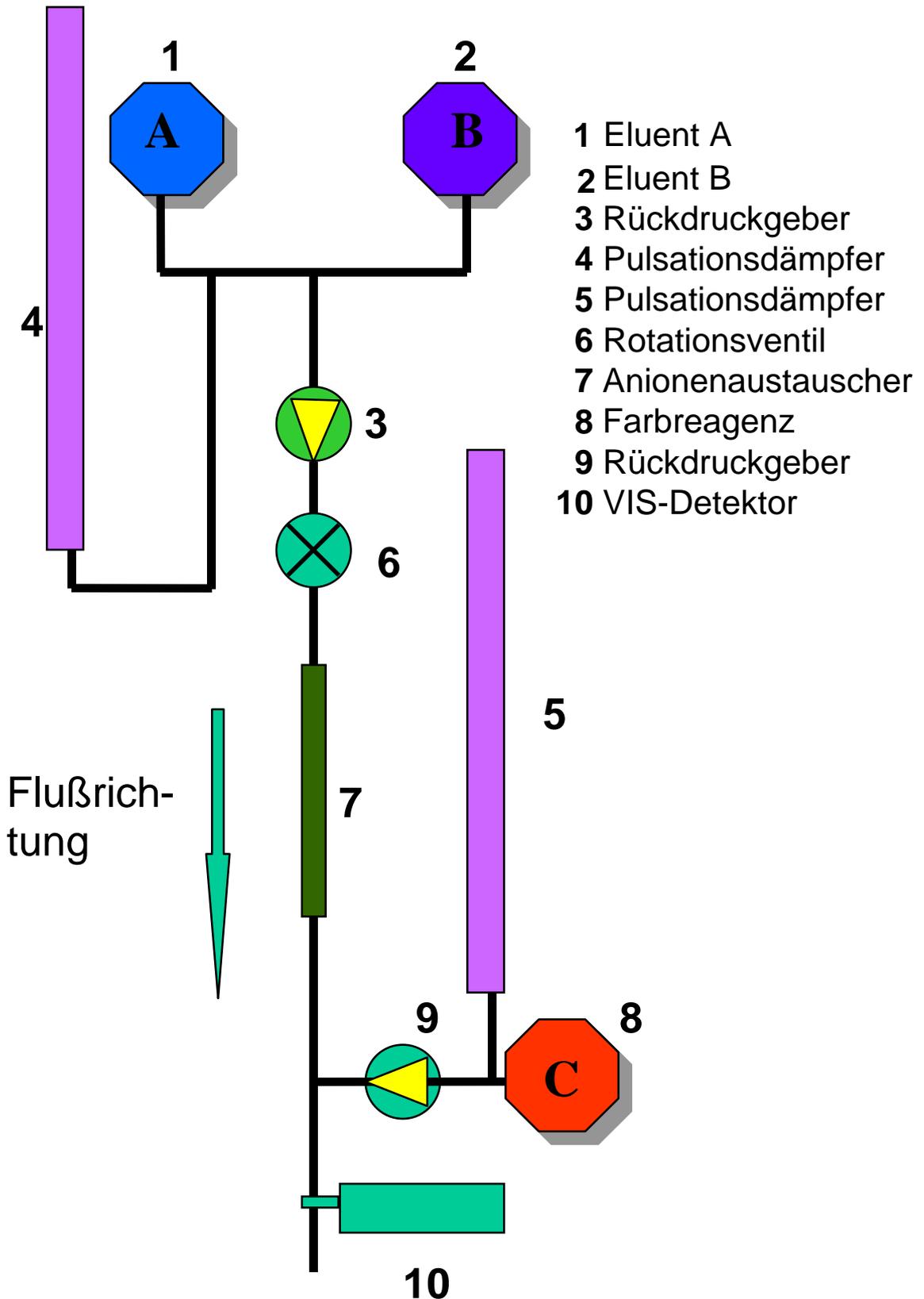


Abb. 6: Schematische Darstellung der *mdd*-HPLC, die entweder unter alkalischen oder sauren Bedingungen betrieben wurde.

2.5.1.1 Maßnahmen zur Optimierung des verwendeten *mda*-HPLC-Systems

Die Sensitivität der *mda*-HPLC ist maßgeblich durch das Rauschen der Basislinie beschränkt (Abb. 7), was seine Ursache primär in der Nachsäulenderivatisierung hatte. Deshalb muß das Nachweisreagenz über die Pumpe C möglichst exakt den Eluenten zugesetzt werden. Da die Ins(1,4,5)P₃-Gehalte in den HCP-Extrakten weit unterhalb der Nachweisgrenze des Standard-HPLC-Systems lagen, waren zusätzliche Maßnahmen zur Dämpfung der Pulsation notwendig.

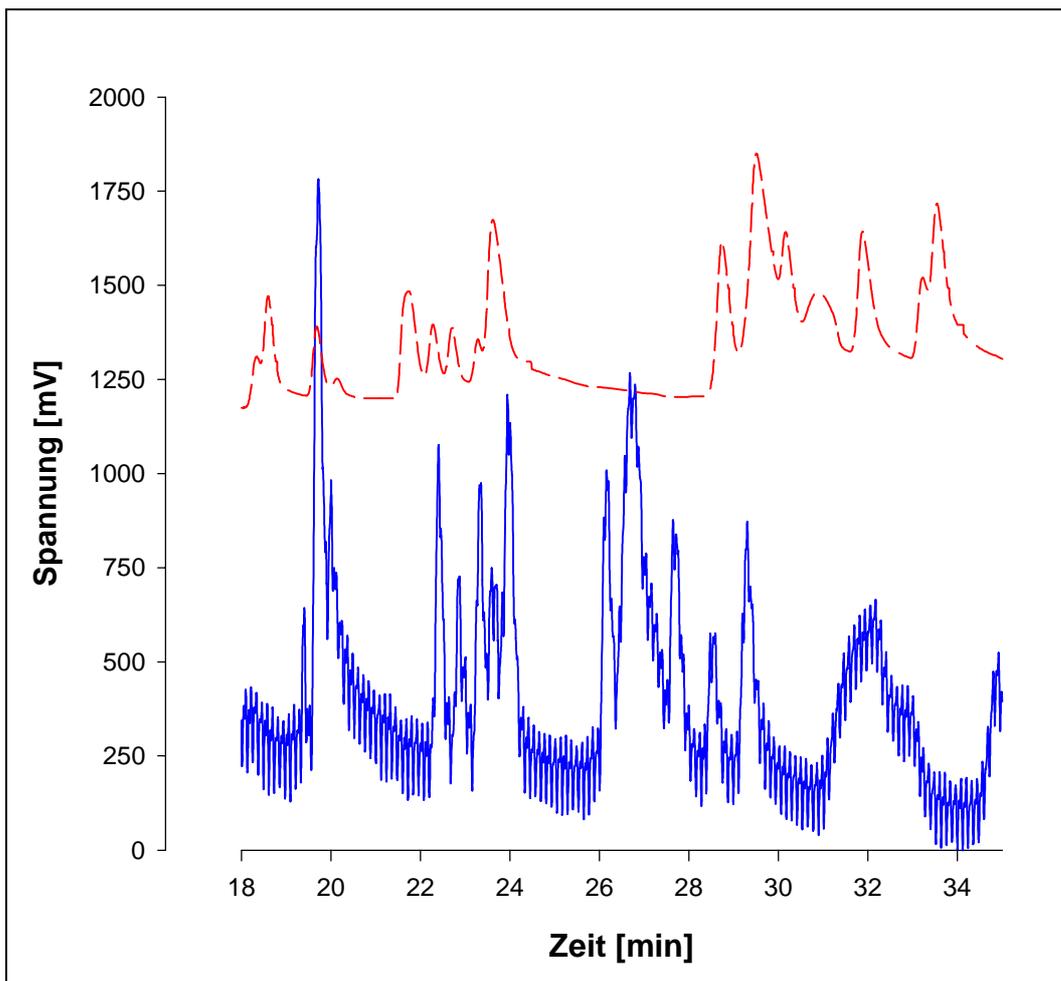


Abb. 7: Alkalische *mda*-HPLC von Inositolphosphat-Standards vor (—) und nach (- - -) Optimierung der Standard-HPLC sowie des KCl-Gradienten.

HPLC-System: micro bore (Bio-Tek-Kontron, Pump 422)

Eluent: A: 20 mM TEA (pH 7,8 (HCl))

B: 600 mM KCl, 20 mM TEA (pH 8,1 (HCl))

Gradient: 0 – 0.6 M KCl / Fluß: 400 µl*min⁻¹

Farbreagenz: 2 mM HCl, 200 µM PAR, 30 µM YCl₃ / Fluß: 210 µl*min⁻¹

Säule: miniQ PC (Pharmacia)

Prinzipiell wurden nur entgaste Puffer (Ultraschall, 10 min, 15 mbar) eingesetzt. Zusätzlich wurden Rückdruckgeber eingesetzt, um den Arbeitsdruck der Anlagen auf ca. $1000 \cdot 10^3$ Pascal einzustellen, was ein optimales Arbeiten der vorhandenen Dämpfungsglieder gewährleistete. Da auch diese Maßnahmen für die Spezialanwendung unzureichend waren, wurden im Verlauf der Arbeit weitere Dämpfungsglieder entwickelt und angebracht (Abb. 6). Durch die Optimierungen konnte die Nachweisgrenze für $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ gegenüber der Standardausführungen ca. um den Faktor 100 gesenkt werden.

2.5.2 Trennung der Inositolphosphate über die alkalische und saure *md*d-HPLC

Zur quantitativen Analyse der $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ -Gehalte wurden die Pflanzenextrakte unter schwach alkalischen Bedingungen (alkalische *md*d-HPLC, Tabelle 3) eluiert, da hierbei die höchste Isomerentrennschärfe für den InsP_3 -Bereich erreicht wurde. Die saure *md*d-HPLC (Tabelle 3) war demgegenüber besser zur Analyse stärker phosphorylierter Inositolphosphate geeignet. Allerdings ist für die saure *md*d-HPLC ein vollständig inertes HPLC-System erforderlich, da aufgrund der niedrigen pH-Werte (0,4 M HCl) ansonsten Eisenionen aus dem Edelstahl gelöst werden, die den Nachweis der Inositolphosphate stark beeinträchtigen.

Tabelle 3: Eluenten der alkalischen und sauren *md*d-HPLC.

alkalische <i>md</i>d-HPLC	
Eluent A	Eluent B
- 20 mM Triethanolamin - pH 7,8 (HCl)	- 20 mM Triethanolamin - 0,6 M KCl - pH 8,1 (HCl)
saure <i>md</i>d-HPLC	
Eluent A	Eluent B
- 0,2 mM HCl - 15 μM YCl_3	- 0,4 M HCl - 22,5 μM YCl_3

Die Flußrate mußte dem Querschnitt der verwendeten Säule angepaßt werden. Sie betrug für die 4,6 mm Q 15-Säule und die miniQ PE-Säule $0,75 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$, während die minQ PC-Säule mit $0,4 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ betrieben wurde.

Die zur Ins(1,4,5) P₃-Analytik verwendeten Gradientenprotokolle sind in Tabelle 4 dargestellt. Zur Analyse wurden die Pflanzenextrakte jeweils in 2 ml Puffer A aufgenommen und von Hand über eine 2 ml Probenschleife in das HPLC-System injiziert.

Tabelle 4 : Gradientenprotokolle für die InsP₃-Analytik

Säule	Source Q 15 4.6 mm * 250 mm			miniQ PC			miniQ PE		
Methode	alkalische <i>md</i>d-HPLC								
Gradient	Zeit [min]	Eluent B [%]	Dauer [min]	Zeit [min]	Eluent B [%]	Dauer [min]	Zeit [min]	Eluent B[%]	Dauer [min]
	0	0	0	0	0	5	0	0	0
	5	28	0.1	5	20	0.1	3	20	0.1
	20	53	40	10	37	22	12	55	35
	60	100	0.1	32	100	0.1	47	100	0.1
	70	0	0.1	35	0	0.1	52	0	0.1
	85	Ende		40	Ende		59	Ende	
Methode	saure <i>md</i>d-HPLC								
				0	0	0			
				3	12,5	0,1			
				12	65	11			
				23	100	0.1			
				26	0	0.1			
				30	Ende				

2.5.3 Herstellung der InsP₆-Hydrolysate

Um die Trennleistung der *md*d-HPLC für die einzelnen InsP_x-Fraktionen zu optimieren, wurde sauer hydrolysiertes InsP₆ verwendet. Das Hydrolysat enthielt, bedingt durch die saure Hydrolyse, ein breites Spektrum an InsP_x-Isomeren.

Zur Hydrolyse wurde InsP₆ (10 mg (Sigma)) in Säure (HCl 6 M, 1ml) gelöst und in einem Reagenzglas mit Schraubverschluß (Schott GL 14) bei 120 °C inkubiert. Der Fortschritt der sauren Hydrolyse wurde kontinuierlich durch die Analyse von Aliquots mit der alkalischen *md*d-HPLC verfolgt. Zum Abstoppen der Reaktion wurde das InsP₆-Hydrolysat in Eppendorf-Reaktionsgefäße (1,5 ml) aliquotiert (50 µl) und in der Speed-Vac getrocknet (1 mbar, 45°C).

2.5.4 Detektion der Inositolphosphate

Zur Detektion der eluierten Inositolphosphate wurde das Eluat *on-line* mit einem Yttrium - 4-2-Pyridylazoresorzinol (PAR; Fluka) Farbreagens (Flußrate= 0,53 * Flußrate [A/B], (Tabelle 5)) versetzt. Da Inositolphosphate Schwermetalle und Übergangsmetalle komplexieren, konnte die Inositolphosphatkonzentration im Eluat über eine Abnahme der Absorption (520 nm, Maximum der Absorption des Yttrium-PAR Farbkomplexes) detektiert werden. Die Verwendung von Yttrium als Reporter-Kation erhöht die Spezifität des Nachweises, da es selektiv an Phosphorsäureester bindet (Mayr, 1990). Grundsätzlich ist eine Detektion auch bei 405 nm möglich (Maximum der Absorption des freien PARs), allerdings verliert der Nachweis hierbei an Selektivität.

Da ein Nachweis über das beschriebene Nachsäulenreagenz nur unter alkalischen Bedingungen (pH > 7,5) möglich ist, müssen die Puffer in ihrem pH-Wert sowie der Pufferkapazität aufeinander abgestimmt werden. Zum Ansetzen der Farbreagenzien wurden PAR und Yttriumchlorid aus Stammlösungen (10 mM PAR, 100 % Methanol [v/v]; 45 mM YCl₃) pipettiert, wobei die PAR Stammlösung zuvor über einen Rundfilter (Schleicher & Schuell Rundfilter 589³ Blauband) filtriert worden war. Unmittelbar vor Meßbeginn wurden die Farbreagenzien über einen Bottle-Top-Filter (0,22 µM ,novodirect) filtriert und entgast.

Tabelle 5: Nachsäulenreagenzien der Nachsäulen-Derivatisierung

Farbreagens der Nachsäulen-Derivatisierung	
alkalische <i>md</i>-HPLC	
HCl	2 mM
PAR	200 µM
YCl ₃	30 µM
saure <i>md</i>-HPLC	
Triethanolamin	1,6 M, pH 9 (HCl)
PAR	300 µM

2.6 Qualitativer Nachweis von Ins(1,4,5)P₃

2.6.1 Interne Standardisierung nach saurer *mdc*-HPLC

Ins(1,4,5)P₃ (Sigma) wurde den HCP-Extrakten als interner Standard unmittelbar vor der *mdc*-HPLC zugesetzt.

2.6.2 Rechromatographie der InsP₃-Fraktion

Pflanzenextrakte (HCPs) wurden sowohl über die alkalische *mdc*-HPLC als auch die saure *mdc*-HPLC analysiert. Zur näheren Charakterisierung der unter sauren Bedingungen nachgewiesenen InsP₃-Fraktion (Kapitel 3.4.4), wurde die InsP₃-Fraktion blind (ohne Nachsäulenreagenz) gesammelt, um eine alkalische Reanalyse durchzuführen. Vor der Reanalyse wurde die genannte Fraktion über eine Kationenaustauschersäule gegeben, um Y³⁺ abzutrennen, da Inositolphosphate unter alkalischen Bedingungen durch Y³⁺ schleichend gefällt werden.

Hierzu wurden 0,5 ml des Kationenaustauschers Dowex 50 WX 8 (SERVA) in 2,5 ml Säulen (MoBiTec) gegeben und zunächst mit in die H⁺-Form gebracht (0,6 M HCl, 2 ml). Überschüssige Salzsäure wurde mit 2 ml H₂O ausgewaschen, bevor das Eluat aufgetragen wurde. Das Yttrium-freie Eluat wurde in 1,5 ml Reaktionsgefäßen aufgefangen und im Wasserbad (70 °C) unter N₂ getrocknet.

In einem Kontroll-Experiment wurde überprüft, ob während der Trocknung der Proben durch *acid-migration* (Irvine, 1986) der Phosphatgruppen zusätzliche InsP₃-Isomere entstehen. Hierzu wurde ein Ins(1,4,5)P₃-Standard in HCl (0,4 M; 1,2 ml) aufgenommen und ebenfalls im N₂-Strom getrocknet. Anschließend wurde die trockene Probe über die alkalische *mdc*-HPLC analysiert.

2.6.3 *mdc*-HPLC und UV-Absorption von HCP-Extrakten

Zur weiteren Charakterisierung der Proben wurde regelmäßig ein UV-Detektor (λ 254 nm) in das *mdc*-HPLC-System integriert. Dessen Ausgangssignal wurde parallel zum

Signal des VIS-Detektors aufgenommen. Da der UV-Detektor vor dem VIS-Detektor eingebaut werden mußte, ergab sich eine scheinbare Retentionszeit-Differenz von 10 Sekunden. Es eröffnete sich aber die Möglichkeit Inositolphosphate und Substanzen mit konjugierten Doppelbindungen (z.B. Nukleotide) zu unterscheiden. Ließen sich Substanzen sowohl im UV-Bereich als auch über das Nachsäulenreagenz nachweisen, konnte ausgeschlossen werden, daß es sich hierbei um Inositolphosphate handelte, da diese aufgrund fehlender konjugierter Doppelbindungen im Gegensatz zu Nukleotiden im UV-Bereich nicht absorbieren.

2.6.4 3-Phytase Abbau von HCP-Extrakten

Zwar konnten mit der HPLC mögliche Kontaminationen über die UV-Detektion einfach nachgewiesen werden, dennoch wurde mit dem 3-Phytase Assay (*Aspergillus ficuum*, Sigma) ein weiteres Verfahren etabliert, um Verbindungen im Chromatogramm genauer zu charakterisieren. Hierzu wurden HCPs ($6 \cdot 10^6$) extrahiert (Kapitel 2.4). Die getrockneten Extrakte wurden in jeweils 500 µl Zitronensäure (1mM, pH 3,0; HCl) aufgenommen und mit 10 µl einer 3-Phytase-Lösung (2,8 mg 3-Phytase*ml⁻¹, 1 mM Zitronensäure pH 3,0 ;HCl) inkubiert. Zu definierten Zeitpunkten (0 min, 10 min, 30 min und 60 min) wurden die Reaktionen durch die Zugabe von 44 µl TCA (100% w/v) gestoppt. Die Überstände der Proben (Kühlzentrifuge, Hettich; Mikro rapid/K, 3 °C, 5 min, 16000g) wurden, wie in Kapitel 2.4.2 beschrieben, mit Diethylether behandelt, bevor sie mit der alkalischen *mdd*-HPLC analysiert wurden.

2.7 Versuche zur Stimulation des pflanzlichen Phosphoinositidsystems in HCPs

Die Protoplasten wurden, wie in Kapitel 2.2 beschrieben, isoliert und in 5 Versuchsreihen (Auxin-Behandlung, mechanische Stimulatuion, simulierte Schwerelosigkeit, hyper g-Stimulation und μ g-Flugexperiment) verwendet. Nach Fixierung der Proben (Kapitel 2.4.1) wurden die Ins(1,4,5)P₃-Gehalte über die alkalische *mdd*-HPLC (Kapitel 2.5) quantitativ bestimmt. Unabhängig vom Versuchsansatz wurden je Probe 1,5 ml Suspension ($3,5 \cdot 10^6$ HCPs*ml⁻¹) eingesetzt.

2.7.1 Stimulation der Protoplasten durch Auxin

In dieser Versuchsreihe sollte der Einfluß von Auxin (IAA) auf das PI-System von Protoplasten getestet werden. Für die Versuche wurde die in Kapitel 2.3.2 beschriebene IAA-Stammlösung (10 mM) benutzt. Von dieser Stammlösung wurden jeweils 15 μ l (final, 100 μ M IAA) in die HCP-Suspensionen pipettiert und durch vorsichtiges Schwenken ($3 \cdot 180^\circ$) in die Probe eingemischt. Zu vorgegebenen Zeitpunkten (15 s, 30 s, 60 s) wurden die Proben fixiert. Die Kontrollen wurden in ähnlicher Weise behandelt, jedoch wurden statt Auxin 15 μ l KCl-Puffer II (Tabelle 2) zugegeben.

2.7.2 Mechanische Stimulation von Protoplasten

Um den Einfluß mechanischer Stimulation auf das Phosphoinositid-System von HCPs zu untersuchen, wurden HCP-Suspensionen auf einem Vertikal-Schüttler mechanisch stimuliert (Abb. 8). Das Experiment erfolgte zunächst mit den Varianten Kontrolle, 5 min und 15 min schütteln und wurde später um eine Versuchsreihe erweitert. Bei dieser Variante wurden die HCPs zunächst 15 min mechanisch stimuliert, anschließend wurden sie jedoch für weitere 15 min ruhig gelagert, bevor sie wie die anderen Proben fixiert wurden.

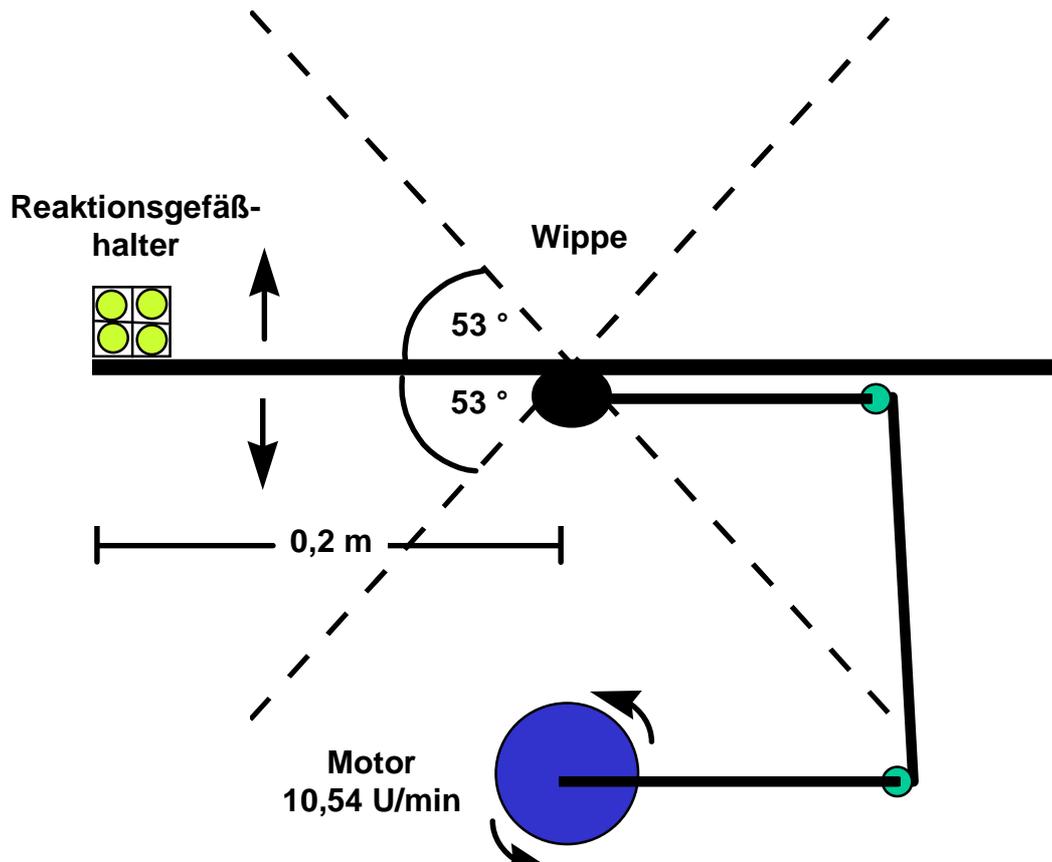


Abb. 8: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus zur mechanischen Stimulation von HCP-Suspensionen. Protoplasten wurden in 2 ml Reaktionsgefäßen auf einem Kreisbogen (Hub: 0,32 m, 0,176 Hz) vertikal geschüttelt und zu vorgegebenen Zeitpunkten fixiert.

2.7.3 Stimulation von Protoplasten durch simulierte Schwerelosigkeit

Zur Stimulation von HCPs durch simulierte Schwerelosigkeit wurde ein schnelldrehender Klinostat verwendet, der bei Brigleb (1967) beschrieben ist. Für die Experimente wurden jeweils 1,5 ml Protoplasten-Suspension in eine Einwegpipette (Falcon, \varnothing 3 mm) aufgenommen und rotiert (60 rpm; 1, 3 und 7 min). Zur Kontrolle wurden befüllte Pipetten einfach neben dem Klinostaten gelagert. Nach der Fixierung wurden die Proben für die HPLC-Analyse vorbereitet (Kapitel 2.4) und mit der alkalischen *mda*-HPLC analysiert.

2.7.4 Hyperg Stimulation von Protoplasten

In Zusammenarbeit mit dem *microgravity user support center* (MUSC, DLR Köln Porz) wurden drei Experimente durchgeführt, um die hyperg-Phasen (8 und 13 g) des Flugexperimentes *TEXUS 35* zu simulieren und deren Einfluß auf das pflanzliche PI-System zu untersuchen. Hierzu wurden 1,5 ml HCP-Suspension (Kapitel 2.2) in 2 ml Reaktionsgefäße gefüllt und in einer *multisample-incubator-centrifuge* mit den entsprechenden g-Leveln (Tabelle 6) zentrifugiert.

Tabelle 6: Versuchsplan zur hyperg-Stimulation von HCPs

Experiment	hyperg			Kontrolle		
	g-Level [9.81 ms^{-2}]/Dauer [s]		n	g-Level [9.81 ms^{-2}]/Dauer		
A	8/29	--	--	4	1/29	4
B	--	--	13/35	4	1/35	4
C	8/75	1/355	13/35	4	1/465	4
Summe				12		12

Nach der Fixierung wurden die Proben für die HPLC-Analyse vorbereitet (Kapitel 2.4) und mit der alkalischen *mdd*-HPLC analysiert.

2.7.5 µg-Flugexperiment *TEXUS 35*

Im Flugexperiment *TEXUS 35* wurde der Einfluß von mikro-Gravitation (μg) auf das Phosphoinositid-System von pflanzlichen Zellen untersucht. Das Experiment wurde in Zusammenarbeit mit der DARA (Deutsche Agentur für Raumfahrt Angelegenheiten; heute DLR, Deutsches Zentrum für Luft- und Raumfahrt) im November 1996 auf Esrange in Kiruna (Nord-Schweden) durchgeführt. Die Nutzlast (Abb. 9) der Rakete vollzog einen Parabelflug mit ca. 6 min μg -Bedingungen.

Hierzu wurden *Helianthus annuus* Hypokotyle am Versuchsstandort angezogen und protoplastiert (Kapitel 2.2). Anschließend wurden die HCPs in 337 mM KCl, 13,6 mM CaCl_2 , 10 mM MES, pH 5,6 (KOH) resuspendiert ($4 \cdot 10^6$ HCPs/ml) und in Einwegspritzen (2,5 ml; 1,5 ml Suspension) abgefüllt, die jeweils über einen Adapter mit einer zweiten Spritze verbunden waren, die das Fixiermittel (30 % TCA [w/v], 0,5 ml) enthielten. Der Adapter war mit einem Viton-Bällchen verschlossen. Die Experimentiereinheiten wurden in die vorgekühlten Module (TEM-06-21, ERNO-

Raumfahrttechnik GmbH, 4°C) eingesetzt und ca. 2h vor *lift off* in die Nutzlast eingebaut, wo sie langsam auf 23 °C temperiert wurden. Über Peltier-Elemente wurde die Temperatur während des gesamten Fluges konstant gehalten.

Tabelle 7: Versuchsplan des µg-Flugexperimentes *TEXUS 35*

Event	1	2	3	3	5	6	7	8	9
Zeit [s]*	-22	29	72	137	202	267	332	397	465
g**	1	8	µ	µ	µ	µ	µ	µ	13
n	4	4	4	4	4	4	4	4	4

*= Zeitpunkt vor bzw. nach Start, ** = Erdbeschleunigung [9,81 m/s²]

Nach einem vorgegebenen Zeitplan (Tabelle 7) konnten Proben zu einzelnen Terminen fixiert werden, indem das Fixiermittel in die Protoplasten-Suspension injiziert wurde.

Die Nutzlast konnte ca. 60 min nach der Landung (Außentemperatur ca. -20°C) geborgen und die Proben wie üblich (Kapitel 2.4) aufgearbeitet werden. Allerdings erfolgte die Aktivkohlebehandlung und Festphasenextraktion aus technischen Gründen erst in Bonn. Deshalb war eine Zwischenlagerung (-80°C) der TCA-freien Proben und ein Trockeneistransport nach Bonn erforderlich. Die Quantifizierung der Ins(1,4,5)P₃-Gehalte erfolgte über die alkalische *mdd*-HPLC.

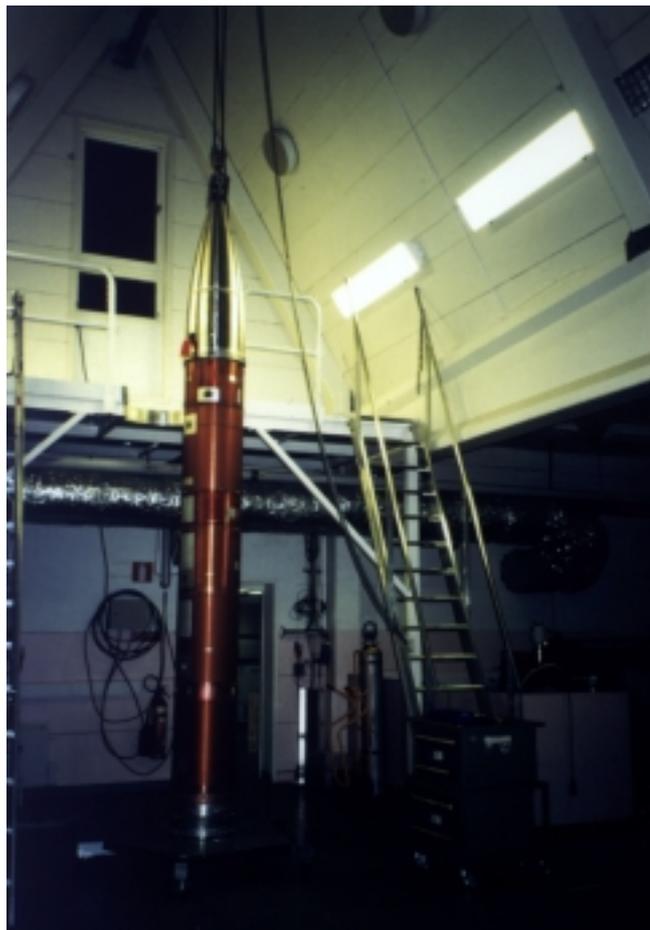


Abb. 9: Nutzlast der *TEXUS 35* Rakete.

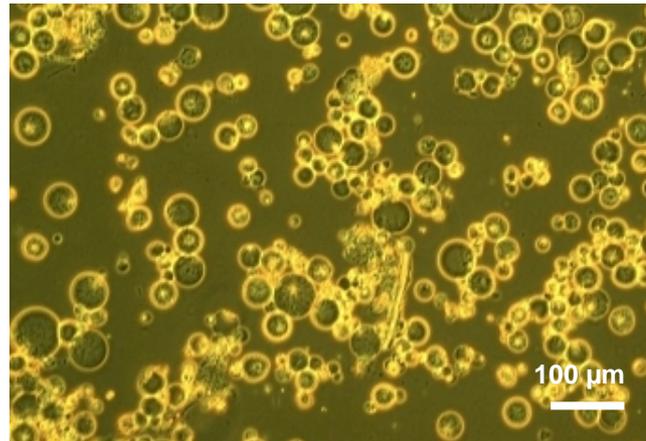
3 Ergebnisse

3.1 Reinigung und Vitalität der Hypokotylprotoplasten

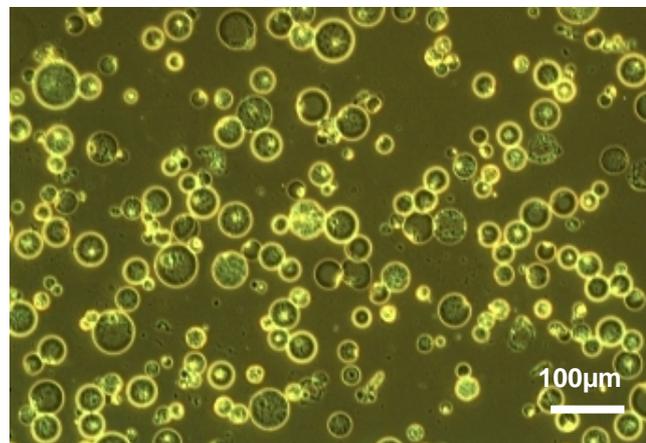
Wie lichtmikroskopische Untersuchungen von HCP-Suspensionen zeigten, konnten über eine Reinigung im Saccharose-Puffer I Stufengradient (Tabelle 2) die enthaltenen Zellwandfragmente und Zeltrümmer nicht vollständig abgetrennt werden (Abb. 10 a). Mit der Etablierung eines weiteren Reinigungsschrittes, bei dem zur Minderung der Dichte des Stufengradienten Saccharose-Puffer II und KCl-Puffer II (Tabelle 2) im Verhältnis 1:1 gemischt wurden, konnten dann auch letzte Verunreinigungen abzentrifugiert werden (Abb. 10 b).

Die durchgeführten Vitaltests (lichtmikroskopische Untersuchung, FDA-Färbung) ergaben für diese hochreine Protoplastenfraktion einen Anteil vitaler Protoplasten von über 95 % (Abb. 10 b und c).

a) HCPs nach der Reinigung über den Saccharose Stufengradient mit 100 % Saccharose-Puffer I (Tabelle 2).



b) HCPs nach der weiteren Reinigung über einen Stufengradient mit 50 % Saccharose-Puffer II und 50 % KCl-Puffer II (Tabelle 2).



c) Vitalfärbung von HCPs mit Fluoresceindiaceat (bei UV-Anregung).

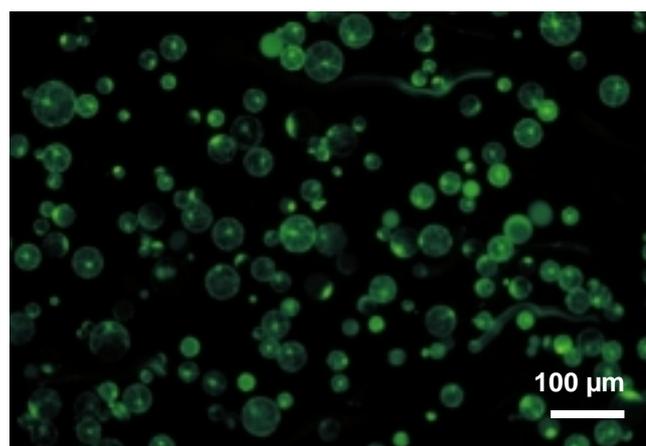


Abb. 10: Licht- und Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen zur Reinheit (a und b) und Vitalität (b und c) von HCPs (Nikon Eclipse TE 300 mit Phasenkontrast, 100 fach).

3.2 Einfluß von Auxin auf die PM/H^+ -ATPase in HCP-Suspensionen

Für spätere Experimente zur Aktivierung des PI-Systems durch Auxin war sicherzustellen, daß die Protoplasten eine Auxin-abhängige Reaktion zeigen. Hier bot sich die Untersuchung der PM/H^+ -ATPase an, da die aktivierende Wirkung von Auxin auf dieses Enzym vielfach beschrieben ist und wahrscheinlich über einen Rezeptorvermittelten Signaltransduktionsprozess erfolgt (Kapitel 1.3). An Protoplasten konnte eine Auxin-abhängige Aktivierung der PM/H^+ -ATPase allerdings bisher nicht gezeigt werden. Die Experimente gliederten sich daher in die folgenden fünf Teilschritte, wobei neben Auxin auch Fusicoccin als Effektor eingesetzt wurde (Kapitel 2.3.2):

Kapitel 3.2.1: Einfluß des Puffers

Kapitel 3.2.2: Wirkung der Auxinkonzentration

Kapitel 3.2.3: Wirkung des H^+ -ATPase-Inhibitors DCCD

Kapitel 3.2.4: Vergleich von Auxin und Fusicoccin

Kapitel 3.2.5: Wirkung des PI-System-Inhibitors Neomycin

Zur Bestimmung der *in vivo* PM/H^+ -ATPase-Aktivität wurde der extrazelluläre pH-Wert von Protoplasten-Suspensionen mittels pH-Elektrode gemessen (Kapitel 2.3.1).

3.2.1 Einfluß der Pufferzusammensetzung auf die Auxin-abhängige Aktivierbarkeit der $PM H^+$ -ATPase

Für diese Experimente wurden die Saccharose Puffer II und KCl-Puffer II (Tabelle 2) entsprechend der gewünschten Finalkonzentrationen an Saccharose und KCl gemischt (Abb. 11). Die Protoplastensuspensionen zeigten hierbei schon in der Anfangsphase der Messungen in Abhängigkeit der Pufferzusammensetzung deutliche Unterschiede bei der pH-Entwicklung. Während bei hohen Saccharosekonzentrationen (250 und 175 mM) schon nach 2 – 3 Minuten ein gleichmäßiger pH-Abfall gemessen wurde, kam es bei niedrigen Saccharosekonzentrationen zu einer wesentlich längeren Vorlaufphase (ca. 10 – 15 min), bei der der pH-Wert sehr stark schwankte. Weiterhin zeigte sich im Hinblick auf die Aktivierbarkeit der PM/H^+ -ATPase durch Auxin eine deutliche Abhängigkeit von der Saccharosekonzentration des Puffermediums.

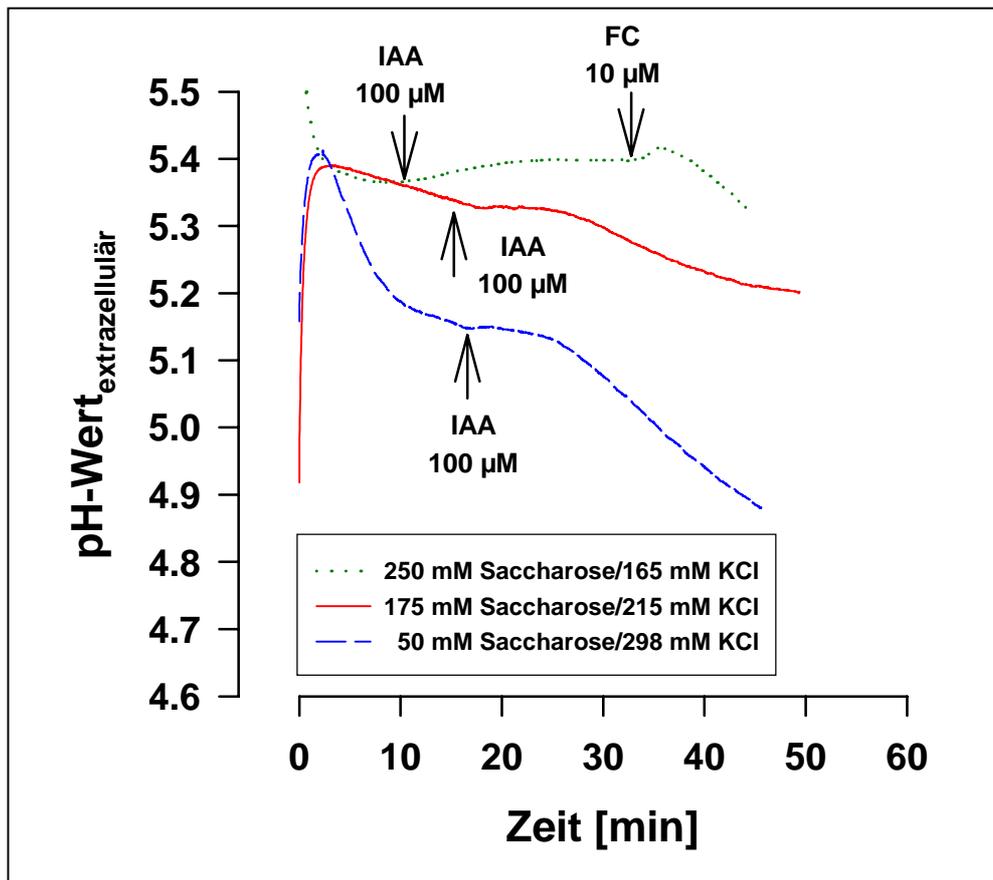


Abb. 11: Einfluß der Saccharose- und KCl-Konzentration des Puffers auf die Aktivierbarkeit der PM/H^+ -ATPase durch Auxin (IAA, 100 μ M) und Fusicoccin (FC, 10 μ M).

So konnte erst bei Konzentrationen < 50 mM eine starke und reproduzierbare Stimulation der PM/H^+ -ATPase nachgewiesen werden. Bei Saccharosekonzentrationen von 175 und 250 mM konnte hingegen nach Zugabe von Auxin keine Aktivierung gemessen werden. Daher wurden für alle weiteren Experimente Puffer mit geringer Saccharosekonzentration (< 50 mM) verwendet. Im Gegensatz zur Auxin-Variante konnte die PM/H^+ -ATPase durch Fusicoccin (10 μ M) auch bei einer Saccharosekonzentration von 250 mM stimuliert werden.

3.2.2 Wirkung der Auxinkonzentration auf die Aktivität der PM/H^+ -ATPase

In zweiphasigen Experimenten wurde die Aktivität der PM/H^+ -ATPase in Abhängigkeit von der Auxinkonzentration untersucht. Zur Kontrolle wurde jedoch zunächst der

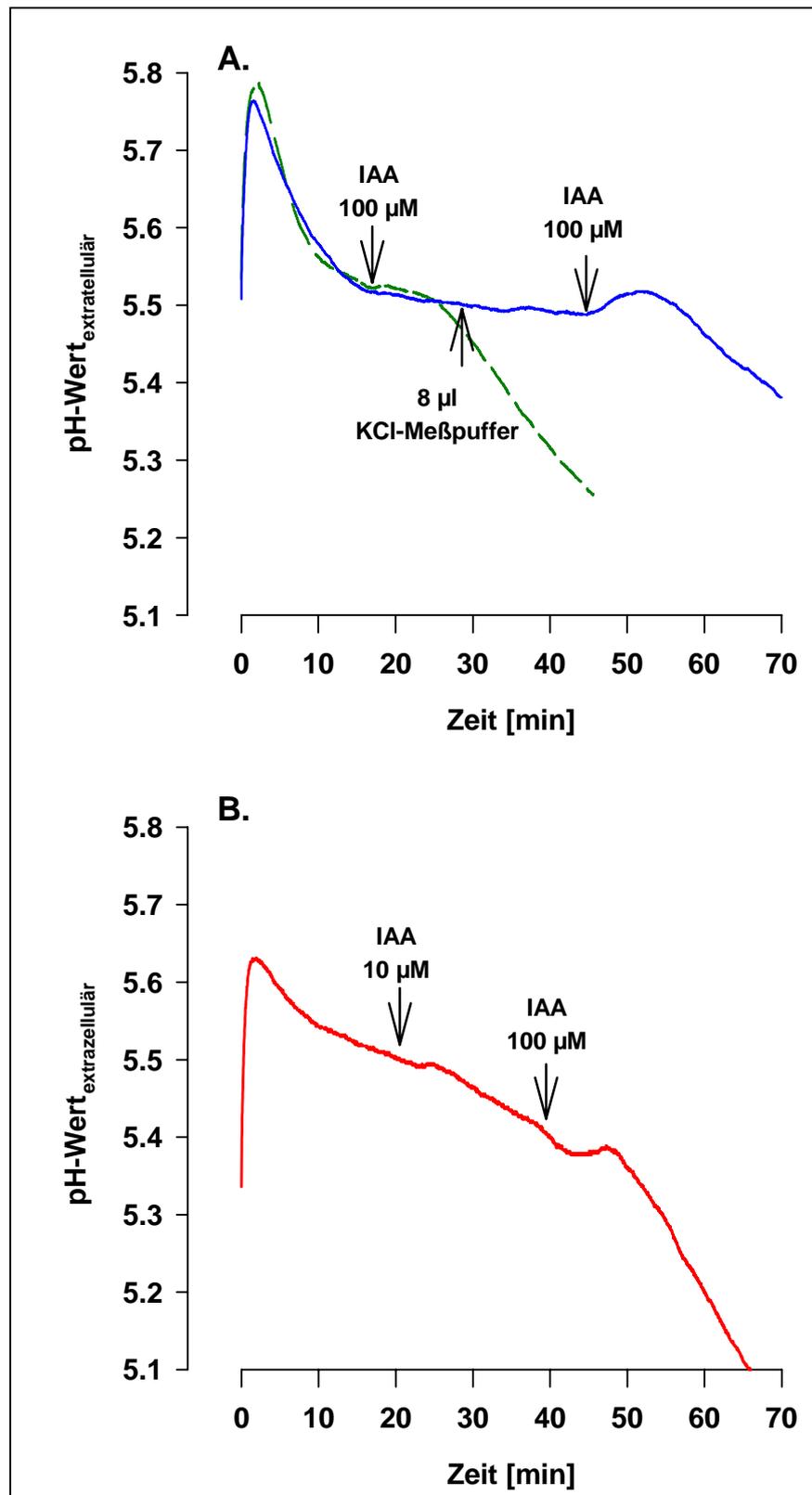


Abb. 12: Einfluß von Auxin (IAA) auf die *in vivo* PM/H^+ -ATPase von HCPs. **A:** Aktivierung der PM/H^+ -ATPase durch IAA (100 μ M) zu unterschiedlichen Zeitpunkten im Vergleich zur Kontrolle (8 μ l KCl-Meßpuffer II); **B:** Einfluß unterschiedlicher IAA-Konzentrationen auf die Aktivität der PM/H^+ -ATPase.

Einfluß der Auxin-Zugabe überprüft. Hierzu wurde der Suspension zunächst ein äquivalentes Volumen an KCl-Puffer II zugesetzt (Abb. 12 A.). Hierdurch traten keinerlei Veränderungen des extrazellulären pH-Wertes auf, während die nachfolgende Applikation von Auxin (100 μM) wiederum zu einer deutlichen Abnahme der pH-Werte führte. Auch bei geringeren Auxinkonzentrationen (10 μM) konnte eine Aktivierung der PM/H^+ -ATPase gemessen werden. Bei hohen Auxinkonzentrationen waren die Effekte jedoch deutlich größer (Abb. 12 B.).

3.2.3 Wirkung des H^+ -ATPase –Inhibitors DCCD auf die Auxin-abhängige Aktivierbarkeit der PM/H^+ -ATPase

In einem weiteren Experiment wurde der Einfluß eines ATPase-Inhibitors auf die Protoplasten untersucht. Dazu wurden die Protoplasten zunächst für 15 min mit dem H^+ -ATPase Inhibitor N,N'-Dicyclohexylcarbodiimide (DCCD, 50 μM) vorinkubiert.

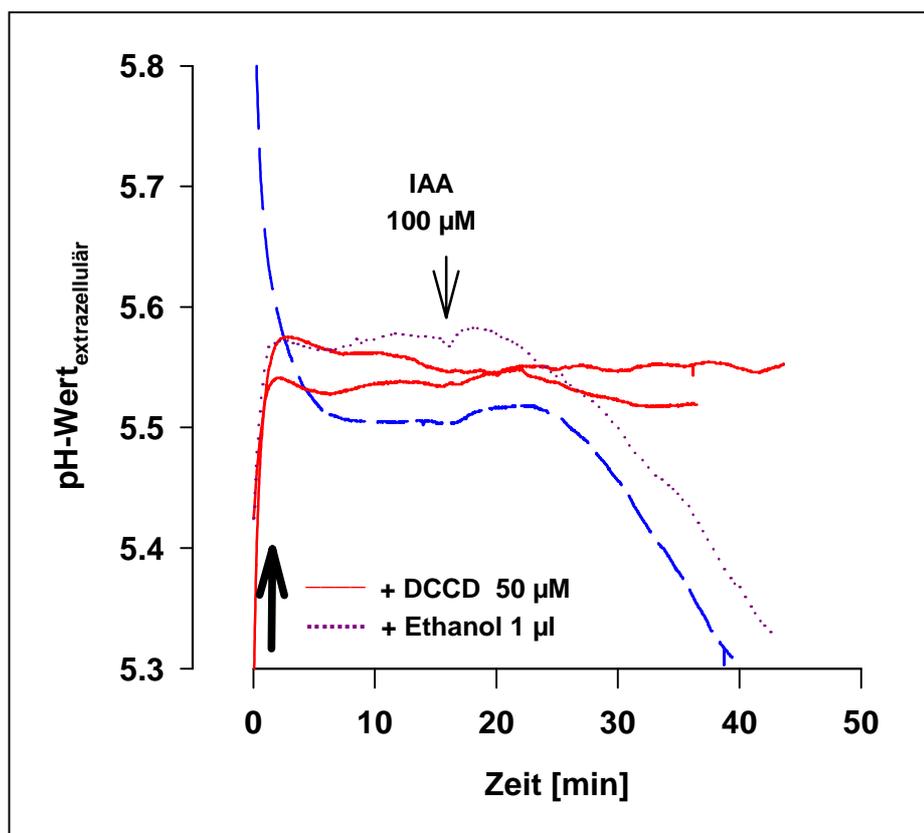


Abb. 13: Inhibierung der Auxin-induzierten Aktivierung der PM/H^+ -ATPase durch N,N'-Dicyclohexylcarbodiimide (DCCD, 50 μM). --- Kontrolle 1 (IAA 100 μM), Kontrolle 2 (Ethanol, 1 μl), — DCCD (50 μM).

Abbildung 13 macht deutlich, daß sich der Auxin-Effekt durch DCCD hemmen ließ. Kontrollproben, die lediglich mit dem Lösungsmittel Ethanol inkubiert wurden, reagierten im Gegensatz zur DCCD Variante sehr deutlich auf die Auxin-Zugabe.

3.2.4 Vergleich der Auxin- und Fusicoccin-abhängigen Aktivierbarkeit der PM/H^+ -ATPase

Wie schon in Abbildung 11 dargestellt, kann die PM/H^+ -ATPase sowohl über Auxin als auch Fusicoccin aktiviert werden. Im direkten Vergleich ergeben sich jedoch in der Wirksamkeit und Länge der lag-Phase markante Unterschiede, wie aus Abbildung 14 deutlich wird. So zeigen sich bei Fusicoccin bereits nach ca. 3 min deutliche Effekte, während bei der Auxin-Variante ein Effekt erst nach ca. 10 min meßbar war. Über eine Titration mit H^+ (80 nmol) war es möglich die Wirksamkeit der beiden Effektoren zu beurteilen. Es wird deutlich, daß keine Unterschiede in der Pufferkapazität der beiden

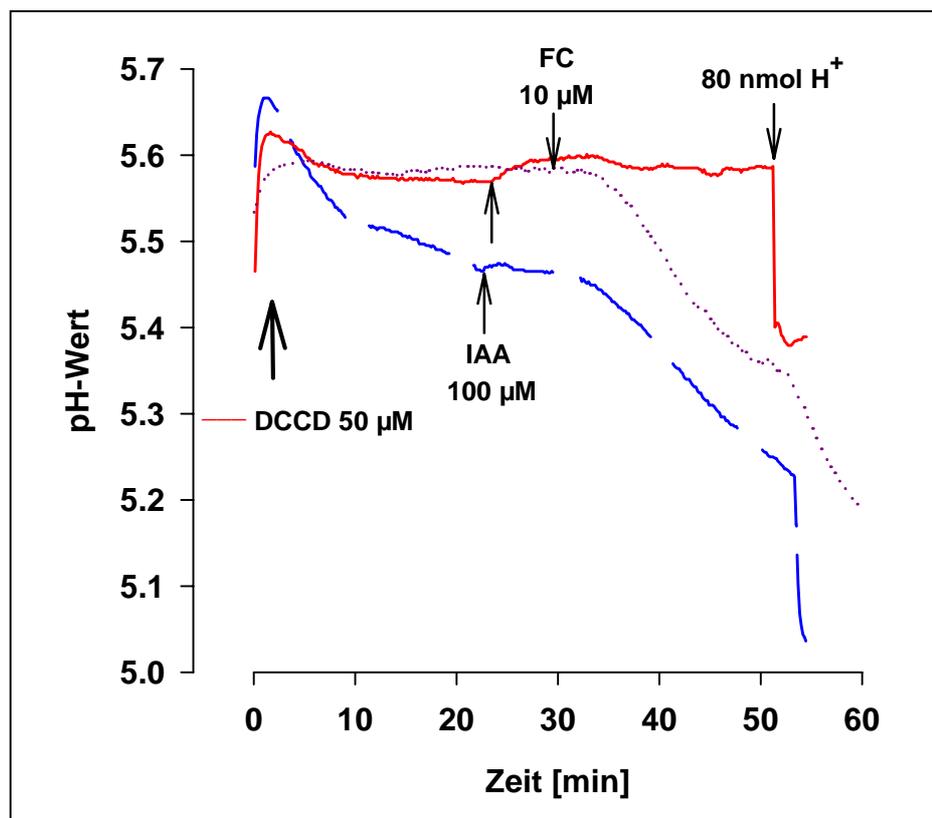


Abb. 14: Stimulation von Protoplastensuspensionen mit Fusicoccin (FC 10 μ M, \cdots), Auxin (IAA 100 μ M, $---$) und Inhibierung der PM/H^+ -ATPase durch N,N'-Dicyclohexylcarbodiimide (DCCD 50 μ M, $---$). Die Protonenabgabe und Pufferkapazität wurde für alle Varianten durch Titration (80 nmol H^+) bestimmt.

Varianten auftraten. Die quantitative Auswertung ergab, daß Fusicoccin schon bei einer vergleichsweise geringen Konzentration (10 μM) eine deutliche Aktivierung der PM/H^+ -ATPase bewirkte (10,2 $\text{nmol H}^+\text{min}^{-1}$ pro 10^6 HCPs). Demgegenüber war bei der Auxin-Variante eine Aktivität der PM/H^+ -ATPase in ähnlicher Größenordnung (6,87 $\text{nmol H}^+\text{min}^{-1}$ pro 10^6 HCPs) erst bei einer wesentlich stärkeren Konzentration (100 μM) meßbar. Weiterhin konnte gezeigt werden, daß DCCD keinen Einfluß auf die Pufferkapazität der Suspension hatte.

3.2.5 Einfluß des Phosphoinositid-System-Inhibitors Neomycin auf die Auxin-abhängige Aktivierung der PM/H^+ -ATPase

Mit diesen Experimenten sollte geprüft werden, ob das pflanzliche PI-System direkt an einer Auxin-abhängigen Aktivierung der PM/H^+ -ATPase beteiligt ist. Zur Inhibierung des PI-Systems wurde Neomycin eingesetzt, das eine Hydrolyse von PIP_2 durch die PLC inhibiert (Gabev et al., 1989; Chen and Boss, 1991; Kim et al., 1996).

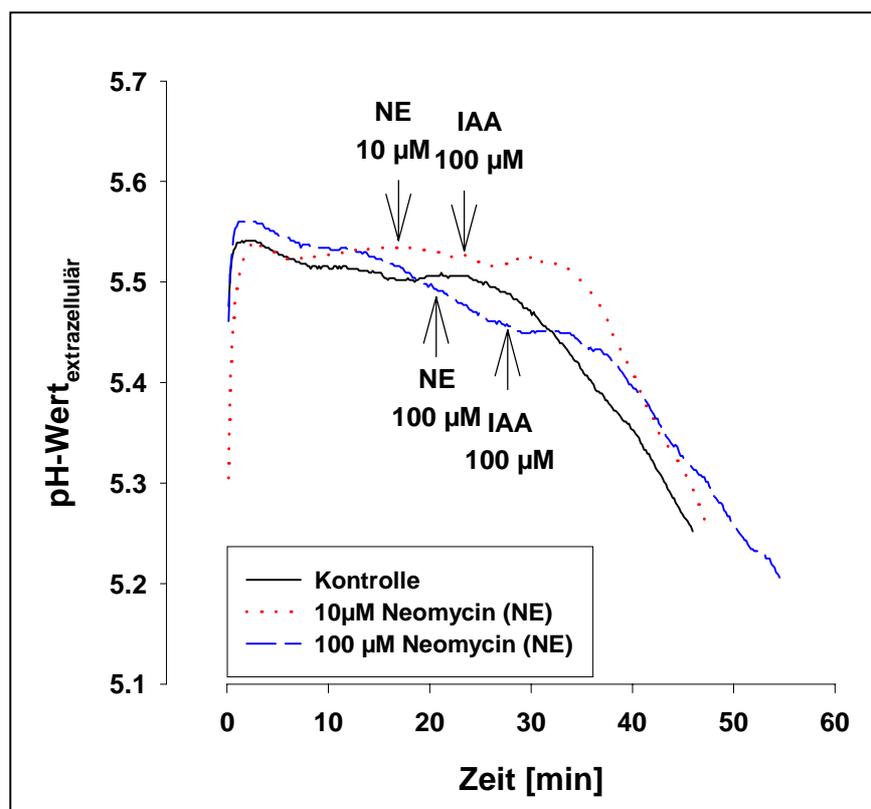


Abb. 15: Einfluß von Neomycin (NE, 10 und 100 μM) auf die Aktivierbarkeit der PM/H^+ -ATPase von HCPs durch Auxin (IAA, 100 μM).

Hierzu wurden die Protoplasten zunächst 10 min vor Zugabe des Auxins (100 μM) mit Neomycin (10, 100 μM (Sigma)) inkubiert. Wie aus Abbildung 15 deutlich wird, konnte ein Einfluß auf die Auxin-abhängige Aktivierung der *PM/H⁺-ATPase* unter diesen Bedingungen allerdings nicht nachgewiesen werden.

3.3 Nachweis von Inositolphosphaten

Mit dem modifizierten *mdd*-HPLC-System (Kapitel 2.5.1) konnte $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ ohne radioaktive Markierung mit einer Sensitivität von ca. 10 pmol nachgewiesen werden. Bedingt durch die inerte Auslegung des micro-bore Systems (Bio-Tek-Kontron) konnten die Inositolphosphate sowohl im alkalischen Bereich (pH 7,5 – 8,1) (alkalische *mdd*-HPLC) als auch im stark sauren Bereich (0,4 M HCl; saure *mdd*-HPLC) aufgetrennt werden. Wie die Abbildungen 16 und 17 zeigen hat der pH-Wert der Eluenten (Tabelle 3) einen deutlichen Einfluß auf das Retentionsverhalten der Inositolphosphatisomere. Dies war insofern von besonderer Bedeutung, da hierdurch die

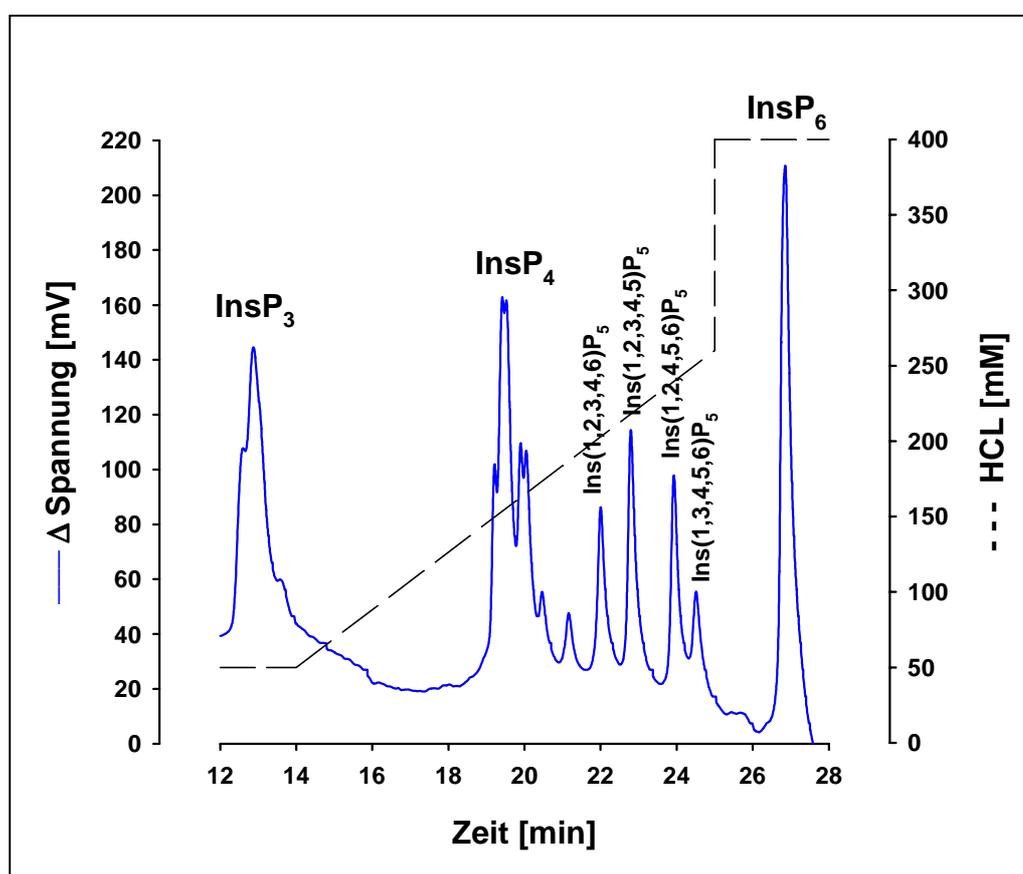


Abb. 16: Saure *mdd* HPLC. Trennung eines InsP_6 -Hydrolysates mit dem micro-bore-System (Bio-Tek-Kontron, Pump 422).

Eluent: A: 0,2 mM HCl , 15 μM YCl_3 .

B: 400 mM HCl, 22 μM YCl_3

Gradient: 0 – 0.4 M HCl / Fluß: 400 $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$

Farbreagenz: 1,6 M TEA (300 μM PAR, pH 9 (HCl) / Fluß: 210 $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$

Säule: miniQ PC (Pharmacia)

Möglichkeiten zur isomerspezifischen Untersuchung von Inositolphosphaten in Pflanzenextrakten deutlich erhöht wurden.

In Abbildung 16 ist das Elutionsprofil eines InsP_6 -Hydrolysates dargestellt, das unter sauren Bedingungen aufgetrennt wurde. Mit diesem System konnten Isomere im InsP_3 -Bereich kaum getrennt werden, während sich die stärker phosphorylierten Inositolphosphate (InsP_4 und InsP_5) deutlich besser trennen ließen. Im InsP_5 -Bereich konnte sogar eine Trennung aller 4 nicht-enantiomeren Pentakisphosphate erreicht werden.

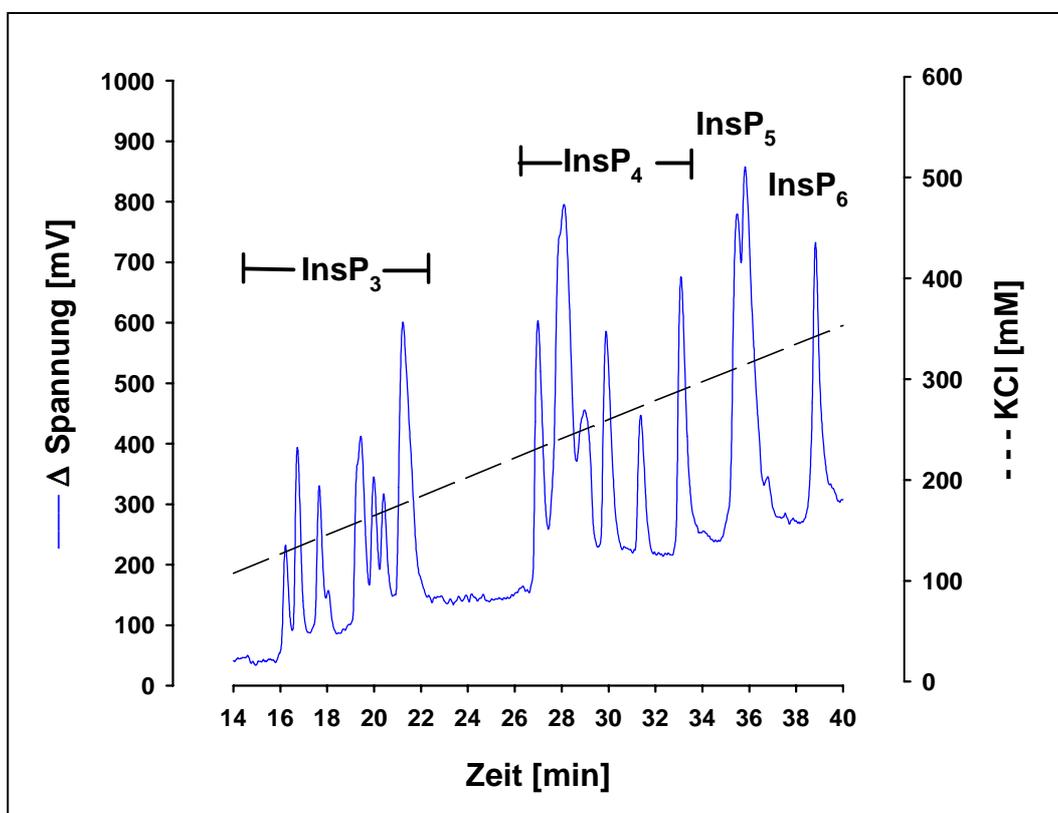


Abb. 17: Alkalische *mdc* HPLC. Auftrennung eines InsP_6 -Hydrolysates mit dem micro-bore-System (Bio-Tek-Kontron, Pump 422).

Eluent: A: 20 mM TEA (pH 7,8 (HCl))
 B: 600 mM KCl, 20 mM TEA (pH 8,1 (HCl))
 Gradient: 0 – 0.6 M KCl / Fluß: $400 \mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$
 Farbreagenz: 2 mM HCl, 200 μM PAR, 30 μM YCl_3 / Fluß: $210 \mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$
 Säule: miniQ PC (Pharmacia)

Unter alkalischen Bedingungen konnten demgegenüber die Isomere des InsP_3 -Bereichs sehr gut getrennt werden, während die Isomere des InsP_5 -Bereichs deutlich schlechter getrennt wurden. Für den InsP_4 -Bereich war kein Einfluß des pH-Wertes auf das Retentionsverhalten der Isomere zu beobachten (Abb. 17).

Aufgrund der hohen Isomerentrennschärfe dieses Systems für den InsP_3 -Bereich wurde daher für die Untersuchung des *second messengers* $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ in Pflanzenextrakten die alkalische *mdc*-HPLC verwendet.

3.4 Qualitativer Nachweis von $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ in HCP-Extrakten.

$\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ wurde in HCP-Extrakten zunächst über die Retentionszeit und eine interne Standardisierung mit kommerziellem $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ nachgewiesen. Da aber auch Di- und Tricarbonsäuren eine Abnahme der Absorption bewirken, wurde ein selektiver Abbau der Phosphorsäureester in den HCP-Extrakten mit einer 3-Phytase (Kapitel 2.6.4) durchgeführt, um Fehlinterpretationen auszuschließen. Als weitere Kontrolle wurde zusätzlich eine UV-Detektion in das *mdc*-HPLC-System integriert, wodurch eine mögliche Koelution mit Nukleotiden überprüft werden konnte. Schließlich wurden HCP-Extrakte über die saure *mdc*-HPLC analysiert, da in diesem System Nukleotide, Zuckerphosphate (Glucose 1,6-bisphosphat, Fructose 1,6-bisphosphat), Polyphosphate (PP_i) und Glycerat 2,3-bisphosphat deutlich vor InsP_3 eluieren (Mayr, 1990).

3.4.1 Identifizierung von Ins(1,4,5)P₃ über die Retentionszeit und die interne Standardisierung

In HCP-Extrakten konnte mit der alkalische *mdd*-HPLC über die Retentionszeit, ein Peak nachgewiesen werden, der mit Ins(1,4,5)P₃ koeluierte (Abb. 18). Der Nachweis gelang sowohl über externe als auch interne Standardisierung mit einem Ins(1,4,5)P₃-Standard.

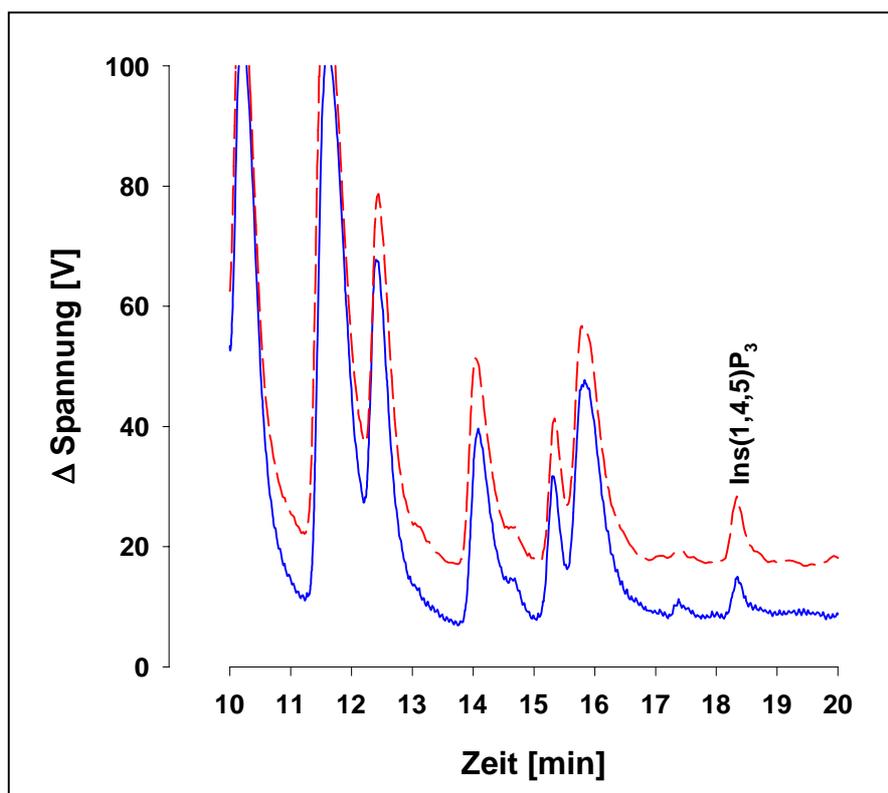


Abb. 18: Alkalische *mdd*-HPLC von HCP-Extrakten. Unteres Chromatogramm ohne Ins(1,4,5)P₃-Standard (—) und oberes Chromatogramm mit Ins(1,4,5)P₃ (20 pmol) als internem Standard (- - -).

HPLC-System: micro bore (Bio-Tek-Kontron, Pump 422)

Eluent: A: 20 mM TEA (pH 7,8 (HCl))

B: 600 mM KCl, 20 mM TEA (pH 8,1 (HCl))

Gradient: 0 – 0.6 M KCl / Fluß: 400 µl*min⁻¹

Farbreagenz: 2 mM HCl, 200 µM PAR, 30 µM YCl₃ / Fluß: 210 µl*min⁻¹

Säule: miniQ PC (Pharmacia)

3.4.2 3- Phytase-Abbau von HCP-Extrakten

In diesem Versuchsansatz sollte in einer negativ-Kontrolle geprüft werden, ob möglicherweise Di- und Tricarbonsäuren für die Absorptionsveränderungen im InsP_3 -Bereich verantwortlich sind. Deshalb wurden HCP-Extrakte mit einer 3-Phytase inkubiert und anschließend die Extrakte über die alkalische *mdd*-HPLC analysiert. Die Ergebnisse der Zeitreihenuntersuchung sind in Abbildung 19 dargestellt.

Im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 19 A.) wird deutlich, daß aufgrund der katalytischen Eigenschaften der 3-Phytase zunächst die stärker phosphorylierten Inositolphosphate ($\geq \text{InsP}_5$) der HCP-Extrakte durch die 3-Phytase abgebaut wurden (Abb. 19 B., C). Da im weiteren Verlauf des Abbaus alle Verbindungen hydrolysiert wurden, konnte sichergestellt werden, daß es sich bei dem fraglichen $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ -Peak nicht um eine Di- oder Tricarbonsäure handelte (Abb. 19 D.).

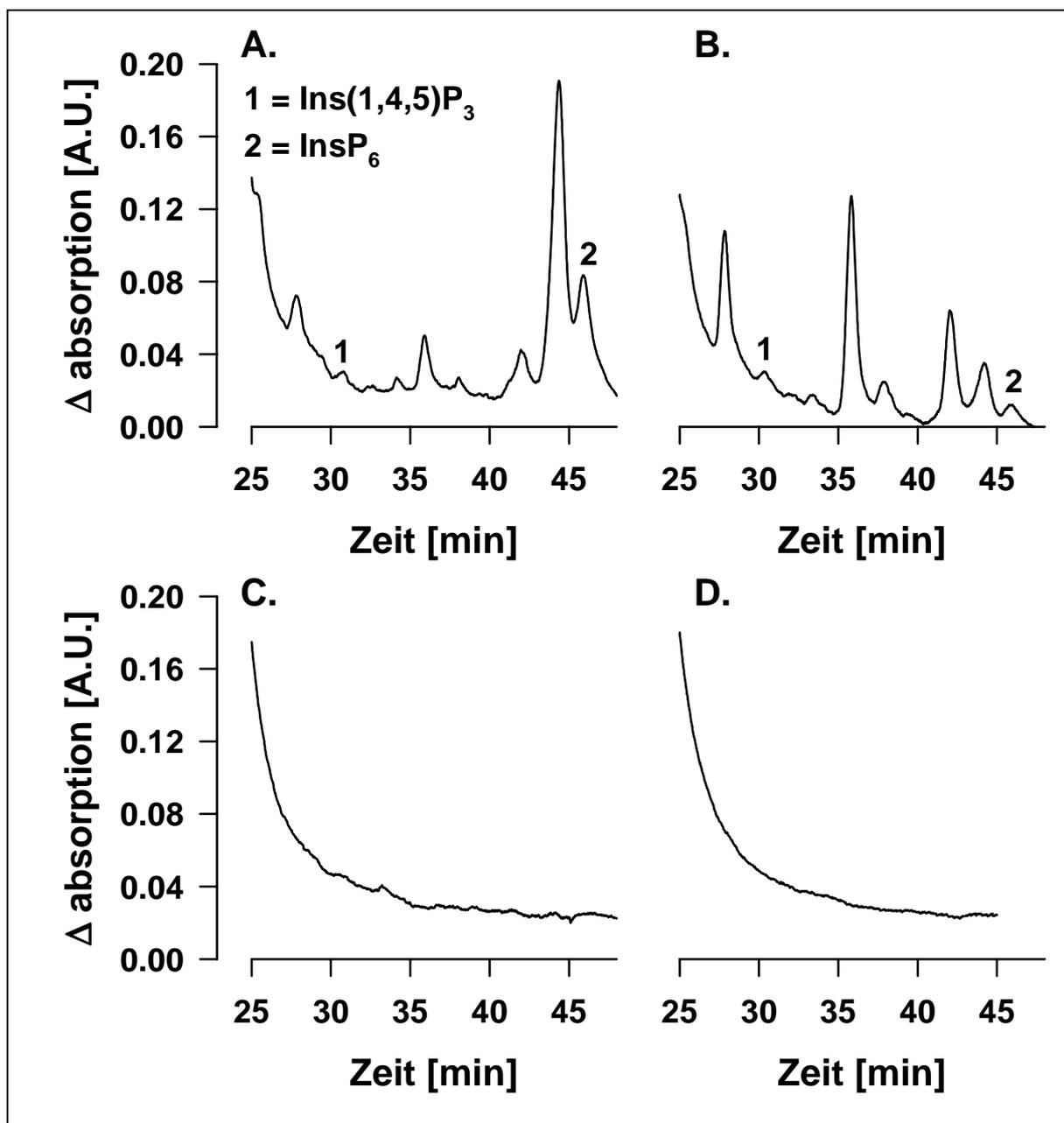


Abb. 19: Abbau von HCP-Extrakten. HCP-Extrakte wurden mit einer 3-Phytase inkubiert und zu unterschiedlichen Zeitpunkten (A. = 0 min, B. = 10 min, C. = 30 min, D. = 60 min) fixiert und mittels alkalischer *mdc*-HPLC analysiert.

HPLC-System: System Gold (Beckmann, Pump 126)

Eluent: A: 20 mM TEA (pH 7,8 (HCl))

B: 600 mM KCl, 20 mM TEA (pH 8,1 (HCl))

Gradient: 0 – 0.6 M KCl / Fluß: 750 µl*min⁻¹

Farbreagenz: 2 mM HCl, 200 µM PAR, 30 µM YCl₃ /Fluß: 400 µl*min⁻¹

Säule: Source 15 Q (Pharmacia, 4,6 x 250 mm)

3.4.3 UV/VIS-Analyse von HCP-Extrakten

Im Gegensatz zu Inositolphosphaten können Nucleotide aufgrund konjugierter Doppelbindungen sowohl über UV-Absorption als auch über das Nachsäulenreagenz der *mdd*-HPLC nachgewiesen werden. Integriert man zusätzlich einen UV-Detektor in das *mdd*-HPLC-System, eröffnet sich somit die Möglichkeit zwischen UV absorbierenden- und nicht-UV-absorbierenden Substanzen zu differenzieren (Abb. 20 A./B.). Die Inositolphosphate (Ins(1,4,5)P₃ und InsP₆) zeigten - wie erwartet - keine Absorption bei 254 nm. Im Gegensatz dazu, konnte ATP mit beiden Detektionssystemen (UV/VIS) nachgewiesen werden (Abb. 20 A.). Aufgrund des wesentlich geringeren Rauschens der UV-Basislinie ließ sich ATP mit dem UV-Detektor sogar noch deutlich

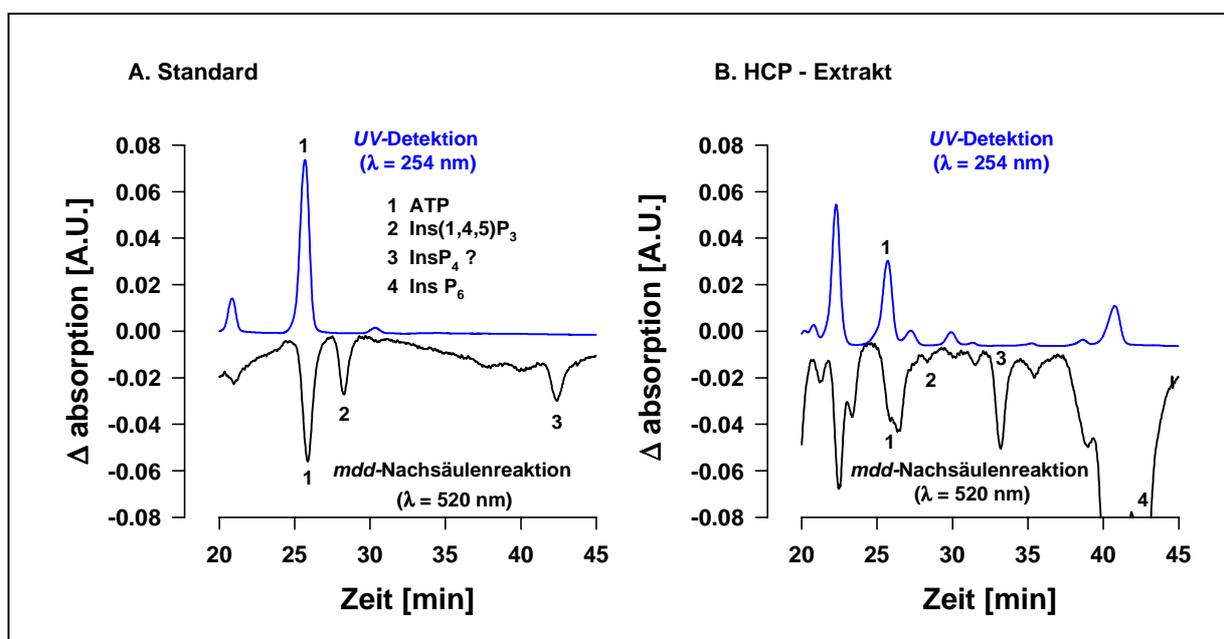


Abb. 20: Zwei-Wellenlängen HPLC-Analyse. A.: Inositolphosphat- und Nucleotid-Standards (Ins(1,4,5)P₃, InsP₆ und ATP) und B.: HCP-Extrakte wurden mit integrierter UV-Detektion (= 254 nm) und nachgeschalteter Nachsäulenreaktion (metal-dye-detection, = 520 nm) analysiert.

HPLC-System: System Gold (Beckmann, Pump 126)

Eluent: A: 20 mM TEA (pH 7,8 (HCl))

B: 600 mM KCl, 20 mM TEA (pH 8,1 (HCl))

Gradient: 0 – 0.6 M KCl / Fluß: 750 µl*min⁻¹

Farbreagenz: 2 mM HCl, 200 µM PAR, 30 µM YCl₃, Fluß: 400 µl*min⁻¹

Säule: Source 15 Q (Pharmacia, 4,6 x 250 mm)

sensitiver nachweisen als mit dem YCl_3/PAR -Nachsäulenreagenz. Somit ist die zwischengeschaltete UV-Detektion hervorragend geeignet, um eine mögliche Koelution mit Nukleotiden in einer einfachen positiv/negativ-Kontrolle aufzudecken. Lediglich die Laufzeitdifferenz zwischen beiden Detektoren (0,17 min) muß bei der Interpretation der Daten berücksichtigt werden.

Mit dem UV/VIS-System konnten so in HCP-Extrakten einerseits Substanzen nachgewiesen werden, die sowohl im UV-Bereich absorbierten als auch über VIS-*md*d-HPLC detektiert wurden, andererseits waren auch Verbindungen nachweisbar, die ausschließlich mit dem Nachsäulenreagenz reagierten. Peak 2 und Peak 4 wurden bereits zuvor – über die Retentionszeit – als $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ (Peak 2) und InsP_6 (Peak 4) identifiziert. Trotzdem wurde, wie nachfolgend beschrieben, eine vierte Methode entwickelt, um den Nachweis von $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ in HCP-Extrakten abzusichern.

3.4.4 Rechromatographie von HCP-Extrakten

Da sich das Laufverhalten von Anionen (z.B. Nukleotide, org. Säure, InsP_x) in den beiden HPLC-Systemen (Kapitel 3.3) deutlich unterscheidet, wurde auch eine saure *md*d-HPLC verwendet, um die Identität des $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ in HCP-Extrakten zu bestätigen. Zwar konnte im sauren System ein Peak identifiziert werden, der mit $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ koeluierte, die so detektierten $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ -Gehalte waren jedoch deutlich höher als im alkalischen System. Aufgrund der schlechteren Trennung war eine isomerspezifische Zuordnung sehr schwierig. Daher wurden im weiteren HCP-Extrakte zunächst sauer eluiert und die InsP_3 -Fraktion (Fraktion I, Abb. 21 A.) gesammelt (Kapitel 2.6.2), um anschließend eine Rechromatographie der gesammelten Fraktion I unter alkalischen Bedingungen durchzuführen. Zuvor waren jedoch einige Kontrollen notwendig. Zum einen mußte sichergestellt werden, daß ausschließlich der InsP_3 -Peak gesammelt wurde, zum anderen mußte geprüft werden, ob bei der Trocknung der Proben unter sauren Bedingungen die isomere Struktur erhalten blieb (Irvine, 1986). Zur Kontrolle wurde deshalb zunächst eine saure Rechromatographie durchgeführt, die ergab, daß beim Fraktionieren tatsächlich ausschließlich die Fraktion I gesammelt wurde (Abb. 21 B.). Auch die Trocknung der Proben im sauren Milieu verlief problemlos, wie Vorversuche mit kommerziellem $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ zeigten. Mittels alkalischer *md*d-HPLC

konnte eine *acid migration* – eine Veränderung der isomeren Form – ausgeschlossen werden (Abb. 21 C.).

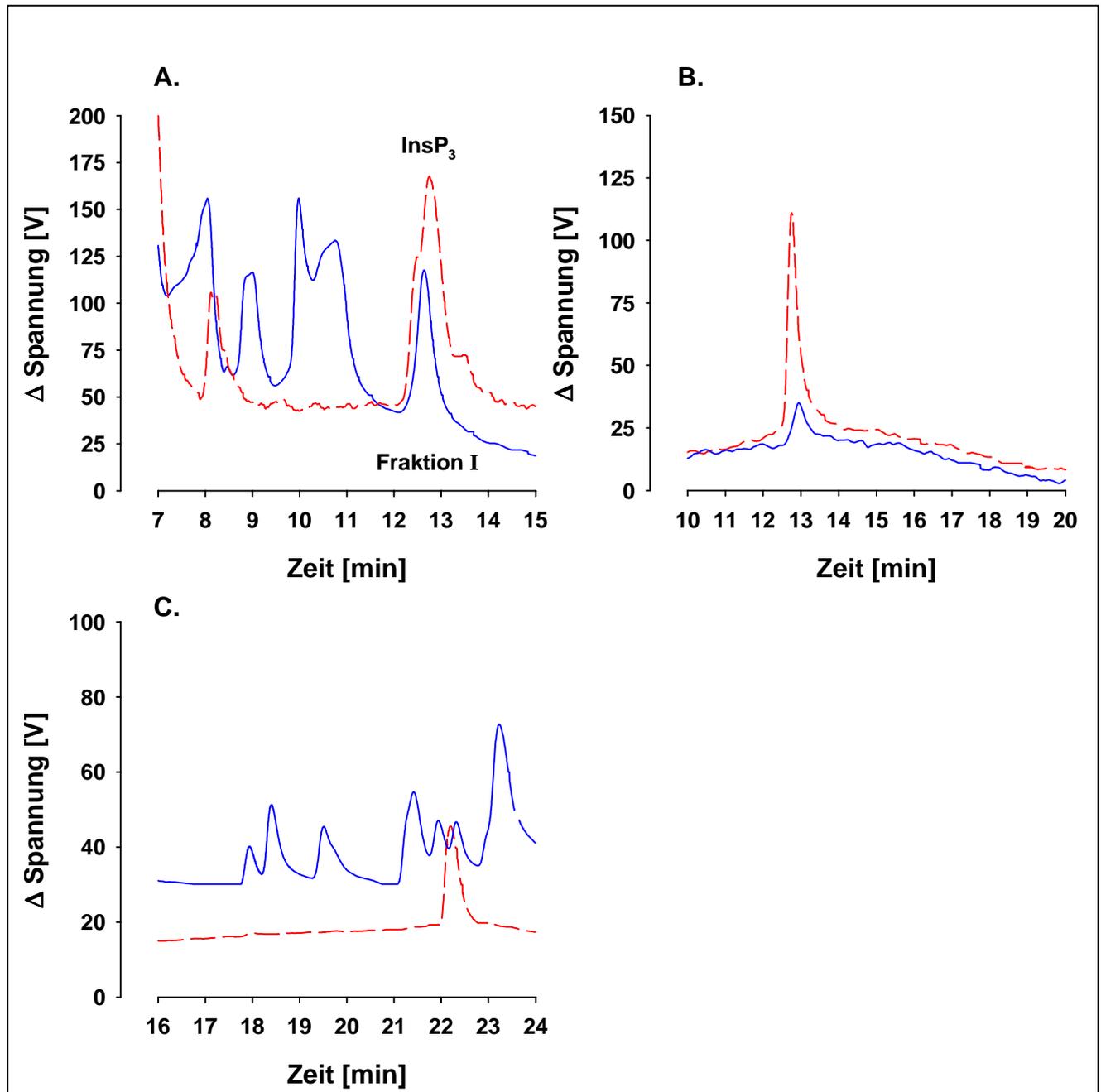


Abb. 21: Saure *mdd*-HPLC eines InsP_6 -Hydrolysates und HCP-Extraktes sowie Rechromatographie der Fraktion I und alkalische *mdd*-HPLC eines entsprechend Fraktion I behandelten $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ -Standards.

A.: Saure *mdd*-HPLC eines InsP_6 -Hydrolysates (----) und HCP-Extraktes (—). **B.:** Saure *mdd*-HPLC eines $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ -Standards (----) und Rechromatographie der Fraktion I (—).

C.: alkalische Trennung der InsP_3 -Isomere eines InsP_6 -Hydrolysates (—) und des entsprechend Fraktion I behandelten $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ -Standards (----).

Nach diesen Vorarbeiten wurden auch HCP-Extrakte fraktioniert, getrocknet und mit der alkalische *mdd*-HPLC reanalysiert. Hierbei konnte die Fraktion I in vier Peaks aufgetrennt werden (Abb. 22 A). Anhand der Retentionszeit und interner Standardisierung mit $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ konnte Peak d als $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ identifiziert werden. Der Vergleich zu den InsP_3 -Isomeren eines InsP_6 -Hydrolysates (Abb. 22 B) ergab, daß es sich bei Peak c um $\text{Ins}(1,3,4)\text{P}_3$ handeln könnte. Im Gegensatz dazu koeluierten Peak a und b nicht mit InsP_3 -Isomeren des InsP_6 -Hydrolysates.

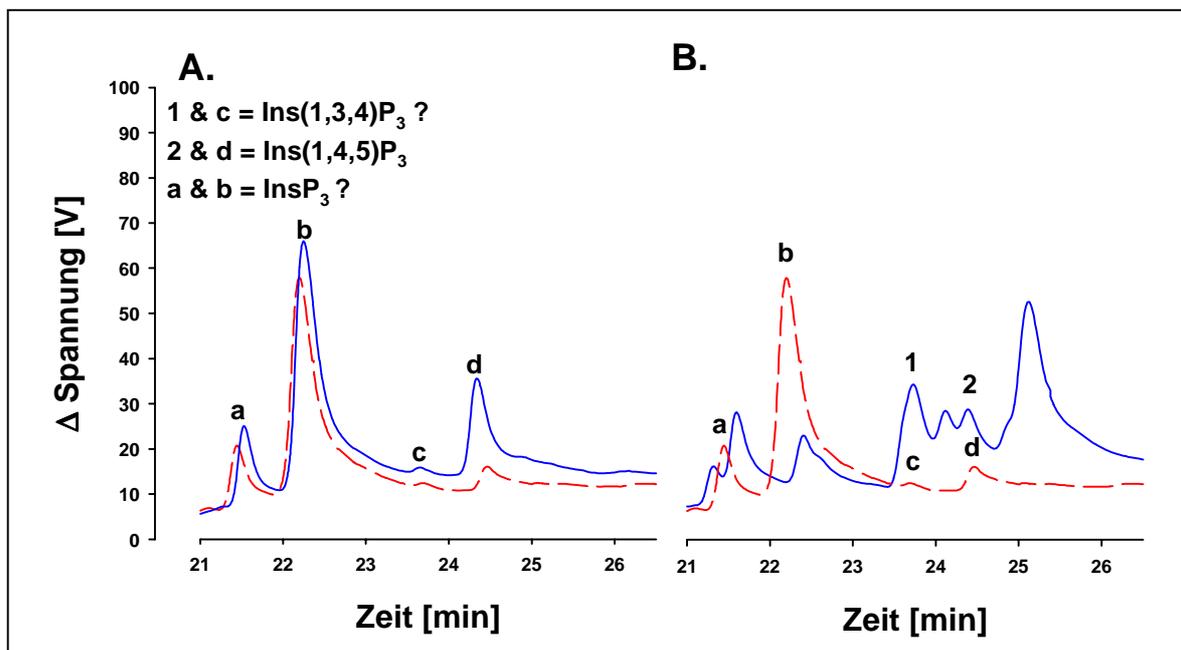


Abb. 22: Alkalische Rechromatographie der Fraktion I und InsP_3 -Isomere eines InsP_6 Hydrolysates. **A.:** Rechromatographie ohne (---) und mit (—) $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ als internem Standard. **B.:** Rechromatographie (---) und InsP_3 -Isomere (—).

HPLC-System: micro bore (Bio-Tek-Kontron, Pump 422)

Eluent: A: 20 mM TEA (pH 7,8 (HCl))

B: 600 mM KCl, 20 mM TEA (pH 8,1 (HCl))

Gradient: 0 – 0.6 M KCl / Fluß: $400 \mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$

Farbreagenz: 2 mM HCl, 200 μM PAR, 30 μM YCl_3 / Fluß: $210 \mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$

Säule: miniQ PC (Pharmacia)

3.5 Untersuchungen zur Aktivierung des pflanzlichen Phosphoinositid-Systems

3.5.1 Auxin-induzierte Aktivierung des pflanzlichen Phosphoinositid-Systems

In den Experimenten zur Auxin-abhängigen Aktivierung der H^+ -Abgabe (Kapitel 3.2) konnten wirksame Auxinkonzentrationen (10, 100 μM) zur Aktivierung der *PM/H⁺-ATPase* bestimmt werden. In weiterführenden Experimenten sollte dann der Einfluß von Auxin (100 μM) auf das pflanzliche Phosphoinositid-System (PI-System) unter-

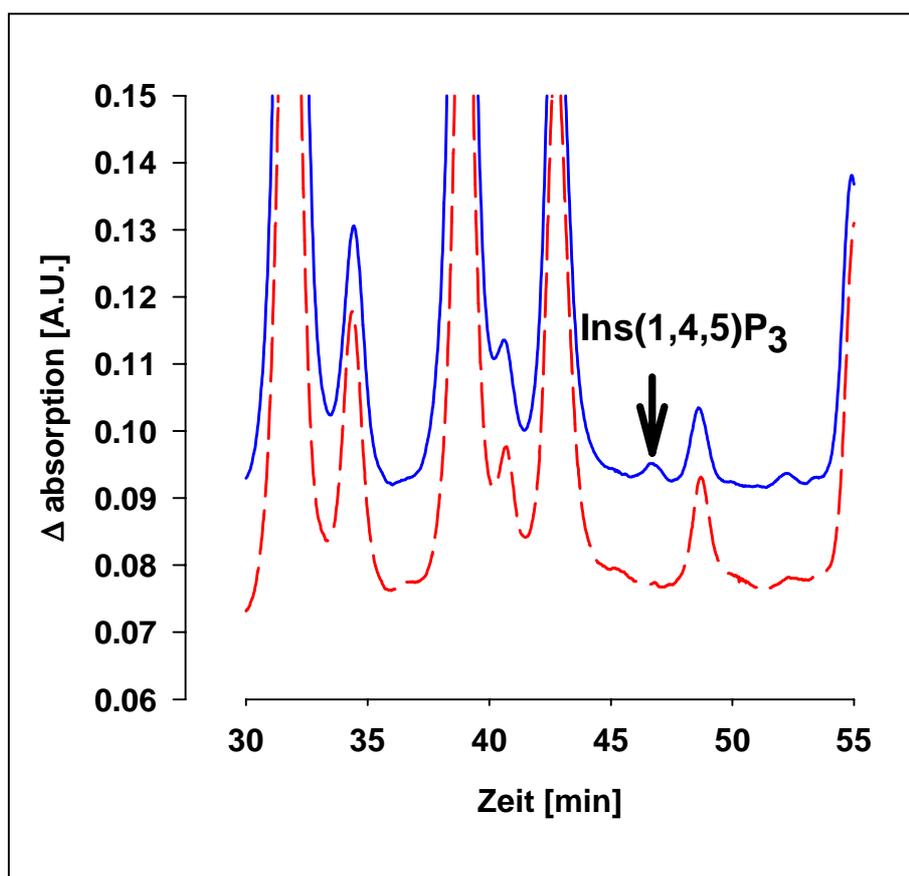


Abb.23: Alkalische *mdd*-HPLC von Auxin (100 μM) stimulierten (oberes Chromatogramm) und unstimulierten HCPs (Kontrolle, unteres Chromatogramm).

HPLC-System: System Gold (Beckmann, Pump 126)

Eluent: A: 20 mM TEA (pH 7,8 (HCl))

B: 600 mM KCl, 20 mM TEA (pH 8,1 (HCl))

Gradient: 0 – 0.6 M KCl / Fluß: 750 $\mu l \cdot min^{-1}$

Farbreagenz: 2 mM HCl, 200 μM PAR, 30 μM YCl₃ / Fluß: 400 $\mu l \cdot min^{-1}$

Säule: Source 15 Q (Pharmacia, 4,6 x 250 mm)

sucht werden. Hierzu wurden die $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ -Gehalte mittels alkalischer *mdd*-HPLC quantifiziert. In Abbildung 23 sind beispielhaft zwei typische Chromatogramme von HCP-Extrakten dargestellt. Das untere Chromatogramm zeigt das Ergebnis der unbehandelten Kontrolle, während im oberen Chromatogramm das Ergebnis für die Auxin-behandelte (30s) Suspension dargestellt ist. Im direkten Vergleich wird deutlich, daß es nur beim $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ zu Veränderungen kam. Andere Inositolphosphate zeigten nur zufällige Veränderungen, die im Fehlerbereich der Analyse lagen.

In einer Zeitreihenuntersuchung (Abb. 24), bei der unbehandelte und behandelte (Auxin, 100 μM) HCPs zu unterschiedlichen Zeitpunkten fixiert wurden, konnte eine zeitabhängige Veränderung der $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ -Gehalte nachgewiesen werden. Die erste Reaktion war bereits nach 15 s meßbar. Hier stieg der $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ -Gehalt von

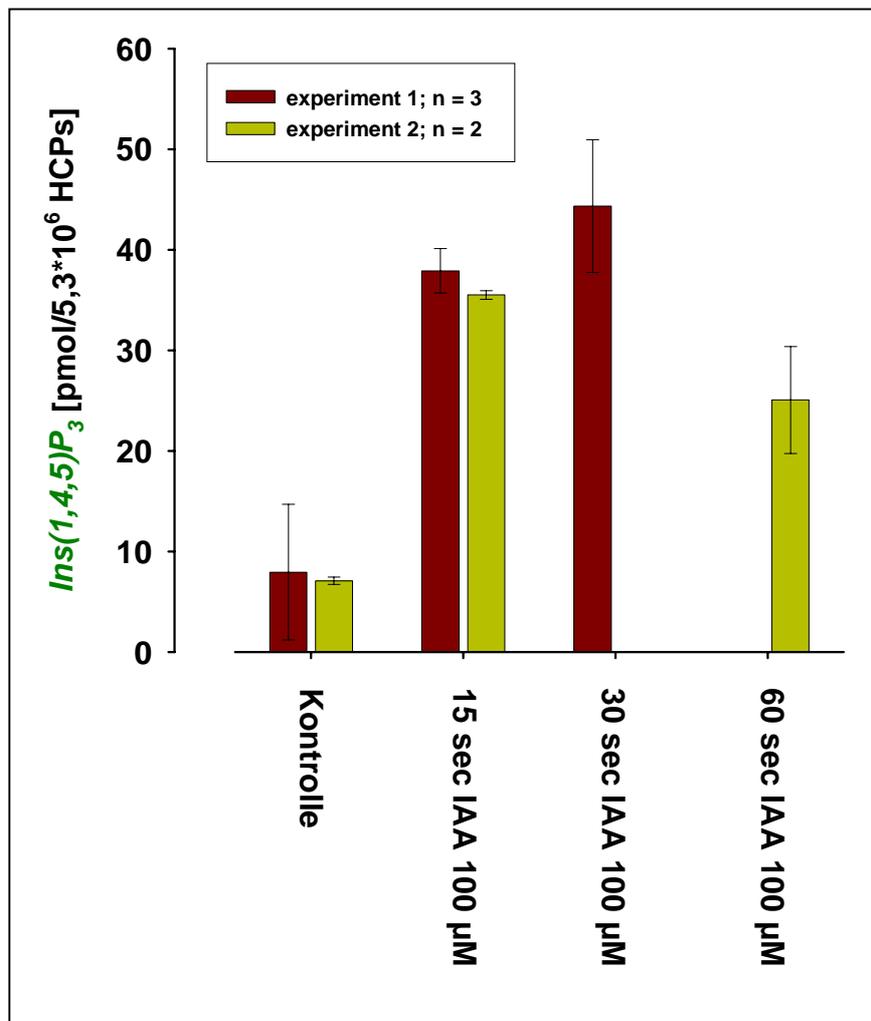


Abb. 24: $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ -Gehalte in HCPs nach Auxin-Stimulation (100 μM), die zu unterschiedlichen Zeitpunkten fixiert wurden (15s, 30s, 60s; n = 3, \pm sd).

ca. 1,6 pmol Ins(1,4,5)P₃/10⁶ HCPs auf ca. 6,7 pmol Ins(1,4,5)P₃/10⁶ HCP. Nach 30s ergab sich mit 8,3 pmol Ins(1,4,5)P₃/10⁶ HCPs ein Maximum, da die Gehalte nach weiteren 30 s wieder um ca. 50 % auf ca. 4,3 pmol Ins(1,4,5)P₃/10⁶ HCPs abnahmen. Damit stiegen die Ins(1,4,5)P₃-Gehalte im Maximum um das ca. fünffache im Vergleich zur Kontrolle an.

3.5.2 Aktivierung des pflanzlichen Phosphoinositid-Systems durch mechanische Stimulation.

Auch nach mechanischer Stimulation waren in HCPs erhöhte Gehalte an Ins(1,4,5)P₃ nachweisbar (Abb. 25 B.). Diese Erhöhung war nicht auf eine Hydrolyse stärker phosphorylierter Inositolphosphate zurückzuführen, da hier keine Unterschiede zwischen Kontrolle und Stimulation auftraten (Abb. 25 A.).

In der zeitlichen Dynamik unterschied sich dieser Effekt jedoch deutlich von dem Auxin-Effekt. So konnten bei einer mechanischen Stimulation frühestens nach fünf Minuten erhöhte Gehalte an Ins(1,4,5)P₃ nachgewiesen werden. Hier stiegen die Gehalte von ca. 1,8 pmol Ins(1,4,5)P₃/10⁶ auf ca. 3,3 pmol Ins(1,4,5)P₃/10⁶ HCPs an. Nach weiteren 10 Minuten waren diese auf über 11 pmol Ins(1,4,5)P₃/10⁶ HCPs angestiegen.

Wurden die HCPs zunächst mechanisch stimuliert (15 min) und anschließend ruhig gelagert (15 min), sanken die Ins(1,4,5)P₃-Gehalte von ca. 11 pmol Ins(1,4,5)P₃/10⁶ HCPs wieder deutlich auf ca. 3,3 pmol Ins(1,4,5)P₃/10⁶ HCPs ab (Abb. 26).

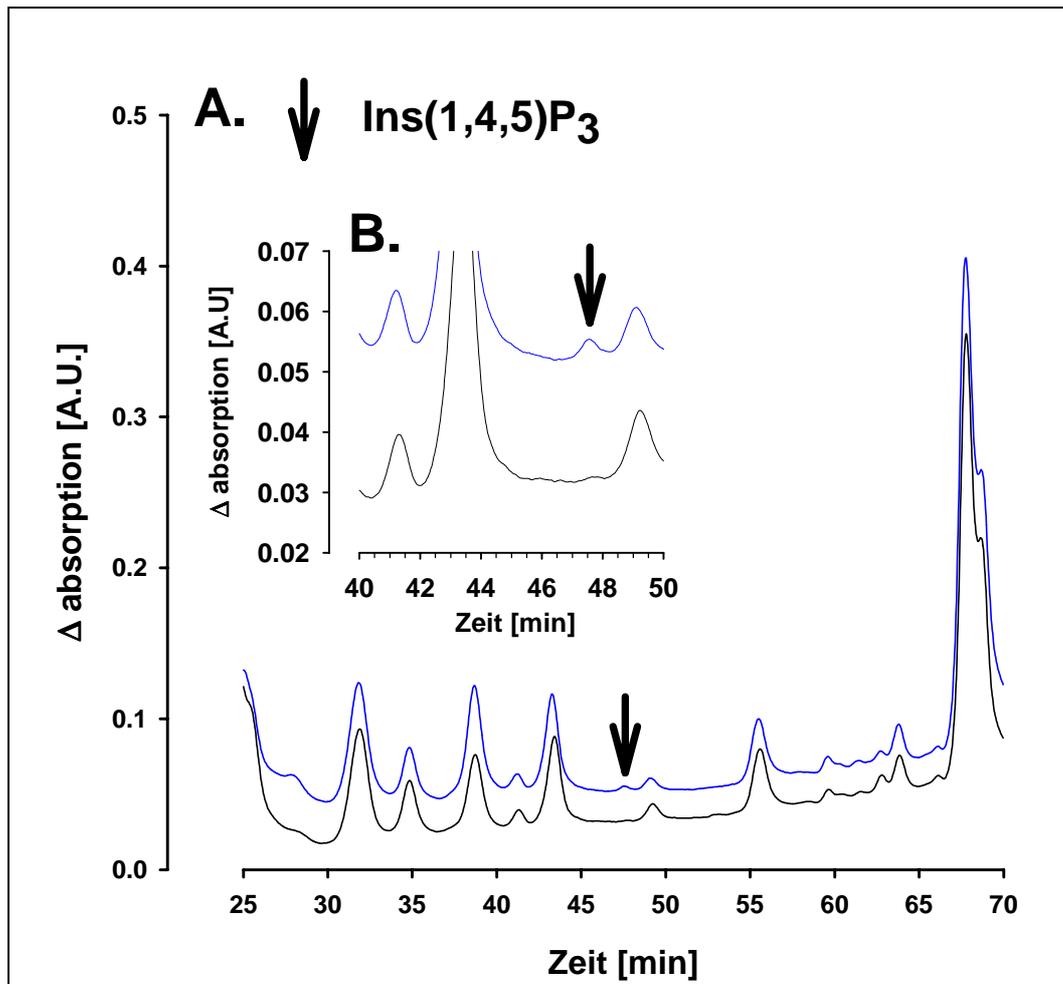


Abb. 25: Alkalische *mdd*-HPLC von HCP-Extrakten

A.: Die Suspensionen wurden nicht behandelt (Kontrolle, unteres Chromatogramm) oder mechanisch stimuliert (oberes Chromatogramm).

B.: entsprechende Detailansicht.

HPLC-System: System Gold (Beckmann, Pump 126)

Eluent: A: 20 mM TEA (pH 7,8 (HCl));

B: 600 mM KCl, 20 mM TEA (pH 8,1 (HCl))

Gradient: 0 – 0.6 M KCl / Fluß: 750 $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$

Farbreagenz: 2 mM HCl, 200 μM PAR, 30 μM YCl₃ / Fluß: 400 $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$

Säule: Source 15 Q (Pharmacia, 4,6 x 250 mm)

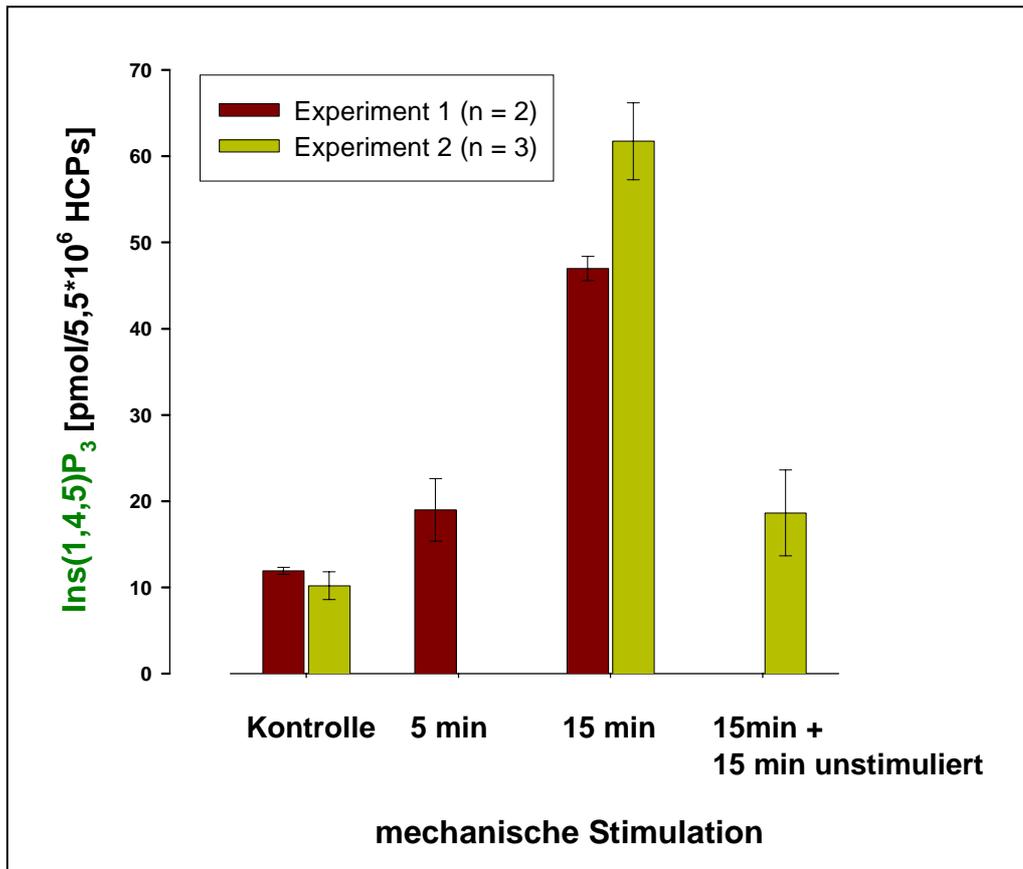


Abb. 26: Einfluß mechanischer Stimulation auf die Ins(1,4,5)P₃-Gehalte (\pm sd) in HCPs.

3.6 Einfluß von hyper- und mikro-Gravitation auf das pflanzliche Phosphoinositid-System

3.6.1 Simulierte Schwerelosigkeit (schnelldrehender Klinostat)

Um den Einfluß simulierter Schwerelosigkeit auf das pflanzliche Phosphoinositid-System zu untersuchen, wurden Experimente mit HCP-Suspensionen am schnelldrehenden Klinostat durchgeführt. Die Dauer der Klinostatbehandlung wurde hierbei in Anlehnung an das μ g- *TEXUS 35* Flugexperiment ausgelegt.

Die Ergebnisse sind in Abbildung 27 dargestellt. Bereits nach 3 min Klinostatbehandlung stiegen die $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ -Gehalte im Vergleich zur Kontrolle um ca. 100 %, um nach weiteren 4 min wieder leicht abzusinken (150 %).

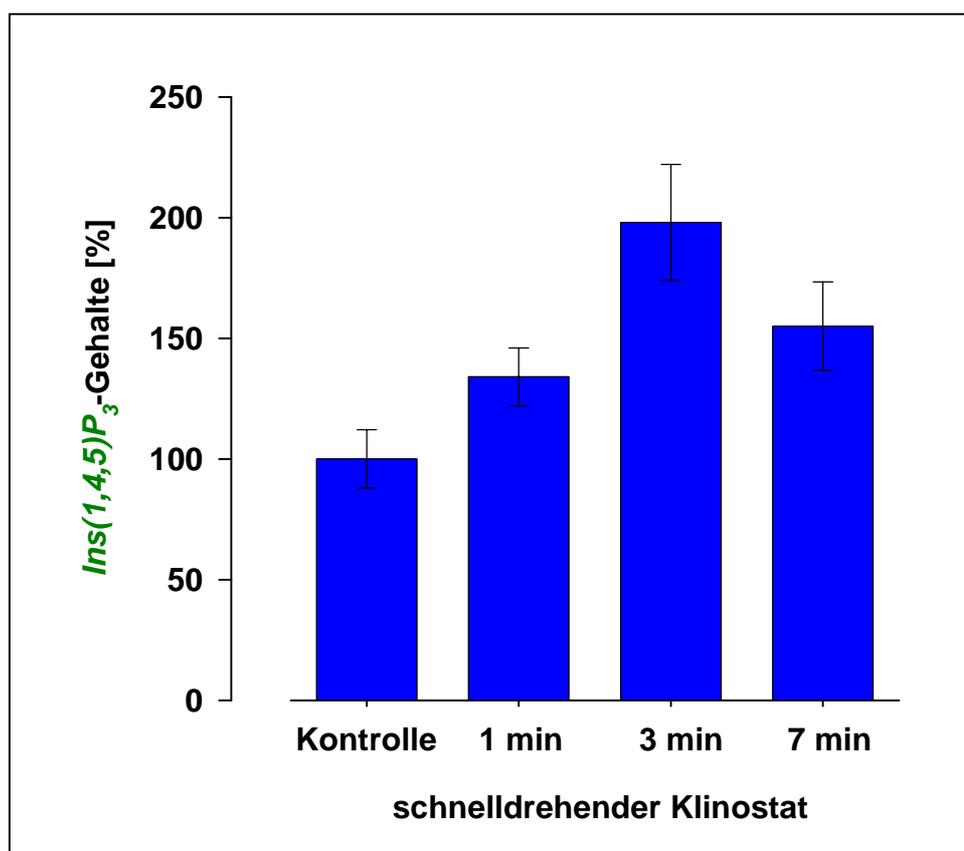


Abb. 27: Einfluß simulierter Schwerelosigkeit (schnelldrehender Klinostat) auf die $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ -Gehalte in HCPs (Küvettdurchmesser: 3 mm; Rotation: 60 rpm, n = 3, \pm sd).

Damit konnte gezeigt werden, daß simulierte Schwerelosigkeit zu einer Aktivierung des PI-Systems führt. Allerdings unterschieden sich die Effekte hinsichtlich ihrer zeitlichen Dynamik deutlich von einer Auxin-vermittelten Aktivierung, als auch einer mechanisch vermittelten Aktivierung des PI-Systems.

3.6.2 Einfluß von hyperg auf das PI-System

Um den Einfluß von hyperg auf das pflanzliche PI-System zu untersuchen, wurden Protoplasten auf einer multi-sample-centrifuge (Kapitel 2.7.4) zentrifugiert. Die g -Level und Expositionszeiten richteten sich hierbei nach den hyperg-Phasen des Flugexperimentes *TEXUS 35* (Kapitel 2.7.5). Durch diese Experimente konnte gezeigt werden, daß hyperg unter diesen Bedingungen keine Aktivierung des PI-Systems bewirkt, da zu keinem Zeitpunkt der Simulation signifikante Unterschiede der Ins(1,4,5) P_3 -Gehalte zwischen Kontrolle und Behandlung nachweisbar waren (Abb. 28).

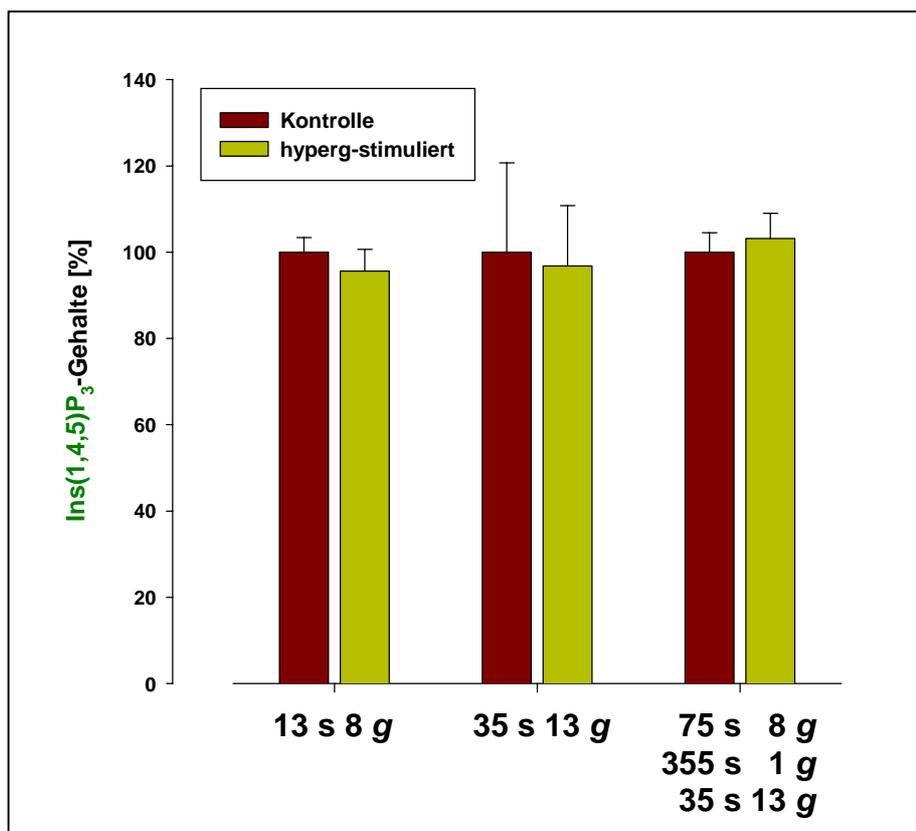


Abb. 28: Ins(1,4,5) P_3 -Gehalte in HCPs nach hyperg-Stimulation (n= 4, \pm sd).

3.6.3 Untersuchungen zum Einfluß von mikro-Gravitation auf das Phosphoinositid-System

Im Flugexperiment *TEXUS 35* wurde der Einfluß von mikro-Gravitation (μg) auf das pflanzliche PI-System untersucht. Hierzu wurden HCP-Suspensionen während der Flugphase bei unterschiedlichen g -Leveln (1g, 8g, μg , 13g) und Zeitpunkten (Tabelle 7) fixiert und anschließend die Ins(1,4,5) P_3 -Gehalte mit der alkalischen *mda*-HPLC quantifiziert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 29 dargestellt.

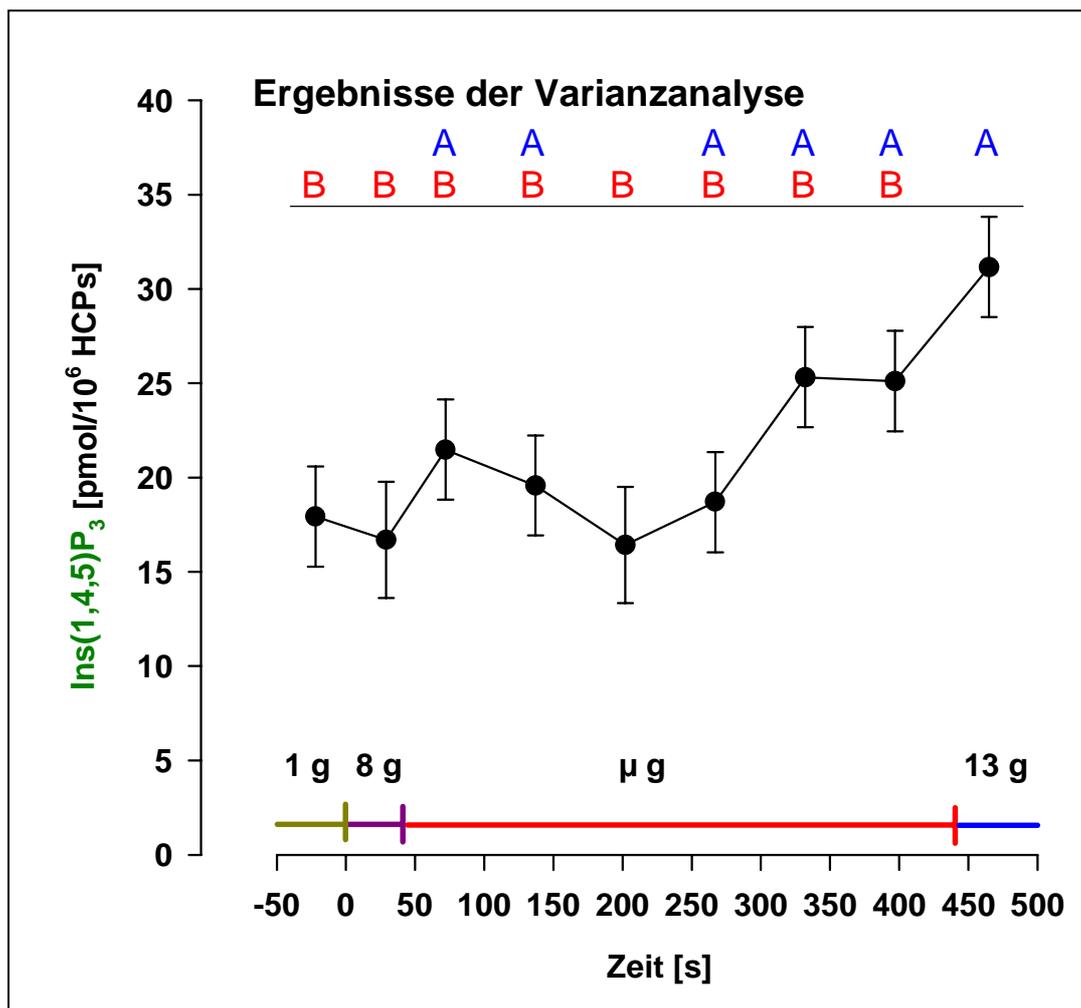


Abb. 29: Ins(1,4,5) P_3 -Gehalte von HCPs des μg -Flugexperimentes *TEXUS 35*. Während des Fluges wurden die Proben unterschiedlichen g -Leveln ausgesetzt (1g, 8g, μg , 13g) und fixiert. Die Ergebnisse wurden mittels ANOVA analysiert. Signifikante Unterschiede ($n = 4$, $\alpha = 5\%$) sind mit unterschiedlichen Buchstaben markiert.

Bei diesem Flugexperiment ergaben sich erste Hinweise, daß HCPs als autonome Einheit Veränderungen des g -Vektors wahrnehmen können. Weiterhin scheint das PI-System an der Umsetzung des physikalischen Reizes Schwerkraft in ein chemisches Signal beteiligt zu sein. So konnten während der Start- ($8g$) und der μg -Phase keine signifikanten Veränderungen der $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ -Gehalte zu den Gehalten vor *take off* ($1g$) nachgewiesen werden. Allerdings deutete sich in der μg -Phase ab Event 7 (332 s) ein Anstieg der $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ -Gehalte in den HCPs an. In der hyper g -Phase ($13 g$, Event 9) konnte dann ein signifikant erhöhter $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ -Gehalt in den HCPs nachgewiesen werden.

4 Diskussion

4.1 Isolation und Vitalität der Hypokotylprotoplasten

Mit der vorliegenden Arbeit sollte geklärt werden, ob das pflanzliche PI-System an schwerkraftinduzierten Signaltransduktions-Prozessen beteiligt ist. Hierzu mußte der *second messenger* $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ quantitativ gemessen werden. Als Modell für die physiologischen Untersuchungen dienten hierbei Protoplasten von Sonnenblumen-Hypokotylen. Da das Hypokotyl der Keimlinge nach gravi-Stimulation eine deutliche negativ-gravitrope Reaktion zeigt und die Keimlinge sowohl einfach als auch schnell (7 Tage) kultiviert werden konnten, stellte dieses Organ ein besonders geeignetes Basismaterial für die Experimente dar.

Die Isolation der Protoplasten stellte zunächst ein großes Problem dar, da Protoplasten in großem Umfang und hoher Qualität isoliert werden mußten. Es zeigte sich schnell, daß die sterile Isolation, bei der einzelne Hypokotyle mit einem Skalpell in Scheiben geschnitten werden mußten, ungeeignet war. Denn einerseits war die Methode recht umständlich, andererseits lieferte sie nie genügend Protoplasten.

Erst nach starker Rationalisierung - der Verwendung eines speziell entwickelten Schneidegerätes (Kapitel 2.2) – konnten in kurzer Zeit ausreichende Mengen an Hypokotylfrischmasse für die Isolation verarbeitet werden. Eine notwendige Steigerung der Protoplastenausbeute und Qualität konnte durch die Modifikation der Inkubation erreicht werden. Im Gegensatz zu früheren Arbeiten (Schmitz und Schnabl, 1989) wurden die Hypokotyle nur in einer Schale mit einem dünnen Film Isolationsmedium überschichtet, und nicht in einem tiefen Bad an Isolationsmedium inkubiert.

Schon während der Protoplastenisolation sind die Zellen zahlreichen Streßfaktoren (z. B. osmotischer Streß, Lösen der Zell-Zell Interaktionen, Angriff hydrolytischer Enzyme) ausgesetzt, die die Vitalität und Physiologie der Protoplasten beeinflussen (Hahne et al. 1988). Daher wurden Tests (Vitalfärbung, Cytoplasmaströmung) durchgeführt, mit denen die Vitalität der Protoplasten beurteilt werden sollte. Diese ergaben für die über den einfachen Saccharose Stufengradienten gereinigten HCPs zwar einen hohen Anteil (> 95 %) vitaler Protoplasten, jedoch enthielt die Fraktion

- trotz aller Vorsicht - noch höhere Anteile an Zellwandfragmenten und Zelltrümmern. Eine Aktivierung der *PM/H⁺-ATPase* durch Auxin konnte mit dieser Suspension nicht reproduzierbar gemessen werden. Daß Zellwandfragmente die Vitalität von Zellen und Protoplasten negativ beeinflussen können, ist schon seit längerer Zeit bekannt (Davis et al., 1984; Kurosaki und Nishi, 1984). Als mögliche Ursachen hierfür werden zellwandassoziierte Faktoren (Elicatoren) diskutiert. Diese lösen insbesondere nach Verletzungen und Infektionen die Bildung niedermolekularer phenolischer Verbindungen (Phytoalexine, Ziegler, 1998) aus, die phytotoxische Wirkung zeigen. Durch die Etablierung eines weiteren Reinigungsschrittes (Kapitel 2.2) konnten auch letzte Verunreinigungen aus den Protoplastensuspensionen nahezu vollständig abgetrennt werden. Da es mit dieser hochreinen Protoplastenfraction schließlich gelang, eine Aktivierung der *PM/H⁺-ATPase* durch Auxin reproduzierbar nachzuweisen, wurden die mit diesem Reinigungsschritt verbundenen Verluste (ca. 50 % der Protoplasten) in Kauf genommen.

4.2 Auxin-abhängige Aktivität der *in vivo* *PM/H⁺-ATPase*

Neben Experimenten, bei denen der Einfluß eines veränderten Schwerkraftvektors auf das pflanzliche PI-System untersucht wurde (Kapitel 3.6), waren Messungen zu einer Auxin-abhängigen Aktivierung des PI-Systems ein weiterer, wichtiger Aspekt der Arbeit. Denn einerseits gab es sehr deutliche Hinweise (Evans, 1991; Gil et al., 1994; Li et al., 1991; Mirza et al., 1984; Pickard, 1985; Trewavas et al., 1992) auf eine Beteiligung von Auxin als Botenstoff bei gravitropen Reaktionen, andererseits lieferte die Arbeit von Ettliger und Lehle (1988) starke Hinweise dafür, daß Auxin das PI-System aktivieren kann.

Eigene Versuche mit Protoplasten waren jedoch zunächst nicht erfolgreich. Libbenga (1985) weist in diesem Zusammenhang allerdings darauf hin, daß die bei der Protoplastierung verwendeten Enzyme Cellulase und Macerocym neben der Leitenzymaktivität auch Aktivität besitzt, die für den Abbau Plasmamembran-gebundener Rezeptoren verantwortlich sein kann. So war zu diesem Zeitpunkt nicht auszuschließen, daß die ausbleibende Reaktion der Protoplasten auf einer irreversiblen Schädigung des Auxin-Rezeptors während der Protoplastierung beruhte.

Um diesen Zusammenhang näher zu untersuchen, wurde ein weiteres Testsystem (Kapitel 2.3) etabliert, bei der die in der Literatur (Kapitel 1.3.2) vielfach beschriebene Auxin-abhängige Aktivierung der *PM/H⁺-ATPase in vivo* gemessen wurde. Erste Versuchsreihen zeigten, daß die in den Protoplasten-Suspensionen noch enthaltenen Verunreinigungen (Zellwandfragment, -trümmer) die Messungen stark negativ beeinflussten. Ein weiterer Reinigungsschritt schaffte hier Abhilfe (Kapitel 4.1).

Im Weiteren wurde der Einfluß der für die Messungen verwendeten Pufferzusammensetzung untersucht, da für die Aktivität der *PM/H⁺-ATPase* eine deutliche Abhängigkeit zur K^+ -Konzentration *in vitro* nachgewiesen werden konnte (Leonard, 1982; Briskin und Hanson, 1992). Auch in eigenen Experimenten konnte ein deutlicher Zusammenhang zwischen Saccharose-/KCl-Konzentration und der Aktivierbarkeit der *PM/H⁺-ATPase* durch Auxin (Abb. 11) nachgewiesen werden. So konnte bei Saccharosekonzentrationen > 175 mM (KCl-Konzentration < 220 mM) eine Auxin-abhängige Aktivierung der *PM/H⁺-ATPase* nicht mehr nachgewiesen werden. Die deutlichsten Effekte hinsichtlich einer Aktivierung der *PM/H⁺-ATPase* wurden bei Saccharosekonzentrationen < 50 mM (KCl-Konzentration > 298 mM, Abb. 11) gemessen. Es erscheint jedoch wenig wahrscheinlich, daß selbst bei hohen Saccharosekonzentrationen, die K^+ -Konzentration (190 mM) für eine maximale Aktivität limitierend war, da Jahn et al. (1996) an Maiskoleoptilen schon bei K^+ -Konzentrationen von 0,1 mM eine deutliche Auxin-abhängige Aktivierung der *PM/H⁺-ATPase* nachweisen konnten. Vielmehr scheinen beim Protoplasten-System die hohen Saccharosekonzentrationen negative Auswirkungen zu haben. Die Ursachen der inhibierenden Wirkung hoher Saccharosekonzentrationen sind unklar, allerdings konnten Morré und Brightman (1997) eine ähnliche Wirkung auf die *NADH-oxidase*, ein weiteres durch Auxin aktivierbares Enzym der Plasmamembran, nachweisen.

Im Gegensatz zu Auxin konnte für Fusicoccin ein Einfluß der Saccharose-/KCl-Konzentration nicht nachgewiesen werden. So konnte die *PM/H⁺-ATPase* sowohl bei sehr hohen (220 mM) als auch bei niedrigen (50 mM) Saccharosekonzentrationen durch Fusicoccin (10 μ M) aktiviert werden. Dies kann als weiteres Indiz dafür gewertet werden, daß die Auxin- bzw. Fusicoccin-abhängige Aktivierung der *PM/H⁺-ATPase* auf unterschiedlichen Mechanismen beruht. So soll Fusicoccin die Bindung des FC-bindenden Proteins (14-3-3 FCBP) an die autoinhibitorische Domäne der *PM/H⁺-*

ATPase verstärken und damit zu einer irreversiblen Aktivierung des Enzyms führen (Jahn et al., 1996; Oeking et al., 1997; Oeking und Hagemann, 1999), während es für Auxin starke Hinweise für eine Rezeptor-vermittelte, Phospholipase A_2 -abhängige Signaltransduktions-Kette gibt (Scherer und Arnold, 1997; Yi et al., 1996). Entgegen früherer Vermutungen konnte eine Auxin-induzierte Neusynthese der *PM/H⁺-ATPase* bisher nicht bestätigt werden (Cho und Hong, 1995; Jahn et al., 1996).

Weiterhin wurden bei Fusicoccin und Auxin deutliche Unterschiede in der *lag*-Phase beobachtet, was auch durch Arbeiten von Jahn et al. (1996) bestätigt wird. So wurde eine erhöhte *PM/H⁺-ATPase* Aktivität an HCPs nahezu unmittelbar nach Fusicoccin-Zugabe gemessen, während diese nach Applikation von Auxin erst nach ca. 10 Minuten zu beobachten war (Abb. 14). Somit war die *lag*-Phase nach Auxin-Zugabe jedoch nur etwa halb solange wie bei Maiskoleoptilen (Jahn et al., 1996). Allerdings sind im zellwandlosen Einzelzell- System die Diffusionswege für Auxin auch wesentlich kürzer.

Auch hinsichtlich der Auxinkonzentration konnten deutliche Effekte bei der Aktivierung der *PM/H⁺-ATPase* festgestellt werden. So führte eine Auxinkonzentration von 10 μM nur zu sehr geringen Effekten, während bei einer Konzentration von 100 μM eine deutliche Aktivierung der *PM/H⁺-ATPase* nachgewiesen werden konnte. Diese ließ sich durch den *H⁺-ATPase*-Inhibitor DCCD vollständig hemmen. Demgegenüber konnten Jahn et al. (1996) bei Maiskoleoptilen eine Auxin-abhängige Aktivierung der *PM/H⁺-ATPase* schon bei einer Konzentration von 10 μM nachweisen. Während diese Autoren allerdings keine Angaben zur Wirkung höherer Auxinkonzentrationen machen, konnten Watahiki und Yamamoto (1997) eine maximale Krümmung von *Arabidopsis* Hypokotylen (Wild-Typ) nach einer unilateralen Auxinapplikation von 100 μM messen.

Schließlich konnte die in der Literatur beschriebene stärker aktivierende Wirkung der *PM/H⁺-ATPase* durch Fusicoccin (10 μM) im Vergleich zu Auxin (100 μM) durch die vorliegenden Untersuchungen auch an HCP-Suspensionen bestätigt werden.

4.3 Inositolphosphat-Analytik

In der Vergangenheit wurden verschiedene Methoden zur Detektion von Inositolphosphaten entwickelt. Ein Überblick hierzu ist in Abbildung 30 dargestellt, und eine umfassende Übersicht findet sich bei Irvine (1990). Prinzipiell kann zwischen Methoden unterschieden werden, bei denen der Einsatz von Radiotracer notwendig ist und solchen, für die keine Radiotracer benötigt werden.

4.3.1 Nachweis von Inositolphosphaten über Radiotracer

Bei geeigneter Laborausstattung (β^- -counter, Isotopenlabor) können Inositolphosphate nach einer radioaktiven Markierung der Zielgewebe bzw. Zellen mit *myo*-[^3H]inositol oder [^{32}P]phosphat oder aber über spezifische Radiorezeptorassays (Palmer und Wakelham, 1989; Palmer und Wakelham, 1990; Donie und Reiser, 1989) nachgewiesen werden. Diese Methoden haben den Vorteil, daß Inositolphosphate sehr sensitiv nachgewiesen werden können und speziell die Radiorezeptorassays nur einen geringen Laboraufwand erfordern. Für die Methode der radioaktiven Markierung der Zielgewebe ist allerdings kritisch anzumerken, daß sie die Gefahr einer unvollständigen Gleichgewichtsmarkierung der Inositolphosphate birgt. Dies kann bei der anschließenden Analyse zu Artefakten führen (Dean und Beaven, 1989; Coté und Crain, 1992; Mayr, 1990).

Diese Methoden konnten für die vorliegende Arbeit allerdings nicht eingesetzt werden, da einerseits kein geeignetes Isotopenlabor und β^- -Detektoren zur Verfügung standen und andererseits das *TEXUS 35*-Flugexperiment den Einsatz von Radiotracer nicht erlaubte.

4.3.2 Nachweis von Inositolphosphaten ohne Radiotracer

Bei diesen Methoden ist zunächst eine isomerspezifische Trennung der Inositolphosphate erforderlich. Hier hat sich schon früh die Anionenaustausch-HPLC durchgesetzt (Dean und Beaven, 1989; Mayr, 1990). Für die anschließende Detektion der Inositolphosphate wurden demgegenüber zahlreiche Methoden entwickelt, die sich

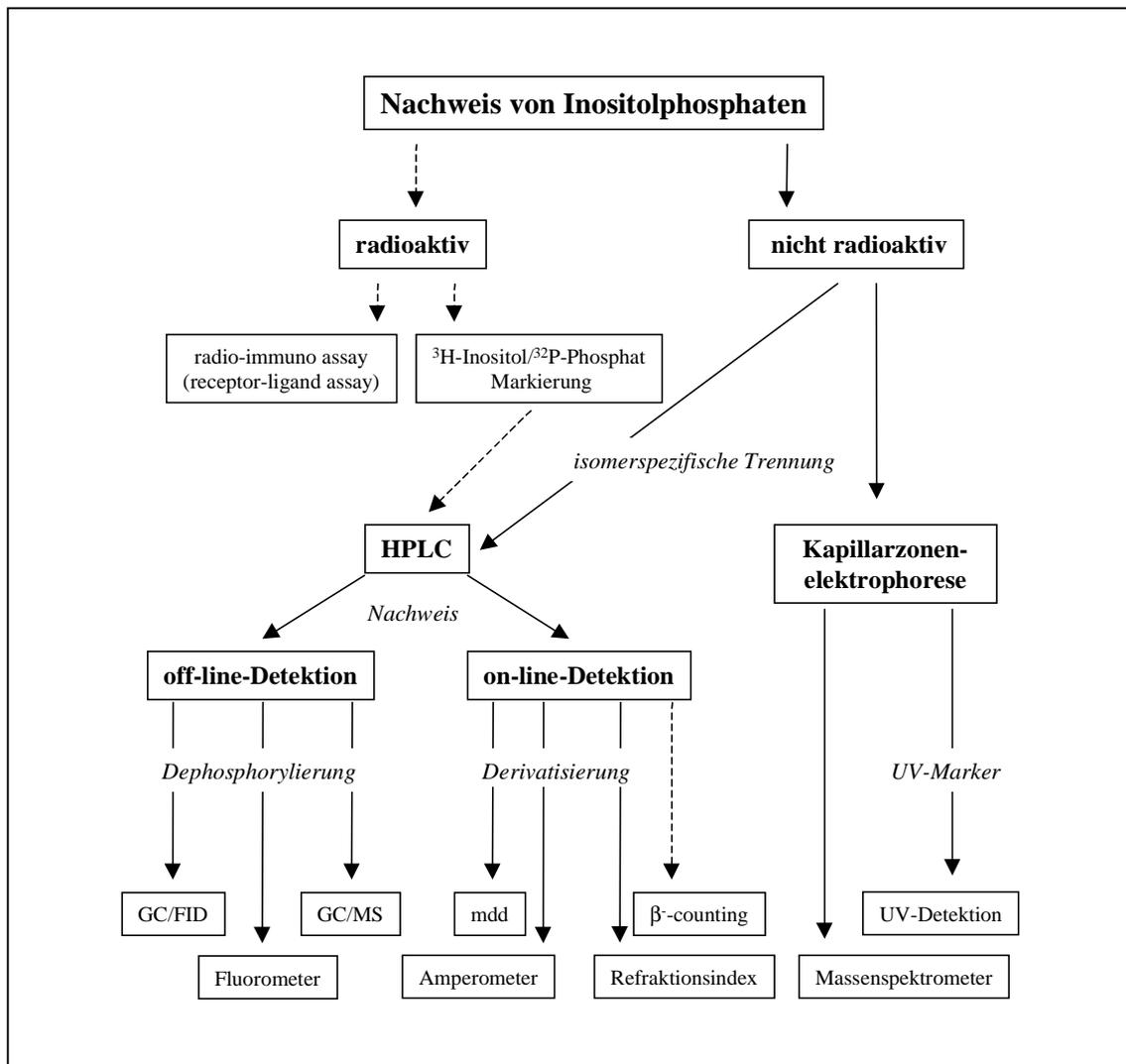


Abb. 30: Inositolphosphat-Analytik.

-entsprechend der Detektion- zwei Gruppen zuordnen lassen. Bei der ersten Gruppe erfolgt die Detektion der Inositolphosphate entkoppelt von der Trennung (*off-line*), während bei der zweiten Gruppe Trennung und Detektion unmittelbar gekoppelt sind (*on-line*).

- Bei den *off-line* Methoden werden die Inositolphosphate nach der Trennung dephosphoryliert. Anschließend kann das freigesetzte Phosphat mikrospektrophotometrisch (Underwood et al., 1988) oder aber das freie Inositol mittels Gaschromatographie (Rittenhouse und Sasson, 1985; Cramer, 1998) bzw. Mikrofluorometrie nach enzymatischer Umsetzung (MacGregor und Matchinsky, 1984; Maslanski und Busa, 1990) quantitativ bestimmt werden.

Ein wesentlicher Vorteil der *off-line* Detektion ist die hohe Sensitivität. So konnte Cramer (1998) über GC-gekoppelte Massenspektroskopie (GC/MS) sogar eine Sensitivität von 100 fmol für myo-Inositol erzielen. Allerdings ist der *off-line* Nachweis aufgrund der erforderlichen Fraktionierung und anschließenden Aufarbeitung der Fraktionen mit einem enormen zeitlichen Aufwand verbunden. Dieser steigt dabei um so stärker an, je mehr Inositolphosphate untersucht werden. Kritisch anzumerken sind die teilweise erheblichen Verluste (> 70 %), die mit der nachgeschalteten Weiterbearbeitung der Fraktionen verbunden sein können (Cramer, 1998). Auch müssen die InsP_x -Fraktionen „blind“ gesammelt werden, was bei Retentionszeitverschiebungen auch zu Fehlinterpretationen führen kann. Werden zur Kontrolle Markersubstanzen (z.B. ATP) eingesetzt, muß für diese zunächst nachgewiesen werden, daß sie das selbe Retentionsverhalten wie die untersuchten Inositolphosphate besitzen. Weiterhin kann eine unspezifische saure- bzw. enzymatische-Hydrolyse der Inositolphosphate während der Probenaufarbeitung zu Artefakten führen. Diese sind bei der *off-line* Analyse aber nur schwer zu erkennen, da häufig nur ein InsP_x -Isomer gesammelt wird. Aus diesem Grund unterbleibt auch häufig der Nachweis, wie exakt einzelne InsP_x -Fraktionen isomerspezifisch getrennt werden. Darüber hinaus ist auch die Optimierung der Elutionsbedingungen (pH-Wert, Gradient) recht schwierig, da viele Fraktionen in kurzen Zeitabständen gesammelt werden müssen.

- Bei den *on-line* Methoden ist die isomerspezifische Trennung der Inositolphosphate und deren Detektion unmittelbar gekoppelt. Dies setzt jedoch zwischengeschaltete „Reaktoren“ voraus, in denen nachweisbare Verbindungen gebildet werden, da Inositolphosphate weder im sichtbaren- noch im UV-Wellenlängenbereich absorbieren und andere Detektoren (Refraktometer, amperometrische-Detektoren) bisher zu insensitiv sind.

Erste Ansätze, bei denen die Inositolphosphate sauer bzw. enzymatisch hydrolysiert wurden und anschließend das freigesetzte Phosphat colorimetrisch detektiert wurde (Dean und Beaven, 1989), konnten sich nicht durchsetzen, da die Ergebnisse nur schwer zu reproduzieren waren. Diese Reaktoren besaßen auch ein großes Totvolumen, so daß die Sensitivität und Trennleistung stark negativ beeinflusst wurde (Mayr, 1990). Durch eine Nachsäulenreaktion mit einem Yttrium-4-(2-

pyridylazo)resorcinol-Komplex, konnte Mayr (1990) den Dephosphorylierungsschritt umgehen und eine Methode (metal-dye-detection HPLC) etablieren, mit der Inositolphosphate bis in den unteren pmol-Bereich detektiert werden können.

Auch Skoglun et al. (1997) gelang mit einem amperometrischen Detektionssystem der Nachweis von InsP_1 und InsP_2 Isomeren bis in den unteren pmol-Bereich. Die Sensitivität nahm jedoch mit zunehmender Anzahl von Phosphatgruppen deutlich ab. Neuere Methoden bei denen die Inositolphosphate über die Kapillarzonen-*elektrophorese* getrennt werden und durch zugemischte UV-absorbierende Substanzen bzw gekoppelte Massenspektroskopie detektiert werden, erreichen zwar hohe Sensitivitäten, allerdings ist die Auflösung höherer InsP_x nur gering und eine isomerspezifische Zuordnung nicht möglich (Buscher et al., 1995). Auch scheint die Methode zur Analyse von Zell- bzw. Gewebeextrakten wenig geeignet zu sein, da jeweils nur Probenvolumina im 0,001 μl -Bereich analysiert werden können (Guse et al. 1995).

Der größte Nachteil der *on-line*-Detektions-Methoden gegenüber den *off-line*-Methoden ist deren deutlich geringere Sensitivität. Demgegenüber erlauben sie bei vertretbarem Aufwand die Analyse einer großen Probenanzahl, wobei die Analyse voll automatisiert werden kann. Auch können alle InsP_x -Fraktionen einer Probe isomerspezifisch getrennt und detektiert werden. So können einerseits Artefakte schnell aufgedeckt werden, andererseits lassen sich die Elutionsbedingungen (pH-Wert, Gradient) einfach und schnell optimieren.

Zur Quantifizierung des *second messengers* $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$, der nur in sehr geringen Konzentrationen in Zellen vorliegt und zudem nach Effektor-Stimulation einem sehr schnellen Umsatz unterliegt, galt es daher eine Nachweismethode zu etablieren, die neben einer hinreichenden Sensitivität eine schnelle und hoch auflösende Analyse der Pflanzenextrakte erlaubte. Aus den oben genannten Gründen erfüllte die von Mayr (1990) entwickelte *mdd*-HPLC diese Kriterien am besten.

4.4 Nachweis von Inositolphosphaten über die *md*d-HPLC

Zunächst stand für die Inositolphosphat-Analytik ausschließlich eine analytische HPLC der Firma Beckman Instruments zur Verfügung (Kapitel 2.5.1), die nur unter alkalischen Bedingungen betrieben werden konnte. Das hierzu von Mayr (1990) beschriebene Nachsäulenreagenz war jedoch nicht stabil, so daß schon nach kurzer Zeit rote Kristalle ausfielen. Dies führte während der Messung zu einer kontinuierlichen Abnahme der Sensitivität. Die Kristalle blockierten darüber hinaus die Ein- und Auslaßventile der Derivatisierungspumpe (Abb. 6, Pumpe C). Erst eine deutliche Absenkung des pH-Wertes, verbunden mit einem Austausch des Lösungsmittels (NH₄-Acetat (2mM, pH 5) gegen Essigsäure 2 mM bzw. HCl 2 mM) bei gleichzeitiger Minderung der PAR- und Yttrium-Konzentration, führte zu einem stabilen Nachsäulenreagenz. Weiterhin wurden Ethanolamin-gepufferte Nachsäulenreagenzien mit deutlich höheren pH-Werten getestet, die allerdings im Gegensatz zu den Angaben von Mayr (1990) erst bei einem pH-Wert von 9,5 stabil waren. Da bei pH-Werten > 9 jedoch Hydroxy-Komplexe entstehen und das Reagenz schleichend entfärbt (Mayr, 1990), wurde nur das saure Farbreagenz verwendet.

Die von Mayr (1990) und Guse et al., (1995) beschriebene gute Trennleistung der alkalischen *md*d-HPLC für Inositoltrisphosphate und der sauren *md*d-HPLC für stärker phosphorylierte Inositolphosphate konnte mit einem InsP₆-Hydrolysat bestätigt werden (Abb. 16, Abb. 17). Die Sensitivität des Standard-Systems (Kapitel 2.5.1) war jedoch viel zu gering (Abb. 7), um bei vertretbarem Gewebeeinsatz Ins(1,4,5)P₃ quantitativ zu bestimmen. Erst durch die schrittweise Verbesserung der Anlagen (Betriebsdruck, Pulsationsdämpfer, Kapitel 2.5.1.1), konnte eine ausreichende Sensitivität (10 pmol Ins(1,4,5)P₃) erreicht werden.

4.5 Nachweis von Ins(1,4,5)P₃ in HCP-Extrakten

In HCP-Extrakten konnte mit der alkalischen *md*d-HPLC ein Peak nachgewiesen werden, der mit Ins(1,4,5)P₃-koeluiert. Dieses Ergebnis konnte mittels interner Standardisierung bestätigt werden (Abb. 18). Neben Ins(1,4,5)P₃ wurden in Pflanzen von den insgesamt 20 möglichen InsP₃-Isomeren allerdings noch Ins(1,2,3)P₃ und Ins(1,2,6)P₃ nachgewiesen (Murthy, 1996). Aufgrund der hohen Trennleistung der

alkalischen *mdd*-HPLC für den InsP_3 -Bereich zeigen diese InsP_3 -Isomere jedoch ein deutlich unterschiedliches Retentionsverhalten, so daß eine Koelution von $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ mit einem weiteren bisher in Pflanzen nachgewiesenen InsP_3 -Isomer ausgeschlossen werden kann (Mayr, 1990).

Allerdings bedingt der indirekte Nachweis über die Nachsäulenreaktion, daß neben den Inositolphosphaten auch andere Phosphorsäureester (z. B. Nukleotide) sowie organische Säuren (Di- und Tricarbonsäuren) detektiert werden. Eine Differenzierung kann hierbei zunächst nur über die Retentionszeit erfolgen. Um den Nachweis von $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ in HCP-Extrakten absichern zu können, waren daher zusätzliche Kontrollen zwingend erforderlich. Hierzu wurden drei unabhängige Test-Routinen (3-Phytase-Abbau, UV-Detektion, Rechromatographie) etabliert, wobei sowohl physikalische als auch chemische Stoffeigenschaften des $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ (Enzymsubstrat, UV-Absorption, Retentionsverhalten) zur kritischen Beurteilung der Identität herangezogen wurden.

4.5.1 3-Phytase-Abbau

Da die 3-Phytase neben Phytat auch schwächer phosphorylierte Inositolphosphate und andere Phosphorsäureester als Substrat akzeptiert (Ullah, 1994), sollte mit diesem Experiment der Nachweis erbracht werden, daß es sich bei dem $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ -koeludierenden Peak tatsächlich um einen Phosphorsäureester handelte. Eine mögliche Koelution mit einer Di- oder Tricarbonsäure konnte so ausgeschlossen werden.

Zwar wurde zu Beginn der Inkubation ($t = 10$ min, Abb. 19) aufgrund der Substratspezifität der 3-Phytase zunächst nur das Inositolhexakisphosphat schrittweise abgebaut, aber im Verlauf der Reaktion wurden auch alle anderen Verbindungen, die über die *mdd*-HPLC nachweisbar waren, hydrolysiert.

Aufgrund dieses Experiments konnte zu diesem Zeitpunkt sichergestellt werden, daß es sich bei besagtem Peak -und allen anderen Peaks- um Phosphorsäureester handelte.

4.5.2 UV-Detektion

Bei dieser Kontrolle wurde die Tatsache genutzt, daß Inositolphosphate im UV-Bereich nicht absorbieren (Guse et al., 1995; Mayr, 1990), während Substanzen mit konjugierten Doppelbindungen (z.B. Nukleotide) sehr sensitiv detektiert werden können (Abb. 20).

So konnte nach diesem Kontrollexperiment festgestellt werden, daß es sich bei dem koeluiierenden Peak um einen Phosphorsäureester handelt, der nicht im UV-Bereich absorbiert.

4.5.3 Rechromatographie

Die Elutionsbedingungen (z. B. pH-Wert) haben auf das Retentionsverhalten der Inositolphosphat-Isomere sowie anderer Phosphorsäureester einen erheblichen Einfluß. Dies wird sehr deutlich, wenn man Chromatogramme der alkalischen und sauren *mdc*-HPLC vergleicht. So war es möglich, die Identität des $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ nach saurer Chromatographie und anschließender alkalischer Rechromatographie weiter abzusichern.

Auch mit dem sauren System konnte nachgewiesen werden, daß HCP-Extrakte „ $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ “ enthalten. Aufgrund der Peakfläche mußte die Identität jedoch angezweifelt werden. Unter sauren Elutionsbedingungen machte sich somit die mangelnde Isomerentrennung im InsP_3 -Bereich negativ bemerkbar. Dies konnte nachgewiesen werden, indem die InsP_3 -Fraktion nach saurer HPLC noch einmal unter alkalischen Bedingungen rechromatographiert wurde. Unter alkalischen Bedingungen konnte die „ $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ “-Fraktion in mehrere Komponenten aufgetrennt werden, wobei wieder ein Peak mit $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ koeluierte (Abb. 22).

Mit dieser Kontrolle (Rechromatographie) konnte somit gezeigt werden, daß HCP-Extrakte eine Komponente enthalten, die sowohl unter sauren als auch alkalischen Bedingungen mit $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ koeluiert.

Insgesamt konnte über drei unabhängige Kontrollen der Nachweis erbracht werden, daß sich mit dem alkalischen *mdd*-HPLC-System tatsächlich quantitative Veränderungen des Ins(1,4,5)P₃-Isomers in HCP-Extrakten nachweisen lassen.

4.6 Auxin-abhängige Aktivierung des PI-Systems

Für das Phytohormon Auxin liegen zahlreiche Hinweise aus der Literatur vor, die eine mögliche Beteiligung bei gravitropen Reaktionen von Pflanzen belegen (Kapitel 1.3). Mit der vorliegenden Arbeit sollte geklärt werden, ob das pflanzliche PI-System an der Auxin-vermittelten Signaltransduktionskette beteiligt ist.

In den vorliegenden Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß Auxin (100 µM) zu einem raschen Anstieg von Ins(1,4,5)P₃ in HCPs führt. So konnten bereits 15s nach Applikation des Auxins (100 µM) deutlich erhöhte Ins(1,4,5)P₃-Gehalte in HCPs nachgewiesen werden, die nach ca. 30 s ihr Maximum erreichten. Nach weiteren 30s nahmen die Gehalte wieder deutlich ab (Abb. 24). Diese Ergebnisse bestätigen somit Untersuchungen von Ettliger und Lehle (1988) an *Catharanthus* Zellen. Dort ergab sich jedoch erst nach 60s ein Maximum. Darüber hinaus konnten Zbell und Walter (1988) an microsomalen Membranen von *Daucus carota* Zellsuspensionen eine Auxin-abhängige Hydrolyse von Phosphatidylinositolphosphat (PIP₂) und erhöhte Ins(1,4,5)P₃-Gehalte nachweisen. Aus diesen Ergebnissen ergaben sich erste Hinweise, daß das PI-System -infolge der polaren Verteilung von Auxin im Sproß- an der gravitropen Reaktion der Sproßachse beteiligt ist.

Die gängige Theorie zur G-Protein-vermittelten Aktivierung des PI-Systems setzt allerdings einen zur Plasmamembran-Außenseite orientierten Rezeptor voraus (Kapitel 1.4). Obwohl in der Vergangenheit eine Vielzahl Auxin-bindender Proteine in der Zellwand, der Plasmamembran, dem Cytosol und dem Zellkern identifiziert werden konnten (Chen et al., 1999), konnte bisher ein Auxin-Rezeptor an der Plasmamembran-Außenseite nicht nachgewiesen werden. Nur für das Auxin-bindende Protein 1 (ABP1) wird eine Bedeutung für die Auxin induzierte Zellstreckung vermutet (Hobbie, 1998; Jones et al., 1998). Nach Ephritikhine et al. (1987) soll es die Aktivität der *PM/H*⁺-*ATPase* modulieren. Es ist jedoch nicht auszuschließen, daß weitere Proteine ähnliche Funktionen wie ABP1 übernehmen (Chen et al., 1999).

Obwohl das ABP1 primär im ER lokalisiert ist, lassen immunologische Untersuchungen von Löbler und Klämbt (1985) vermuten, daß der funktionale Auxin-Rezeptor an der Plasmamembran-Außenseite lokalisiert ist. So blockierten gegen das ABP1-gerichtete Antikörper eine Auxin-induzierte Hyperpolarisation der Plasmamembran von Tabak-Protoplasten. Da es unwahrscheinlich ist, daß die Antikörper über die Plasmamembran in das Cytosol lebender Protoplasten gelangen (Löbler und Klämbt, 1985; Libbenga und Mennes, 1995), liefern diese Untersuchungen einen deutlichen Hinweis für einen Plasmamembran-gebundenen Auxin-Rezeptor, der zur Außenseite orientiert ist. Den Widerspruch, daß einerseits der überwiegende Anteil des ABP1 im ER lokalisiert ist, während andererseits die Auxin-Rezeptorbindung an der Plasmamembranaußenseite erfolgt (Jones, 1990), erklären Libbenga und Mennes (1995) mit der möglichen Sekretion des ABP über das Endomembransystem.

Für gravitrope Reaktionen von entscheidender Bedeutung ist die Regulation der *PM/H⁺-ATPase* durch Auxin, die eine differenzielle Zellstreckung der Organoberseite und Organunterseite bewirkt (Kapitel 1.3). Experimente von Scherer (1995) belegen, daß die Auxin-abhängige Regulation der *PM/H⁺-ATPase* einem Rezeptor-vermittelten Signaltransduktionsprozeß unterliegt. So konnte über eine Aktivierung der *PLA₂* eine Auxin-abhängige Zellstreckung nachgewiesen werden.

PLA₂s hydrolysieren spezifisch Glycerophospholipide in der sn-2 Position in freie Fettsäuren und Lysolipide (Stahl et al., 1998). Die dabei freigesetzten Fettsäuren übernehmen wahrscheinlich *second messenger* Funktion. Über die Funktion der *PLA₂s* in Pflanzen ist bisher relativ wenig bekannt, Effektor- und Inhibitorstudien stützen jedoch die Möglichkeit einer Beteiligung an der Auxin-abhängigen Aktivierung der *PM/H⁺-ATPase* (Scherer und Arnold, 1997; Yi et al., 1996). Auch für Stomata gibt es Hinweise einer lichtabhängigen Aktivierung der *PLA₂* (Suh et al., 1998), die über die Aktivierung der *PM/H⁺-ATPase* deren Schwellen einleitet.

Im Zusammenhang mit den Ergebnissen dieser Arbeit zur Auxin-abhängigen Aktivierung des PI-Systems und der *PM/H⁺-ATPase* ergibt sich die attraktive Möglichkeit, auf die schon Libbenga und Mennes (1995) hingewiesen haben: Das PI-System bildet ein weiteres Element der Signaltransduktionskette, die eine Auxin-abhängige Aktivierung der *PM/H⁺-ATPase* einleitet. Gestützt wird diese Hypothese

durch Experimente von Scherer (1995), der nach Applikation von Mastoparan eine erhöhte Zellstreckung in Zucchini- und Sonnenblumenhypokotylen nachweisen konnte. Für Mastoparan, ein G-Protein aktivierendes Peptid aus Wespengift, konnte ferner an *Daucus* Zellen eine aktivierende Wirkung auf das pflanzliche PI-System nachgewiesen werden (Cho et al., 1995).

Eigene Untersuchungen mit Neomycin (Abb. 15), einem Inhibitor des PI-Systems, deuten allerdings darauf hin, daß das pflanzliche PI-System nicht an einer Aktivierung der *PM/H⁺-ATPase* beteiligt ist. Auch in anderen Systemen (GCPs, Motor Cells) scheint eine Aktivierung des PI-Systems nicht in einer Aktivierung der *PM/H⁺-ATPase* zu resultieren (Kim et al., 1996; Lee et al., 1996).

4.7 Einfluß von Änderungen des Schwerkraftvektors und mechanischer Stimulation auf das PI-System

Das klassische Modell zur gravi-Perception in höheren Pflanzen, die sogenannte *Stärke-Statolithen-Theorie* (Sack, 1991, 1997; Poff et al., 1994), setzt zur Schwerkraftperception spezialisierte Zellen mit sedimentierenden Amyloplasten voraus. Untersuchungen an stärkefreien Mutanten von *Arabidopsis* (Caspar und Pickard, 1989; Kiss et al. 1989; Kiss et al. 1996; MacCleery und Kiss, 1999), deuten jedoch darauf hin, daß die Amyloplasten-abhängige Schwerkraftwahrnehmung zwar die höchste Sensitivität besitzt, aber nicht zwingend erforderlich ist, um eine Veränderung des Schwerkraftvektors in eine gravitrope Reaktionen umzusetzen. Auch Finn und Digby (1997) weisen darauf hin, daß der spezifische Winkel zum Schwerkraftvektor (gravitropic set-point angle), mit dem Pflanzenorgane wachsen, von deren Entwicklungsstatus abhängt. Das Wachstum kann in dieser Hinsicht nicht alleine über die Statolithen-Theorie erklärt werden. Somit scheinen Pflanzen im Laufe der Evolution ein multisensorisches System zur Schwerkraftwahrnehmung entwickelt zu haben (MacCleery und Kiss 1999; Barlow 1995).

Erste Hinweise, die diese These stützen, lieferten die Experimente mit dem schnelldrehenden Klinostat, der die Bedingungen von Schwerelosigkeit simuliert (Kapitel 2.7.3). Hier konnte eine Aktivierung des PI-Systems nach 3 Minuten simulierter Schwerelosigkeit nachgewiesen werden (Abb. 27). Die gemessenen Effekte können nicht

auf einer Sedimentation der Amyloplasten beruhen, da diese über die uniaxiale Rotation unterbunden wurde. Bei uniaxialer Klinostat-Rotation kann der Einfluß des Schwerkraftvektors allerdings nicht vollständig kompensiert werden (Hoson et al., 1997). Es ist auch nicht auszuschließen, daß die zusätzlich wirksame Zentrifugalbeschleunigung ($4,2 \cdot 10^{-3}g$, bei Radius = 1 mm und 60 rpm, Briegleb, 1992) die Effekte mit beeinflußt. So ist der schnelldrehende Klinostat zwar ein geeignetes und preiswertes tool, erdgebunden mikro-Gravitation zu simulieren, was auch zahlreiche Untersuchungen belegen (Braun, 1997), eine Verifizierung der Ergebnisse unter μg -Bedingungen ist jedoch aus den genannten Gründen unerläßlich.

Zur Verifizierung der Klinostat-Ergebnisse wurde daher das Flugexperiment *TEXUS 35* mit ca. 390 s μg -Bedingungen durchgeführt. Auch in diesem Experiment konnte eine signifikante Erhöhung der Ins(1,4,5) P_3 -Gehalte in HCPs als eine Reaktion auf den veränderten g -Vektor nachgewiesen werden (Abb. 29). Diese wurden allerdings erst nach ca. 7 min Flugdauer, kurz nach Wiedereintritt der *payload* unter hyperg-Bedingungen (13g), gemessen. Die Ergebnisse des μg -Experimentes und der Simulation unterscheiden sich somit deutlich hinsichtlich der zeitlichen Dynamik.

Erdgebundene Experimente, bei denen die hyperg-Phasen des Flugexperimentes *TEXUS 35* simuliert wurden, ergaben keine signifikanten Veränderungen der Ins(1,4,5) P_3 -Gehalte (Abb. 28). Somit muß die nachgewiesene Aktivierung des PI-Systems als eine späte Reaktion auf die μg -Phase des Flugexperimentes interpretiert werden. Damit sind diese Ergebnisse ein Hinweis dafür, daß Hypokotylprotoplasten aus Sonnenblumen über Sensoren verfügen, mit denen sie eine Veränderung des Schwerkraftvektors wahrnehmen können. Die Unterschiede in der zeitlichen Dynamik der Effekte zwischen Klinostat- und Flugexperiment sind ein weiterer Beleg dafür, daß Klinostat-Experimente zwar erste Hinweise auf mögliche Effekte liefern können, aber der Verifizierung unter μg -Bedingungen bedürfen.

Mittlerweile konnten auch Perera et al. (1999) an Maisnodien eine Beteiligung des PI-Systems an schwerkraftvermittelten Signaltransduktionsprozessen nachweisen. In diesem System konnten sie einen Anstieg der Ins(1,4,5) P_3 -Gehalte in der physiologischen Unterseite der Maisnodien schon 10s nach gravi-Stimulation messen. Bei Untersuchungen an Maiskoleoptilen und -wurzeln konnte eine signifikante

Sedimentation von Amyloplasten allerdings erst nach 40s bzw. 4,1min nachgewiesen werden (Sack, 1984; Sack et al., 1985; Griffiths, 1963 in Audus,1979). Somit scheint auch die von Perera et al. (1999) nachgewiesene Aktivierung des PI-Systems nach gravi-Stimulation auf einer von Amyloplasten unabhängigen Schwerkraftwahrnehmung zu beruhen. So liefern diese Experimente als auch das Klinostat- und das Flugexperiment Hinweise dafür, daß das PI-Systems an schwerkraftvermittelten Signaltransduktionsprozessen beteiligt ist. Weiterhin lassen sie vermuten, daß die Aktivierung des PI-Systems auf einer von Statolithen unabhängigen Schwerkraftwahrnehmung beruht, die zudem nicht nur auf spezialisierte gravisensitive Zellen beschränkt ist. Höhere Pflanzen haben somit neben dem Statolithen-System mindestens ein weiteres System zur Perception von Schwerkraft entwickelt. Möglicherweise ist jeder einzelne Protoplast als autonome Einheit zur Wahrnehmung von Schwerkraft befähigt. Aus molekularbiologischen Untersuchungen ergeben sich sogar Hinweise, daß bei höheren Pflanzen selbst in den verschiedenen Organen einer Pflanze unterschiedliche Mechanismen an gravitropen Reaktionen beteiligt sind (Ranjeva et al., 1999; Fukaki et al. 1997; Fukaki et al. 1996; Yamauchi et al., 1996; Arnim und Deng, 1996).

Eine von Statolithen vollkommen unabhängige Schwerkraftwahrnehmung konnte bisher nur an niederen Pflanzen wie *Euglena gracilis* und *Chara sp.* internodial Zellen nachgewiesen werden (Häder und Hemmersbach, 1997; Staves, 1997). Hier scheint der gesamte Protoplast als gravi-Sensor zu fungieren, wobei veränderte Schwerkraftvektoren Ionenkanäle der Plasmamembran (*Euglenen*) bzw. die Cytoplasmaströmung (*Chara*) beeinflussen.

Untersuchungen der jüngsten Zeit zeigten, daß wahrscheinlich auch der extrazellulären Matrix und der Plasmamembran eine wesentliche Bedeutung bei der Perception von Schwerkraft zukommt. Hierbei sollen integrale Rezeptoren der Plasmamembran, die eine Verbindung der extrazellulären Matrix zum Zellinneren herstellen, physikalische Reize wahrnehmen und ins Zellinnere weitergeben (Wayne und Staves, 1996; Staves et al., 1997). In tierischen Zellen stellen die *Integrine* eine Familie solcher Rezeptoren der Zelloberfläche dar (Clark und Brugge, 1995). Sie verbinden die extrazelluläre Matrix mit dem Cytoskelett des Zellinneren und regulieren Signal-Transduktionswege der Zelle

unter anderem bei mechanischem Streß (Ingber, 1999; Clark und Brugge, 1995; Richardson und Parson, 1995; Wang, 1993).

Integrine sind in tierischen Zellen unter Beteiligung von G-Proteinen maßgeblich an der Regulation des Cytoskeletts und des Phospholipid-turnovers beteiligt (Ingber, 1999; Clark und Brugge, 1995; Richardson und Parson, 1995; Miyamoto et al. 1995; Wang et al., 1993), wobei die genauen Regulationsmechanismen noch weitgehend ungeklärt sind. Bekannt ist, daß *Integrine* die Phosphatidylinositol-3-Kinase (führt zur Bildung von $PI(3,4,5)P_3$) und die Phosphatidylinositol-5-Kinase (führt zur Synthese von $PI(4,5)P_2$, Vorstufe von $Ins(1,4,5)P_3$) aktivieren. Auch können sie eine Hydrolyse der Phospholipide und damit unter anderem einen Anstieg des *second messengers* $Ins(1,4,5)P_3$ bewirken. In Pflanzen konnten mittlerweile Verbindungen nachgewiesen werden, die mit Antikörpern gegen tierische *Integrine* reagieren (Katembe et al., 1997). Weiterführende Untersuchungen lassen vermuten, daß bei Pflanzen *Integrine* als gravi- (mechano-) Rezeptoren an gravitropen Reaktionen beteiligt sind (Wayne und Staves, 1996). Auch konnte in Maisnodien eine Schwerkraft-abhängige Aktivierung der Phosphatidylinositol-5-Kinase nachgewiesen werden (Perera et al., 1999).

Aus den Literaturdaten ergeben sich damit neue Hinweise für eine *g*-abhängige, Integrin-vermittelte Aktivierung des PI-Systems. Die für tierische Zellen nachgewiesene Perception von mechanischem Streß durch *Integrine* lassen vermuten, daß auch die Aktivierung des PI-Systems in Protoplasten durch mechanische Stimulation (Abb. 26) über *Integrine* erfolgt.

Weder für die Auxin- noch die Schwerkraft-vermittelten Signaltransduktions-Prozesse ist allerdings bisher die physiologische Bedeutung der Aktivierung des PI-Systems bekannt. Möglicherweise leitet sie jedoch über eine Erhöhung der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration zahlreiche weitere Prozesse ein, die den metabolischen Status der Zellen von einer ruhenden Zelle hin zu einer sich streckenden Zelle ändert (Perera et al., 1999).

5 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, die Signaltransduktion über das pflanzliche PI-System am Beispiel des physikalischen Reizes Schwerkraft zu untersuchen. Hierzu wurde der *second messenger* $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ als zentrales Intermediärprodukt der PI-System-abhängigen Signaltransduktion in Sonnenblumen Hypokotylprotoplasten quantitativ gemessen.

Zunächst war es erforderlich eine Methode zu entwickeln mit der Protoplasten in ausreichender Menge und Qualität gewonnen werden konnten. Zur Qualitätsbeurteilung wurde neben den üblichen Vitalitätstests (lichtmikroskopische Beurteilung, FDA-Test), eine weitere Methode etabliert, mit der die Auxin-abhängige Aktivierung der *PM/H⁺-ATPase in vivo* gemessen werden konnte. Diese berücksichtigt auch mögliche Rezeptorschädigungen an der Plasmamembran und ermöglicht die Optimierung des Test-Systems.

So konnte eine konzentrationsabhängige Aktivierung der *PM/H⁺-ATPase* durch Auxin nachgewiesen werden, die sich durch den H^+ -ATPase Inhibitor DCCD inhibieren ließ. Da eine Inhibierung durch den PI-System-Inhibitor Neomycin unter den gegebenen Bedingungen nicht nachweisbar war, erscheint eine Beteiligung des PI-Systems an der Auxin-abhängigen Aktivierung der *PM/H⁺ATPase* eher als unwahrscheinlich.

Des weiteren war die Etablierung einer nicht radioaktiven Methode zur quantitativen Messung von $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ in HCP-Extrakten wesentlicher Bestandteil der Arbeit. Neben einer ausreichenden Sensitivität (10 pmol) waren die Isomerentrennung im InsP_3 -Bereich und der Probendurchsatz wesentliche Kriterien für die Auswahl der Methode. Diese wurden von der metal-dye-detection-HPLC (*mdd*-HPLC) am besten erfüllt, die zudem den Nachweis auch stärker phosphorylierter Inositolphosphate ermöglicht. Durch eine Kombination beider Analysensysteme (saure/alkalische *mdd*-HPLC) kann zudem ein breites Spektrum an Inositolphosphaten isomerspezifisch untersucht werden. Allerdings waren einige Optimierungen der Standard HPLC erforderlich, um das Rauschen der Basislinie zu mindern und damit die erforderliche Sensitivität (10 pmol) zu erreichen.

Mit der alkalischen *md*d-HPLC konnte ein mit Ins(1,4,5)P₃ koeluierender Peak in HCP-Extrakten nachgewiesen werden. Zur Absicherung der Identität wurden drei weitere unabhängige Methoden (3-Phytase-Abbau, UV-Absorption, Rechromatographie) etabliert, die alle das Ergebnis bestätigten.

In Zeitreihenuntersuchungen konnten mit der alkalischen *md*d-HPLC quantitative Veränderungen der Ins(1,4,5)P₃-Gehalte nach Auxinbehandlung (100 µM) in HCPs nachgewiesen werden. Die Aktivierung des PI-Systems scheint aber nicht in einer Aktivierung der *PM/H*⁺-ATPase zu resultieren.

Experimente mit simulierter Schwerelosigkeit sowie mikro-Gravitation ergaben erste Hinweise, daß HCPs als autonome Einheit Veränderungen des *g*-Vektors wahrnehmen können. Weiterhin scheint das PI-System an der Umsetzung des physikalischen Reizes Schwerkraft in ein chemisches Signal beteiligt zu sein.

Schließlich konnte gezeigt werden, daß auch die einfache mechanische Stimulation von HCPs eine Aktivierung des PI-Systems bewirkt.

6 Literaturverzeichnis

- Abel, S. and Theologis, A. (1996):** Early genes and auxin action. *Plant Physiology*, 111, 9 - 17
- Alexandre, J. and Lassales, J. P. (1992):** Intracellular Ca^{2+} release by InsP_3 in plants and effect of buffers on Ca^{2+} diffusion. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.*, 338, 53 – 61
- Alexandre, J., Lassalles, J. P. and Kado, R. T. (1990):** Opening of Ca^{2+} channels in isolated red beet root vacuole membrane by inositol 1,4,5 trisphosphate. *nature*, 343, 567 – 570
- Allen, G. J., Muir, S. R. and Sanders, D. (1995):** Release of Ca^{2+} from individual plant vacuoles by both InsP_3 and cyclic ADP-ribose. *Science*, 268, 735 – 737
- Anderson, J. M. and Cormier, M. S. (1978):** Calcium dependent regulator of NAD kinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 84, 595 – 602
- Arnim, A. and Deng, X.-W. (1996):** A role for transcriptional repression during light control of plant development. *BioEssays*, 18, 905 - 910
- Arslan-Cerim, N. (1966):** The redistribution of radioactivity in geotropically stimulated hypocotyls of *Helianthus annuus* pretreated with radioactive Calcium. *journal of Experimental Botany*, 17, 236 – 240
- Audus, L. J. (1962):** The mechanism of the perception of gravity by plants. *Symp. Soc. Exp. Biol.*, 16, 196 – 228
- Audus, L. J. (1979):** Plant Geosensors. *Journal of Experimental Botany*, 30, 1051 - 1073
- Barlow, P. W. (1995):** Gravi perception in Plants: a multiplicity of systems derived by evolution? *Plant Cell Environment*, 18, 951 - 962
- Bennett, M. J., Marchant, A., Green, H. G., May, S. T., Ward, S. P., Millner, P. A., Walker, A. R., Schulz, B. and Feldmann, K. A. (1996):** *Arabidopsis* AUX1 gene: a permease-like regulator of root gravitropism. *Science*, 273, 948 – 950
- Berridge, M. J. (1993):** Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature*, 361, 315 – 325
- Biswas, S., Dalal, B., Sen, M. and Biswas, B. B. (1995):** Receptor for myo-inositol trisphosphate from the microsomal fraction of *Vigna radiata*. *Biochem. J.*, 306, 631 – 636
- Björkman, T. (1988):** Perception of gravity by plants *Adv. Bot. Res.*, 15, 1 - 41
- Björkman, T. and Cleland, R. (1991):** The role of extracellular free Ca^{2+} gradients in gravitropic signaling in maize roots. *Planta*, 185, 379 – 384
- Boss, W. F. and Massel, M. O. (1985):** Polyphosphoinositides are present in plant tissue culture cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 132 (3), 1018 – 1023

- Braun, M. (1997):** Gravitropism in tip-growing cells. *Planta*, 203, 11 - 19
- Briegleb, W. (1992):** Some qualitative aspects of the fast-rotating clinostat as a research tool. *ASGSB Bull* 5: 23 – 30
- Briegleb, W. (1967):** Ein Modell zur Schwerelosigkeits-Simulation an Mikroorganismen. *Naturwissenschaften*, 54, 167 - 170
- Briskin, D. P. and Gawienowski, M. C. (1996):** Role of the Plasma Membrane H⁺-ATPase in K⁺ Transport. *Plant Physiology*, 111, 1199 – 1207
- Briskin, D. P. and Hanson, J. B. (1992):** How does the plant plasmamembrane H⁺-ATPase pump Protons? *Journal Experimental Botanie*, 43, 269 – 289
- Brosnan, J. M. and Sanders, D. (1990):** Inositol trisphosphate-mediated Ca²⁺ release in beet microsomes is inhibited by heparin. *FEBS Lett.*, 260, 70 – 72
- Brosnan, J. M. and Sanders, D. (1993):** Identification and characterization of high-affinity binding sites for inositol trisphosphate in red beet. *The Plant Cell*, 5, 931 – 940
- Buscher, B. A. P., van der Hoeven, R. A. M., Tjaden, U. R., Andersson, E. and van der Greef, J. (1995):** Analysis of inositol phosphates and derivatives using capillary zone electrophoresis-mass spectrometry. *Journal of Chromatography (A)*, 712, 235 – 243
- Canut, H., Carrasco, A., Rossignol, M. and Ranjeva, R. (1993):** Is vacuole the richest store of IP₃-mobilizable calcium in plant cells? *Plant Science*, 90, 135 – 143
- Caspar, T. and Pickard, B. G. (1989):** Gravitropism in a starchless mutant of *Arabidopsis*. Implications for the starch-statolith theory of gravity sensing. *Planta* 177, 185 - 197
- Chen, Q. and Boss, W. F. (1991):** Neomycin inhibits the Phosphatidylinositol Monophosphate and Phosphatidylinositol Bisphosphate Stimulation of Plasma Membrane ATPase Activity. *Plant Physiology*, 96, 340 - 343
- Chen, R., Rosen, E. and Masson, P. H. (1999):** Gravitropism in Higher Plants. *Plant Physiology*, 120, 343 – 350
- Cho, H. T. and Hong, Y. T. (1995):** Effect of IAA on synthesis and activity of the plasmamembrane H⁺-ATPase of sunflower hypocotyls, in relation to IAA-induced cell elongation and H⁺ extrusion. *Journal Plant Physiology*, 145, 395 –397
- Cho, M. H., Tan, Z., Erneux, C., Shears, S. B. and Boss, W. F. (1995):** The Effects of Mastoparan on Carrot Cell Plasma Membrane Polyphosphoinositide Phospholipase C. *Plant Physiology*, 107, 845 –856
- Cholodny, N. (1927):** Wuchshormone und Tropismen bei den Pflanzen. *Biologisches Zentralblatt*, 47, 604 - 626
- Clark, E. A. and Brugge, J. S. (1995):** Integrins and Signal Transduction Pathways: The Road Taken. *Science*, 268, 233 - 239

- Cleland, R. E., Cosgrove, D. J. and Tepfer, M. (1987):** Long-term acid-induced wall extension in an in vitro system. *Planta*, 170, 379 – 385
- Cosgrove, D. J. (1989):** Characterization of long-term extension of isolated cell walls from growing cucumber hypocotyls. *Planta*, 177, 121 - 130
- Cosgrove, D. J. (1997):** Cellular mechanisms underlying growth asymmetry during stem gravitropism. *Planta*, 203, 130 - 135
- Cosgrove, D. J. and Li, Z. (1993):** Role of expansin in developmental and light control of growth and wall extension in oat coleoptiles. *Plant Physiology*, 103, 1321 – 1328
- Coté, G. G. and Crain, R. C. (1992):** Artifactual Elevation of the Apparent Levels of Phosphatidic Acid and Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate during Short term labeling of Plant Tissue with Radioactive Precursor. *Plant Physiology*, 100, 1042 – 1043
- Cramer, H. (1998):** Untersuchungen zur Rolle von Inositol 1,4,5-trisphosphat in der pflanzlichen Signaltransduktion. Dissertation, Bonn.
- Cramer, H., Meinhard, M., Schulz, M. and Schnabl, H. (1998):** Immunological detection of an inositol 1,4,5-triphosphate receptor in microsomes from *Vicia faba* (L) and *Zea mays* (L.) and *broadbean* vacuoles. *Int. J. Plant Sci.*, 159 (5), 750 – 752
- Davis, K. R., Lyon, G. D., Darvill, A. G. and Alberheim, P. (1984):** Host –pathogen interactions. XXV. Endopolygalacturonic acid lyase from *Erwinia carotovora* elicits phytoalexin accumulation by releasing plant cell wall fragments. *Plant Physiology* 74, 52 – 60
- Dean, N. M. and Beaven, M. A. (1989):** Methods for the Analysis of Inositol Phosphates. *Analytical Biochemistry*, 183, 199 – 209
- Dehnecke, C. (1880):** Über nicht assimilierende Chlorophyllkörper. Bonner Inauguraldissertation. *Bot. Zeit* , 38, 795 – 798
- del-Pozo, J. C., Timpte, C., Tan, S., Callis, J. and Estelle, M. (1998):** The ubiquitin-regulated protein RUB1 and auxin response in *Arabidopsis*. *Science*, 280, 1760 - 1763
- Dolk, H. E. (1936):** Geotropism and the growth Substance (translated by Dolk-Hoek F., Thiman, K. V. from *Geotropie en Groeistof*, 1930). *Rec. Trav. Bot. Neerl.*, 33, 509 - 585
- Donie, F. and Reiser, G. A. (1989):** A novel, specific binding protein assay for quantitation of intracellular inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate (InsP₄) using a high affinity InsP₄ receptor from cerebellum. *FEBS Lett.* 254, 155 – 158
- Drobak, B. K. and Ferguson, I. B. (1985):** Release of Ca²⁺ from plant hypocotyl microsomes by inositol-1,4,5-trisphosphate. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 130, 1241 – 1246

- Einspar, K. J., Peeler, T. C. and Thompson, G. A. (1989):** Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphate Phospholipase C and Phosphomonoesterase in *Dunaliella salina* Membranes. *Plant Physiology*, 90, 1115 - 1120
- Ephritikhine, G., Barbier-Briggo, H., Müller, J. F. and Guern, J. (1987):** Auxin effect on the transmembrane potential difference of wild-type and mutant protoplasts exhibiting a differential sensitivity to auxin. *Plant Physiology*, 83, 801 - 804
- Ettlinger, C. and Lehle, L. (1988):** Auxin induces rapid changes in phosphatidylinositol metabolites. *Nature*, 331, 176 - 178
- Evans, M. L. (1991):** Gravitropism: Interaction of sensitivity modulation and effector redistribution. *Plant Physiology*, 95, 1 – 5
- Evans, M. L. and Ishikawa, H. (1997):** Cellular specificity of the gravitropic motor response in Roots. *Planta*, 203, 115 – 122
- Ferris, C. D. and Snyder, S. H. (1992):** Inositol phosphate receptors and calcium disposition in the brain. *Journal of Neuroscience*, 12 (5), 1567 - 1574
- Firn, R. D. and Digby, J. (1997):** Solving the puzzle of gravitropism – has a lost piece been found? *Planta*, 203, 159 - 163
- Firn, R.D. and Digby, J. (1980):** The establishment of tropic curvatures in Plants. *Annu. Rev. Plant Physiology*, 31, 131 – 148
- Fukaki, H., Fujisawa, H. and Tasaka, M. (1996):** SGR1, SGR2 and SGR3: novel genetic loci involved in shoot gravitropism in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology*, 110, 945 - 955
- Fukaki, H., Fujisawa, H. and Tasaka, M. (1997):** The RHG gene is involved in root and hypocotyl gravitropism in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiology*, 38, 804 – 810
- Gabev, E., Kasianowicz, J. Abbott, T. and McLaughlin (1989):** Binding of neomycin to phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP₂). *Biochimica et Biophysica Acta*, 979, 105 – 112
- Gil, P.X, Liu, Y., Orbovic, V., Verkanp, E., Poff, K. L. and Grenn, P. J. (1994):** Characterization of the auxin-inducible SAUR-AC1 gene for use as a molecular genetic tool in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 104, 777 – 784
- Goldsmith, M. H. M. (1977):** The polar transport of Auxin. *Annu. Rev. Plant Physiology*, 28, 439 – 478
- Goswami, K. K. A. and Audus, L. J. (1976):** Distribution of calcium, potassium, and phosphorus in *Helianthus annuus* hypocotyls and *Zea mays* Coleoptiles in relation to tropic stimuli and curvatures. *Ann. Bot. (London) [N. S.]*, 40, 49 – 64
- Gougler, J. A. and Evans, M. L. (1981):** Adaption of corn roots to exogenously applied auxin. *Physiology Plantarum*, 51, 394 – 398
- Guilfoyle, T. J., Hagen, G Ulmasov, T. and Murfett, J.(1998):** How Does Auxin Turn On Genes? *Plant Physiology*, 118, 341 - 347

- Guse, A. H., Goldwisch, A., Weber, K. and Mayr, G. W. (1995):** Non-radioactive, isomer-specific inositol phosphate mass determinations: high-performance liquid chromatography-micro-metal-dye detection strongly improves speed and sensitivity of analyses from cells and micro-enzyme assays. *Journal of Chromatography (B)*, 672, 189 - 198
- Haberlandt, G. (1900):** Über die Perzeption des geotropischen Reizes. *Ber. Dtsch. Bot. Ge.*, 18, 261 - 272
- Häder, D. P. and Hemmersbach, R. (1997):** Graviperception and graviorientation in flagellates. *Planta*, 203, 7 - 10
- Häder, D.-P., Rosum, A., Schäfer, J. and Hemmersbach, R. (1995):** Gravitaxis in the flagellate *Euglena gracilis* is controlled by an active gravireceptor. *Journal of Plant Physiology*, 146, 474 – 480
- Hager, A., Menzle, H. und Krauss, A. (1971):** Versuche und Hypothese zur Primärwirkung des Auxins beim Streckungswachstum. *Planta*, 100, 47 – 75
- Hahne, G. and Lörz, H. (1988):** Release of Phytotoxic Factors from Plant Cell Walls During Protoplast Isolation. *Journal Plant Physiology* Vol. 132, 345 – 350
- Hannenberg, A., Matano, K., Takeuchi, K. and Tsukatani, H. (1981):** Properties of phosphatidylinositol 4-kinase I from suspension cultured *Catharanthus roseus* cells. *Plant Science*, 112, 53 – 63
- Hanson, K. R. and McHale, N. A. (1988):** A Starchless Mutant of *Nicotiana glauca* Containing a modified Plastid Phosphoglucomutase, *Plant Physiol.* 88, 838 - 844
- Harrison, M. A. and Pickard, B. G. (1989):** Auxin asymmetry during gravitropism by tomato hypocotyls. *Plant Physiology*, 89, 652 – 657
- Helsper, J. P. F. G.; De Groot, P. F. M.; Linskens, H. F. and Jackson, J. F. (1986):** Phosphatidylinositol Phospholipase C Activity in Pollen of *Lilium Longiflorum*. *Phytochemistry*, 25, 2053 - 2055
- Helsper, J. P. F. G.; Heemskerk, J. W. M. and Veerkamp, J. H. (1987):** Cytosolic and particulate phosphatidylinositol phospholipase C activities in pollen tubes of *Lilium longiflorum*. *Physiologia Plantarum*, 71, 120 - 126
- Hetherington, A. and Trewavas, A. J. (1982):** Calcium dependent protein kinase in pea shoot membranes. *FEBS Lett.*, 145, 67 – 71
- Hirayama, T., Mitsukawa, N., Shibata, D. and Shinozaka, K. (1997):** AtPLC 2, a gene encoding phosphoinositide-specific phospholipase c, is constitutively expressed in vegetative and floral tissues in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biol.*, 34, 175 – 180
- Hobbie, L.J. (1998):** Auxin: molecular genetic approaches in *Arabidopsis*. *Plant Physiology Biochemistry*, 36, 91 - 102
- Hooley, R. (1998):** Plant hormone perception and action: a role for G-protein signal transduction. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.*, 353, 1425 – 1430

- Hoson, T., Kamisaka, S., Masuda, Y., Yamashita, M. and Buchen, B. (1997):** Evaluation of the three-dimensional clinostat as a simulator of weightlessness. *Planta*, 203, 187 – 197
- Huang, C. H., Yan, A. K. F., Crain, R. C. and Coté, G. C. (1994):** Phosphoinositide specific phospholipase C in oat roots. *Plant Physiology*, 105, 105-
- Ingber, D. (1999):** How cells (might) sense microgravity. *The FASEB Journal*, 13 (Supplement), 3 – 15
- Irvine, R. F. (1986):** In: *Phosphoinositides and Receptor Mechanisms*. Putney, J. W., Jr. (ed.), A. R. Liss, New York, 89 – 107
- Irvine, R. F. (1990):** *Methods in Inositide Research*, Irvine, R. F. (ed.) Raven Press, Ltd., New York, 83 – 108
- Ishikawa, A., Tsubouchi, H., Iwasaki, Y. and Asahi, T. (1995):** Molecular cloning and characterization of a cDNA for the α subunit of a G protein from rice. *Plant Cell Physiology*, 36, 353 - 359
- Ishikawa, H. and Evans, M. L. (1993):** The Role of the Distal Elongation Zone in the Response of Maize Roots to Auxin and Gravity. *Plant Physiology*, 102, 1203 – 1210
- Iwami, S. and Masuda, Y. (1974):** Geotropic response of cucumber hypocotyls. *Plant Cell Physiology*, 15, 121 - 129
- Iwami, S. and Masuda, Y. (1976):** Distribution of radio labeled auxin in geotropically stimulated stems of cucumber and pea. *Plant Cell Physiology*, 17, 227 – 237
- Jahn, T., Fuglsang, A. T., Olsson, A., Brüntrop, I. M., Collinge, D. B., Volkmann, D., Sommarin, M., Palmgren, M. G. and Larsson, C. (1997):** The 14-3-3 protein interacts directly with the C-terminal region of the plant plasma membrane H^+ -ATPase. *Plant Cell*, 9, 1805 - 1814
- Jahn, T., Johansson, F., Lüthen, H., Volkmann, D. and Larsson, C. (1996):** Reinvestigation of auxin and fusicoccin stimulation of the plasma-membrane H^+ -ATPase activity. *Planta*, 199, 359 – 365
- Jones, A. M. (1990):** Do we have the auxin receptor yet? *Physiologia Plantarum*, 80, 154 - 158
- Jones, A. M., Im, K-H., Savka, M. A., Wu, M-J., DeWitt, N. G., Shillito, R. and Binns, A. N. (1998):** Auxin-dependent cell expansion mediated by overexpressed auxin-binding protein 1. *Science*, 282, 1114 - 1117
- Jones, A. M., Im, K-H., Savka, M. A., Wu, M-J., DeWitt, N. G., Shillito, R. and Binns, A. N. (1998):** Auxin-dependent cell expansion mediated by overexpressed auxin-binding protein 1. *Science*, 282, 1114 - 1117
- Josefsson, L. G. and Rask, L. (1997):** Cloning of a putative G-protein coupled receptor from *Arabidopsis thaliana*. *Eur. J. Biochem.*, 249, 415 - 420

- Kamada, Y. and Muto, S. (1994):** Stimulation of phosphatidylinositol turnover in the plasmamembrane of tobacco suspension culture cells. *Biochem. Biophys. Acta*, 1093, 72 – 79
- Katembe, W. J., Swatzell, L. J., Makaroff, C. A. and Kiss, J. Z. (1997):** Immunolocalization of integrin-like proteins in *Arabidopsis* and *Chara*. *Physiologia Plantarum*, 99, 7 - 14
- Keller, E. and Cosgrove, D. J. (1995):** Expansins in growing tomato leaves. *Plant Journal*, 8, 795 – 802
- Kim, H. Y., Coté, G. G. and Crain, R. C. (1996):** Inositol 1,4,5-trisphosphate may mediate closure of K⁺ channels by light and darkness in *Samanea saman* motor cells. *Planta*, 198, 279 – 287
- Kiss, J. Z. and Sack, F. D. (1989):** Reduced gravitropic sensitivity in roots of a starch-deficient mutant of *Nicotiana glauca*. *Planta*, 180, 123 - 30
- Kiss, J. Z., Wright, J. B. and Caspar, T. (1996):** Gravitropism in roots of intermediate-starch mutants of *Arabidopsis*. *Physiol. Plant*, 97, 237 - 244
- Knight, T.A. (1806):** On the direction of the radicle and germen during the vegetation of seeds. *Phil. Trans. Royal Soc. ; London* 99 - 108
- Kurosaki, F. and Nishi, A. (1984):** Elicitation of phytoalexin production in cultured carrot cells. *Physiology Plant Pathology* 24, 169 – 176
- Kurosaki, F. and Nishi, A. (1984):** Elicitation of phytoalexin production in cultured carrot cells. *Physiology Plant Pathology* 24, 169 – 176
- Larkin, P. J. (1976):** Purification and viability determinations of plant protoplasts. *Planta* 128, 213 – 216
- Lebert, M. and Häder, D.-P. (1997):** How Euglena tells up from down. *Nature*, 379, 590
- Lee, J. S. and Evans, M. L. (1985):** Polar transport of ⁴⁵Ca²⁺ across the elongation zone of gravistimulated roots. *Plant Cell Physiology*, 26, 1587 – 1595
- Lee, J. S., Mulkey, T. J. and Evans, M. L. (1984):** Inhibition of polar calcium movement and gravitropism in roots treated with Auxin transport inhibitors. *Planta*, 160, 536 – 543
- Lee, Y. Choi, Y. B., Suh, S., Lee, J., Assmann, S. M., Joe, C. O., Kelleher, J. F. and Crain, R. C. (1996):** Abscisic Acid-Induced Phosphoinositide Turnover in Guard Cell Protoplasts of *Vicia faba*. *Plant Physiology*, 110, 987 - 996
- Lenne P. and Chupeal, M. (1983):** Isolation and cultur of sunflower protoplasts. *Plant Science Letters* 30, 297-301
- Leonard, R. T. (1982):** The plasma membrane ATPase of plant cells: cation or proton pump? In: *Membranes and Transport*, Martinosi (ed.), Plenum, New York, Vol 2, 633 – 637

- Leyser, H. M. O., Pickett, F. B., Dharmasiri, S. and Estelle, M. (1996):** Mutations in the AXR3 gene of *Arabidopsis* result in altered auxin response including ectopic expression from the SAUR-AC1 promotor. *Plant Journal*, 403 - 413
- Li, Y., Hagen, G. and Guilfoyle, T. J. (1991):** An Auxin-responsive Promotor is differentially induced by Auxin gradients during tropisms. *Plant Cell* , 3, 1167 – 1175
- Li, Z. C., Durachko, D. M. and Cosgrove, D. J. (1993):** An oat coleoptile wall protein that induces wall extension in vitro and that is antigenetically related to a similar protein from cucumber hypocotyls. *Planta*, 191, 349 - 356
- Libbenga, K. R. and Mennes, A. M. (1995):** Hormone Binding and Signal Transduction. In: *Plant Hormones*, Davis, P. J. (ed), Kluwer Academic Publishers, 272 – 297
- Libbenga, K. R., Maan, A. C., Van der Linde, P. C. G. and Mennes, A. M. (1985):** Auxin receptors. In: *Hormones, Receptors and Cellular Interactions in Plants*, Chadwick, C. M. and Garrod, D. R. (ed) Cambridge University Press, 1 – 68
- Löbler, M. and Klämbt, D. (1985):** Auxin-binding Protein from coleoptile membranes of corn (*Zea mays* L.). II. Localisation of a putative receptor. *Journal Biological Chemistry*, 260, 9854 – 9859
- Lohse, G. and Hedrich, R. (1992):** Characterisation of the plasma-membrane H⁺-ATPase from *Vicia faba* guard cells. *Planta*, 188, 206 - 214
- Lomax, T. L., Muday, G. K. and Rubery, P. H. (1995):** Auxin transport. In: Davies, P. J. (ed.), *Plant Hormones, Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, The Netherlands, 509 – 530
- Lommel, C. and Felle, F. H. (1997):** Transport of Ca²⁺ across the tonoplast of intact vacuoles from *Chenopodium album* L. suspension cells: ATP-dependent import and inositol-1,4,5-trisphosphate-induced release. *Planta*, 201, 477 – 486
- Ma, H. (1994):** GTP-binding proteins in plants: new member of an old family. *Pl. Molec. Biol.*, 26, 1611 – 1636
- Ma, H., Yanofsky, M. F. and Huang, H. (1991):** Isolation and sequence analysis of TGA1 cDNAs encoding a tomato G protein α subunit. *Gene*, 107, 189 – 195
- Ma, H., Yanofsky, M. F. and Meyerowitz, L. M. (1990):** Molecular cloning and characterisation of GPA1, a G protein α subunit gene from *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 87, 3821 – 3825
- MacCleery, S. A. and Kiss, J. Z. (1999):** Plastid Sedimentation Kinetics in Roots of Wild-Type and Starch-Deficient Mutants of *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 120. 183 - 192
- MacGregor, L. C. and Matschinsky, F. M. (1984):** An enzymatic fluorimetric assay for myo-inositol. *Anal. Biochem.*, 141, 382 – 389

- Martinoia, E., Locher, R. and Vogt, E. (1993):** Inositol trisphosphate metabolism in subcellular fractions of barley (*Hordeum vulgare* L.) mesophyll cells. *Plant Physiology*, 102, 101 - 105
- Maslanski, J. A. and Busa, W. B. (1990):** A Sensitive and Specific Mass Assay for myo-Inositol and Inositol Phosphates. In: *Methods in Inositide Research*, Irvine, R. F. (ed.) Raven Press, Ltd., New York, 113 – 126
- Mayr, G. W. (1990):** Mass Determination of Inositol Phosphates by High-Performance Liquid Chromatography with Postcolumn Complexometry (Metal – Dye Detection). In: *Methods in Inositide Research*, Irvine, R. F. (ed.) Raven Press, Ltd., New York, 83 – 108
- McClure, B. A. and Guilfoyle, T. J. (1989):** Tissue print hybridization. A simple technique for detecting organ- and tissue-specific gene expression. *Plant Molecular Biology*, 12, 517 – 524
- McQueen-Mason, S. and Cosgrove, D. J. (1995):** Expansin mode of action on cell walls: Analysis of wall hydrolysis, stress relaxation, and binding. *Plant Physiology*, 107, 87 - 100
- Memon, A. R. and Boss, W. F. (1990):** Rapid Light-induced Changes in Phosphoinositide Kinases and H⁺-ATPase in Plasma Membrane of Sunflower Hypocotyls. *J. Biol. Chem.*, 265 (25), 14817 – 14821
- Memon, A. R., Rincon, M. and Boss, W. F. (1990):** Inositol trisphosphate metabolism in carrot (*Daucus carota* L.) cells. *Plant Physiology*, 91, 477 – 480
- Migliaccio, F. and Rayle, D. L. (1989):** Effect of asymmetric auxin application on *Helianthus* hypocotyl curvature. *Plant Physiology*, 91, 466 - 468
- Mirza, J. I., Olsen, G. M., Iversen, T. H. and Maher, E. P. (1984):** The growth and gravitropic responses of wild-type and auxin resistant mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Physiologia Plantarum*, 60, 516 – 522
- Miyamoto, S., Teramoto, H., Coso, O. A., Gutkind, S. J., Burbelo, P. D., Akiyama, S. K. and Yamada, K. M. (1995):** Integrin Function: Molecular Hierarchies of Cytoskeletal and Signaling Molecules. *The Journal of Cell Biology*, 131 (3), 791 - 805
- Morré, D. J. and Brightman, A. O. (1997):** Parallel inhibition by external osmotica of auxin-induced elongation in stem sections and auxin-stimulated NADH oxidase activity of plasma membrane vesicles from soybean hypocotyls. *Plant Physiol. Biochem.*, 34 (4), 311 - 319
- Mu, J. H., Chua, N. H. and Ross, E. M. (1997):** Expression of human cholinergic receptors in tobacco. *Plant Molec. Biol.*, 34, 357 – 362
- Müller, A., Guan, C., Gälweiler, L., Tanzler, P., Huiser, P., Marchant, A., Parry, G., Bennett, M., Wisman, E. and Palme, K. (1998):** AtPIN2 defines a locus of *Arabidopsis* for root gravitropism control. *EMBO Journal*, 17, 6903 – 6911
- Murthy, P., P., N. (1996):** Inositol Phosphates and Their Metabolism in Plants, *Subcellular Biochemistry*, 26, 227 – 255

- Napier, R. M. and Venis, M. A. (1995):** Auxin action and auxin-binding proteins. *New Phytol.*, 129, 167 - 201
- Nemec, B. (1900):** Über die Art der Wahrnehmung des Schwerkraftreizes bei den Pflanzen. *Ber. Btsch. Ges.*, 18, 241 - 245
- Oecking, C. and Hagemann, K. (1999):** Association of 14-3-3 proteins with C-Terminal autoinhibitory domain of the plant plasma-membrane ATPase generates a fusicoccin-binding complex. *Plante*, 142, 61 – 65
- Oecking, C., Piotrowski, M., Hagemeyer, J. and Hagemann, K. (1997):** Topology and target of the fusicoccin-binding 14-3-3 homologs of *Commelina communis*. *The Plant Journal*, 12 (2), 441 – 453
- Okpodu, C. M., Gross, W., Burkhard, W. and Boss, W. (1993):** Purification and characterisation of a soluble phosphatidylinositol 4-kinase from carrot suspension culture cells. *Plant Physiology*, 107, 491 – 500
- Palmer, S. and Wakelam, M. J. O. (1989):** The Ins(1,4,5)P₃ binding site of bovine adrenocortical microsome – function and regulation. *Biochemical Journal*, 260, 593 – 596
- Palmer, S. and Wakelam, M. J. O. (1990):** Mass Measurement of Inositol 1,4,5-Trisphosphate Using a Specific Binding assay. In: *Methods in Inositide Research*, Irvine, R. F. (ed.) Raven Press, Ltd., New York, 127 – 134
- Perrera, I. Y., Heilmann, I. and Boss, W. F. (1999):** Transient and sustained increase in inositol-1,4,5-trisphosphate precede the differential growth response in gravistimulated maize pulvini. *Proc. nat. Acad. Sci. USA*, 96 (10), 5838 - 5843
- Pfaffmann, H., Hartmann, E., Brightman, A. O. and Morre, D. J. (1987):** Phosphatidylinositol Specific Phospholipase C of Plant Stems. *Plant Physiology*, 85, 1151 - 1155
- Pickard, B. G. (1971):** In: *Gravity and the Organism* (S. A. Gordon and M. J. Cohen, eds.); Univ. of Chicago Press, Chicago, Illinois, 89 - 96
- Pickard, B. G. (1985):** Roles of hormones, protons and calcium in geotropism. In: *Encyclopedia of plant physiology*, Pharis, R. and Reid, D. (ed), Springer-Verlag, Berlin, 11, 193 – 281
- Pickard, B. G. and Thimann, K. V. (1966):** Geotropic response of wheat coleoptiles in absence of amyloplast starch. *J. Gen. Physiol.* 49, 1065 - 1086
- Plakidou-Dymock, S. Dymock, D. and Hooley, R. (1998):** A higher plant seven-transmembrane receptor that influences sensitivity to cytokinins. *Curr. Biol.*, 8, 315 – 324
- Poff, K. L., Janoudi, A. K., Rose, E. S., Orbovic, V., Konjevic, R., Fortin, M. C. and Scott, T. K. (1994):** The physiology of tropisms. In: Meyerowitz, E. M. and Sommerville, C. R. (eds.) *Arabidopsis*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, NY, 639 - 664

- Poulsen, C., Mai, Z. M. and Borg, S. (1994):** A *Lotus japonicus* cDNA encoding an a subunit of a heterotrimeric G-Protein. *Plant Physiology*, 105, 1453 – 1454
- Ranjeva, R., Graziana, A. and Mazars, C. (1999):** Plant graviperception and gravitropism: a newcomer's view. *The FASEB Journal*, 13, 135 - 141
- Ranjeva, R., Graziana, A. and Mazars, C. (1999):** Plant graviperception and gravitropism: a newcomer's view. *The FASEB Journal*, 13, 135 – 141
- Rayle, D. L. (1973):** Auxin induced hydrogen-ion excretion in *Avena* coleoptiles and its implications. *Planta*, 114, 63 – 73
- Rayle, D. L. and Cleland, R. E. (1970):** Enhancement of wall loosening and elongation by acid solutions. *Plant Physiology*, 46, 250 – 253
- Rayle, D. L. and Cleland, R. E. (1972):** The in vitro acid growth response: relation to in-vivo growth responses and auxin action. *Planta*, 104, 282 – 296
- Rayle, D. L. and Cleland, R. E. (1973):** Auxin-induced hydrogen-ion excretion in *Avena* coleoptiles and its implications. *Planta*, 114, 63 – 73
- Rayle, D. L. and Cleland, R. E. (1977):** Control of plant cell enlargement by hydrogen ions. *Curr. Top. Dev. Biol.*, 11, 187 - 214
- Rayle, D. L. and Cleland, R. E. (1992):** The acid growth theory of auxin-induced cell elongation is alive and well. *Plant Physiology*, 99, 1271 – 1274
- Richardson, A. and Parson, T. J. (1995):** Signal transduction through integrins: a central role for focal adhesion kinase. *BioEssays*, 17 (3), 229 - 236
- Rittenhouse, S. E. and Sasson, J. P. (1985):** Mass changes in myo-inositol trisphosphate in human platelets stimulated by thrombin. *Journal Biological Chemistry*, 260, 8657 – 8660
- Rowse, D., Mackay, P., Stirnberg, P., Estelle, M. and Leyser, O. (1998):** Changes in auxin response from mutations in an AUX/IAA gene. *Science*, 279, 1371 - 1373
- Sack, F. D. (1997):** Plastids and gravitropic sensing. *Planta*, Supplement to Vol. 203, *Plant Biology in Space*, 63 – 68
- Sack, F. D. (1991):** Plant gravity sensing. *Int. Rev. of Cytol.*, 127, 193 - 252
- Sack, F. D. (1987):** The structure of the stem endodermis in etiolated pea seedlings. *Can. J. Bot.*, 65, 1514 – 1519
- Sack, F. D. (1984):** Kinetics of amyloplast sedimentation in gravistimulated maize coleoptiles. *Planta*, 161, 459 - 464
- Sack, F. D. and Kiss, J. Z. (1989):** Rootcap structure in wild type and in a starchless mutant of *Arabidopsis*. *Am. J. Bot.*, 75, 454 – 464
- Sack, F. D., Suyemoto, M. M. and Leopold, A. C. (1985):** Amyloplast sedimentation kinetics in gravistimulated maize roots. *Planta*, 165, 295 - 300

- Sandelius, A. S. and Sommarin, M. (1990):** In: Inositol Metabolism in Plants (Morre, D. J., Boss, W. F. and Loewus, F. (eds), Wiley-Liss., New York, 139 - 161
- Scanlon, C. H., Martinec, J., Machackova, I., Rolph, C. E. and Lumsden, P. J. (1996):** Identification and preliminary characterization of a Ca²⁺-dependent high affinity binding site for inositol-1,4,5-trisphosphate from *Chenopodium rubrum*. *Plant Physiology*, 110, 867 – 874
- Scherer, G. F. E. (1995):** Activation of Phospholipase A2 by Auxin and Mastoparan in Hypocotyl Segments from Zucchini and Sunflower. *Journal of Plant Physiology*, 145, 483 - 490
- Scherer, G. F. E. and Arnold, B. (1997):** Inhibitors of animal phospholipase A2 enzymes are selective inhibitors of auxin dependent growth. Implications for auxin-induced signal transduction. *Planta*, 202, 462 – 469
- Schmitz, P. and Schnabl, H. (1989):** Regeneration and evacuation of protoplasts from mesophyll, hypocotyl and petioles from *Helianthus annuus* L.. *Journal of Plant Physiology*, 155, 223 - 227
- Schneider, G. (1969):** Morphactins: physiology and performance. *Ann. Rev. Plant Physiology*, 21, 499 - 536
- Sedbrook, J., Boosirichai, K., Chen, R., Hilson, P., Pearlman, R., Rosen, E., Rutherford, R., Batiza, A., Carrol, K., Schulz, T. (1998):** Molecular genetics of root gravitropism and waving in *Arabidopsis thaliana*. *Gravitational Space Biol. Bull.*, 11, 71 – 78
- Seitz, H. U., Seitz, U. und Alfermann, W. (1985):** Pflanzliche Gewebekultur. Ein Praktikum. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, NewYork
- Seo, H. S., Kim, H. Y., Jeong, J. Y., Lee, S. Y. Cho, M. J. and Bahk, J. D. (1995):** Molecular cloning and chracterization of RGA1 encoding a G protein α subunit from *Oryza sativa* L IR 36. *Plant Molecular Biology*, 27, 1119 – 1131
- Shi, J. S., Gonzales, R. A. and Bhattachryya, M. K. (1995):** Characterisation of a plasma membrane associated phosphoinositide-specific phospholipase C from soybean. *Plant Journal*, 8 (3), 381 – 390
- Sievers, A. and Braun, M. (1996):** The root cap: structure and function. In: Waisel, Y., Eshel, A., Kafkafi, U. (eds) *lant roots: the hidden half*, 2nd edn. M. Dekker, New York, 31 - 49
- Sievers, A.; Buchen, B.; Volkmann, D.; Hejnowicz, Z. (1991):** Role of cytoskeleton in gravity perception. In: Lloyd CW (ed). *The cytoskeletal basis of plant growth and form*. Academic Press, London Toronto, 169 - 182
- Skoglund, E., Carlsson, N. G. and Sandberg, A. S. (1997):** Analysis of inositolmono and diphosphate isomers using high-performance ion chromatography and pulsed amperometric detection. *J. Agricultural Food Chem.*, 45, 12, 4668 – 4673

- Sommarian, M. and Sandelius, A. S. (1988):** Phosphatidylinositol and phosphatidylinositolphosphate kinases in plant plasma membranes. *Biochem. Biophys. Acta*, 958, 268 – 278
- Stahl, U., Ek, B. and Stymne, S. (1998):** Purification and Characterization of a low-Molecular-Weight Phospholipase A2 from Developing Seeds of Elm. *Plant Physiology*, 117, 197 – 205
- Staves, M. P. (1997):** Cytoplasmic streaming and gravity sensing in *Chara* internodal cells. 203, 79 - 84
- Staves, M. P., Wayne, R. and Leopold, A. C. (1995):** Detection of gravity-induced polarity of cytoplasmic streaming in *Chara*. *Protoplasma*, 188, 38 - 48
- Staves, M. P., Wayne, R. and Leopold, A. C. (1997):** The effect of the external medium on the gravitropic curvature of rice (*Oryza sativa*, Poaceae) roots. *American Journal of Botany*, 84, 1522 – 1529
- Suh, S. J., Park, J. and Lee, Y. (1998):** Possible involvement of phospholipase A2 in light signal transduction of guard cells of *Commelina communis*. *Physiologia Plantarum*, 104, 306 – 310
- Thomson, K. S. and Leopold, A. C. (1974):** In-vitro Binding of Morphactins and 1-N-Naphthylphthalamic Acid in Corn Coleoptiles and Their Effects on Auxin Transport. *Planta*, 115, 259 - 270
- Tkachuk, V. A. (1998):** Phosphoinositide metabolism and Ca²⁺ oscillation. *Biochemistry (Moscow)*, 63 (1), 38 – 46
- Trewavas, A. J. (1976):** Post-translational modification of proteins by phosphorylation. *Annu. Rev. Plant Physiology*, 27, 349 – 376
- Trewavas, A. J. and Malhó, R. (1997):** Signal Perception and Transduction: The Origin of the Phenotype. *The Plant Cell*, 9, 1181 – 1195
- Trewavas, T., Briggs, W. R., Bruinsma, J., Evans, M. L., Firn, R., Hertel, R., Isono, M., Jones, A. M., Leopold, A. C., Pilet, P. E., Poff, K. L., Roux, S. J., Salisbury, F. B., Scott, T. K., Sievers, A., Zieschaug, H. E. and Wayne, R. (1992):** Forum. What remains of the Cholodny Went theory? *Plant Cell Environment*, 15, 759 – 794
- Tsunoda, Y. (1993):** Receptor-operated Ca²⁺ signalling and crosstalk in stimulus secretion coupling. *Biochem. Biophys. Acta*, 1154, 105 - 156
- Ullah, A. H. J. (1988):** *Aspergillus Ficum* Phytase: Partial primary structure, substrate selectivity, and kinetic characterization. *Preparative Biochemistry*, 18 (4), 459 – 471
- Ullah, A. H. J. and Phillippy, B. Q. (1994):** Substrate Selectivity in *Aspergillus ficuum* Phytase and Acid Phosphatases Using *myo*-Inositol Phosphates. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 42, 423 – 425
- Underwood, R. H., Greenley, R., Glennon, E. T. Menachery, A. I., Braley, L. M. and Williams, G. H. (1988):** Mass determination of polyphosphoinositides and inositol

- triphosphate in rat adrenal glomerulosa cells with a microspectrophotometric method. *Endocrinology*, 123, 211 – 219
- Utsuno, K., Shikanai, T., Yamada, Y. and Hashimoto, T. (1998):** AGR, an Agravitropic locus of *Arabidopsis thaliana*, encodes a novel membrane-protein family member. *Plant Cell Physiology*, 39, 1111 – 1118
- Volkman, D. and Sievers, A. (1979):** Graviperception in multicellular organs. In: Haupt W., Feinleib, E. (eds) *Encycl. Plant Physiol., New Ser. 7, Physiology of movements*. Springer Berlin, 573 - 600
- Wang, N., Butler, J. P. and Ingber, D. E. (1993):** Mechanotransduction Across the Cell Surface and Through the Cytoskeleton. *Science*, 260, 1124 - 1127
- Watahiki, M. K. and Yamamoto, K. T. (1997):** The massugu1 Mutation of *Arabidopsis* Identified with Failure of Auxin-Induced Growth Curvature of Hypocotyl Confers Auxin Insensitivity to Hypocotyl and Leaf. *Plant Physiology*, 115, 419 – 426
- Wayne, R. and Staves, M. P. (1996):** A down to earth model of gravisensing or Newton's Law of Gravitation from the apple's perspective. *Physiologia Plantarum*, 98, 917 - 921
- Wayne, R.; Staves, M. P. and Leopold, A. C. (1990):** Gravity-dependent polarity of cytoplasmic streaming in *Nitellopsis*. *Protoplasma*, 155, 43 - 57
- Webb, A. A. R., McAinsh, M. R., Taylor, J. E. and Hetherington, A. M. (1996):** Calcium ions as intracellular second messengers in plants. *Advances in Botanical Research*, 22, 45 – 96
- Weiss, G. A., White, E., Huang, H. and Ma, H. (1997):** The G protein α subunit (Gp α 1) is associated with the ER and the plasma membrane in meristematic cells of *Arabidopsis* and cauliflower. *FEBS Lett.*, 407, 364 – 367
- Went, F. W. (1928):** Wuchsstoff und Wachstum. *Recl. Trav. Bot. Neerl.*, 25, 1 - 116
- Widholm, J. M. (1972):** The use of fluorescein diacetate and phenosafranin for determining viability of cultured plant cells. *Stain Technology* 47, 369 - 373
- Williams, R. L. und Katan, M. (1996):** Structural views of phosphoinositide-specific phospholipase C: signalling the way ahead. *Structure*, 4, 1387 – 1394
- Yamamoto, M. and Yamamoto, K. T. (1998):** Differential effects of 1-naphthaleneacetic acid, indole-3-acetic acid and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on the gravitropic response of roots in an auxin-resistant mutant of *Arabidopsis*, aux1. *Plant Cell Physiology*, 39, 660 – 664
- Yamauchi, Y., Fukaki, H., Fujisawa, H. and Tasaka, M. (1997):** Mutations in the SGR4, SGR5 and SGR6 loci of *Arabidopsis thaliana* alter the shoot gravitropism. *Plant Cell Physiology*, 38, 530 – 535

- Yang, W., Burkhard, W. Cavallius, J. Merrick, W. C. and Boss, W. F. (1993):** Purification and characterization of a phosphatidylinositol 4-kinase activator in carrot cells. *J. Biol. Chem.*, 268 (5), 392 – 398
- Yi, H., Park, D. and Lee, Y. (1996):** In vivo evidence for the involvement of phospholipase A and protein kinase in the signal transduction pathway for auxin-induced corn coleoptile elongation. *Physiologia Plantarum*, 96, 356 –368
- Yoshida, Y. and Imai, S. (1997):** Structure and function of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *Japan. J. Pharmacol.*, 74, 125 - 137
- Young, L. M., Evans, M. L. and Hertel, R.(1990):** Correlation between gravitropic curvature and auxin movement across gravistimulated roots of *Zea mays*. *Plant Physiology*, 92, 792 – 796
- Zbell, B. and Walter-Back, C. (1988):** Signal Transduction of Auxin on Isolated Plant Cell Membranes: Indications for a Rapid Polyphosphoinositide Response Stimulated by Indoleacetic Acid. *Journal of Plant Physiology*, 133, 353 – 360
- Zhang, L., Bradley, M. E. and Buxton, I. L. O. (1995):** Inositolpolyphosphate binding sites and their likely role in calcium regulation in smooth muscle. *Intern. J. Cell Biol.*, 27 (12), 1231 - 1248
- Ziegler, H. (1998):** in *Strasburger Lehrbuch der Botanik*, 34. Auflage, Gustav Fischer Verlag, ISBN 3-437-25500-2

Danksagung

Frau Prof. Dr. H. Schnabl möchte ich meinen herzlichen Dank für die Überlassung des interessanten und herausfordernden Themas sowie für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes aussprechen.

Herrn Prof. Dr. H. Goldbach sei gedankt für die freundliche Übernahme des Korreferates.

Mein ganz spezieller Dank gilt Dr. Frank Hübel für die sehr gute Einarbeitung in die Laborarbeit und insbesondere in die Inositolphosphatanalytik sowie für die kritische Beurteilung der Ergebnisse. Auch die zahlreichen, wertvollen und nicht nur fachlichen Diskussionen trugen zu einer freundschaftlichen und kreativen Atmosphäre bei, die half auch schwierige Phasen durchzustehen und ein wichtiger Beitrag zum Gelingen der Arbeit war.

Für ihr besonderes Interesse am Erfolg der Arbeit, ihre stete Diskussionsbereitschaft und manch aufbauendes Wort bei Rückschlägen danke ich Wilma Klever, Kerstin Groß und Peter Helfrich.

Allen Mitarbeitern, Doktoranden und Diplomanden des Institutes, die mich bei der Fertigstellung der Arbeit unterstützt haben, sei gedankt.

Dr. Frank Hübel, Peter Helfrich, Maria Hamacher und meinem Bruder möchte ich für die Hilfe bei der Durchsicht und Korrektur der Arbeit danken.

Ich danke meinen Eltern und allen Freunden, die mit Interesse die Entwicklung der Arbeit begleitet haben.

Die Arbeit wurde finanziert vom Deutschen Zentrum für Luft und Raumfahrt (DLR) und dem Ministerium für Wissenschaft und Forschung (MWF, Düsseldorf).