

Charakterisierung der gravitropen Signaltransduktion in *Helianthus annuus* L. über
Genexpressionsanalysen nach Auxin- und Gravistimulation

Inaugural-Dissertation

zur
Erlangung des Grades

Doktor der Agrarwissenschaften
(Dr.agr.)

der
Hohen Landwirtschaftlichen Fakultät
der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
zu Bonn

vorgelegt
am
21. März 2006

von
Bettina Kriegs

aus
Euskirchen

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online elektronisch publiziert.

Referent: Frau Prof. Dr. H. Schnabl

Korreferent: Herr HD Dr. K. Pillen

Tag der mündlichen Prüfung: 31.05.2006

Characterization of the gravitropic signal transduction pathway in *Helianthus annuus* L. via gene expression analysis after auxin- and gravistimulation

Gravity triggers a biochemical pathway, which determines the orientation of plant organs. Although signal transduction pathways following graviperception are still unclear, auxin has been proposed to be responsible for the bending reaction of the gravistimulated plant organs through its asymmetric distribution. Beside auxin as one element of the signal transduction chain linking gravi-perception to gravi-response, little is known about the molecular mechanisms involved in gravitropism. In order to gain further insight into the link between auxin and gravity the expression profiles of mRNA in etiolated sunflower (*Helianthus annuus* L.) seedlings were analyzed. Therefore, comparative gene expression studies with parallel auxin- and gravistimulation experiments have been established.

Gravistimulation was performed by tilting of sunflower hypocotyls for different time intervals and has been supplemented by simulated (fast clinorotation) and real microgravity conditions during flight experiments (sounding rocket TEXUS40) with isolated hypocotyl protoplasts. Also auxin stimulation was achieved by application of exogenous IAA to hypocotyl protoplasts. While there is evidence for a differential sensitivity of apical and basal hypocotyl protoplasts for auxin as measured by PM/H⁺-ATPase activity, a separate investigation of apical and basal hypocotyl segments provided a more detailed determination of the real gravitropic sensitive tissue.

Screening of mRNA profiles was done by Differential Display (DD) RT-PCR, which is one gene expression profiling technique that does not require prior knowledge of any sequences. Furthermore, DDRT-PCR supplies an approach to identify differentially expressed genes in more than one population by comparing several cell populations or variables simultaneously. Thereby the principle is based on the amplification of a numerousness of randomly primed cDNA-fragments of different lengths.

Using capillary electrophoresis (ABI310) to separate the fluorophor-labeled cDNA fragments revealed the expression of genes predominantly involved in signal transduction, the regulatory machinery of translation and transcription, metabolism and cell wall. Gravistimulation identified the small GTPase Ran, a calmodulin like domain protein kinase (CDPK), histone H2B, beta-6-xylosyltransferase and electron carrier protein cytochrome c, which all were gravity inducible proteins. In contrast, the isolated genes after auxin stimulation like translation initiation factor eIF1, histone deacetylase (HDAC), histone H3 and fructose-1,6-bisphosphat aldolase (FBPA) were all suppressed by auxin. All of the auxin inducible partial gene fragments showed no apparent homology with known DNA-sequences in the gene databases. Comparing the inducibility of the identified genes by gravistimulation and auxin stimulation revealed a negative correlation for Ran and eIF1 and a positive correlation for cytochrome c and xylosyltransferase, whereas a correlation for CDPK, Histone H3 and H2B, HDAC and FBPA between gravity and auxin-induction has still to be investigated.

Differing expression rates were mostly identified in apical segments, which indicate the apical segment as the more sensitive tissue concerning gravitropism and auxin.

Moreover, the results obtained with protoplasts after µg-stimulation by clinorotation and TEXUS-flight and by tilting of entire hypocotyls established a positive correlation. Regarding the clearly increase of Ran-mRNA in all experiments, the comparability of protoplasts and whole plants on transcription level was shown.

Charakterisierung der gravitropen Signaltransduktion in *Helianthus annuus* L. über Genexpressionsanalysen nach Auxin- und Gravistimulation

Die gravitrope Krümmungsreaktion in höheren Pflanzen als Antwort auf eine veränderte Orientierung zum gegebenen Schwerkraftvektor ist geprägt von einer asymmetrischen Verteilung des Pflanzenwuchsstoffes Auxin. Daher scheint Auxin ein wichtiges Element in der Signalweiterleitung des Schwerkraftreizes vom Ort der Schwerkraftwahrnehmung bis zum Ort der gravitropen Antwort zu sein. Auf molekularer Ebene ist die Signaltransduktion allerdings noch weitgehend ungeklärt. Ziel dieser Arbeit war es daher, die gravitrop regulierten Prozesse auf der Basis differentiell exprimierter Gene zu analysieren.

In einem parallelen Versuchsansatz anhand gravistimulierter und Auxin-stimulierter Pflanzen wurde der Zusammenhang von Auxin im Gravitropismus bzw. die Abhängigkeit der gravitrop regulierten Gene von Auxin untersucht. Die Gravistimulationsexperimente erfolgten durch Kippen sieben Tage alter Sonnenblumenhypokotyle um 45°, während die Auxinstimulation durch Applikation von Indol-3-Essigsäure an Hypokotylprotoplasten vorgenommen wurde. Aufgrund der stärkeren Krümmungsreaktion sowie der höheren Auxin-abhängigen PM/H⁺-ATPase-Aktivität im apikalen Hypokotylabschnitt wurden die Hypokotyle in den jeweiligen Experimenten in einen apikalen und basalen Bereich unterteilt, um eine detailliertere Bestimmung des gravisensitiven Pflanzengewebes zu gewährleisten.

Für die Genexpressionsanalysen wurde die Methode der Differential Display (DD)-RT-PCR herangezogen, die einen Vergleich zwischen mehreren Populationen bzw. Variablen gleichzeitig erlaubt, ohne die vorherige Kenntnis der zu untersuchenden Gensequenzen vorauszusetzen. Dabei basiert die Technik auf der Amplifikation von zahlreichen cDNA-Fragmenten unterschiedlicher Länge mittels Zufallsprimer. Die Auftrennung der Fragmente zur Identifizierung differentieller Expressionsraten erfolgte anschließend mit einer Kapillarelektrophorese (ABI310) und erzielte ein reproduzierbares und charakteristisches Peakmuster.

Nach der Gravistimulation konnten fünf verschiedene Gene isoliert werden, die in ihrer Expression jeweils gravitrop hochreguliert wurden. Dazu gehörten die GTPase Ran, eine Calcium-abhängige Proteinkinase, das Histon H2B, Cytochrom c und eine Xylosyltransferase. Nach der Auxinstimulation konnten dagegen vier Gene isoliert werden, die eine herunterregulierte Expression zeigten. Hierzu gehörten der Translations-Initiations-Faktor eIF1, eine Histondeacetylase, das Histon H3 sowie eine Fruktose-1,6-bisphosphat Aldolase. Ein Vergleich in Bezug auf die Induzierbarkeit der identifizierten Gene durch Auxin und Gravistimulation zeigte für Ran und eIF1 eine negative Korrelation und für Cytochrom c und die Xylosyltransferase eine positive Korrelation.

Durch die vorgenommene Segmentierung der Sonnenblumenhypokotyle konnte anhand der Verteilung der differentiell exprimierten Gene sowie der Rate der Transkriptionsänderung der apikale Hypokotylbereich als das sensitivere Gewebe erkannt werden.

Die Genexpression wurde neben der Gravistimulation von ganzen Hypokotylen ebenfalls in Hypokotylprotoplasten unter simulierten (schnelldrehender Klinostat) und realen Mikrogravitationsbedingungen (Rakete TEXUS40) untersucht. Dadurch konnte gezeigt werden, dass sowohl die Umorientierung nach Kippen der Pflanzen als auch die Bedingungen unter Mikrogravitation dieselben Reaktionen auf Transkriptionsebene in den Pflanzen hervorruft. Die positiv korrelierenden Ergebnisse nach den Gravistimulationsexperimenten in den Hypokotylen und in den Protoplasten zeigen zudem, dass Protoplasten als Modellsystem für Genexpressionsanalysen geeignet und die Ergebnisse auf intakte Pflanzen übertragbar sind.

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	8
Tabellenverzeichnis.....	9
1 Einleitung	10
1.1 Gravitropismus	10
1.2 Graviperzeption	10
1.3 Signaltransduktion.....	12
1.3.1 Auxin als primärer Botenstoff.....	12
1.3.2 Auxin-Rezeptoren	14
1.3.3 Sekundäre Botenstoffe	16
1.4 Gravitrope Genexpression.....	17
1.5 Ziele der Arbeit	18
2 Material und Methoden	21
2.1 Pflanzenmaterial und Pflanzenanzucht	21
2.2 Protoplastierung	21
2.3 Auxinstimulation.....	23
2.4 Stimulation durch simulierte Mikrogravitation.....	23
2.5 Stimulation durch reale Mikrogravitation im Flugexperiment TEXUS40.....	23
2.6 Gravistimulation.....	24
2.7 Isolierung von Nukleinsäuren	25
2.7.1 Vorbehandlung von Lösungen und Geräten.....	25
2.7.2 Isolierung von mRNA aus Hypokotylen und Hypokotylprotoplasten.....	25
2.8 Reverse Transkription (RT).....	26
2.9 Polymerase Chain Reaction (PCR)	27
2.9.1 Aufreinigung der PCR-Produkte	28
2.10 Differential Display (DD)-RT-PCR.....	29
2.11 Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE).....	31
2.11.1 GeneRacer™ Kit	31
2.11.2 5'RACE System (Version 2.0).....	34
2.12 Auftrennung von DNA-Fragmenten	36
2.12.1 Kapillarelektrophorese	36
2.12.2 Agarosegelelektrophorese	37

2.12.3	Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	38
2.13	Klonierung eines PCR-Produkts	38
2.13.1	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> -Stämme nach der CaCl ₂ -Methode.....	38
2.13.2	Ligation	39
2.13.3	Hitzeschock-Transformation	39
2.13.4	Medien.....	40
2.14	In-Cell-PCR.....	40
2.15	Sequenzierung	40
2.16	Genidentifikation.....	41
3	Ergebnisse	42
3.1	Screening nach differentiellen Peaks in gravistimulierten Hypokotylen und Auxin-stimulierten Protoplasten.....	42
3.1.1	Differential Display (DD)	43
3.1.2	Auswertung differentieller Peaks	45
3.2	Isolierung, Klonierung und Sequenzierung der differentiellen cDNA-Fragmente	47
3.3	Homologiesuche mit den Teilsequenzen.....	50
3.4	Vervollständigung der partiellen cDNAs	51
3.5	Homologiesuche mit den neu identifizierten Sequenzen	52
3.6	Verifizierung der differentiellen Expression mit genspezifischen Primern	54
3.7	Vergleich der Genexpression nach Auxin- und Gravistimulation mit spezifischen Primern	57
3.8	Expressionsanalysen während simulierter und realer Mikrogravitation	60
3.8.1	Klinorotation	60
3.8.2	TEXUS40 Flug-Experiment.....	62
3.9	Vergleich von gravistimulierten Hypokotylen mit gravistimulierten Protoplasten	66
3.10	Vergleich von apikaler und basaler Genexpression	66
4	Diskussion	68
4.1	Charakterisierung der identifizierten Gene	69
4.1.1	Calcium-abhängige Proteinkinase.....	70
4.1.2	Fruktose-1,6-bisphosphat-Aldolase.....	72
4.1.3	Cytochrom c	74
4.1.4	beta-6-Xylosyltransferase.....	76

4.1.5 Histone	78
4.1.6 Histondeacetylase	81
4.1.7 Translations-Initiations-Faktor eIF1	83
4.1.8 Ran	85
4.2 Vergleichbarkeit von Protoplasten mit intakten Hypokotylen	88
4.3 Vergleich zwischen apikaler und basaler Genexpression	89
4.4 Korrelation zwischen Auxin- und gravistimulierter Genexpression	92
4.5 Graviperzeption	96
4.6 Einordnung der identifizierten Gene in die gravitrope Signaltransduktion	98
5 Zusammenfassung	101
Literaturverzeichnis	103
Abkürzungsverzeichnis	118
Anhang	120

Abbildungsverzeichnis

Abb. 3.1 Ausschnitt aus einem Differential Display nach Auftrennung auf der Kapillarelektrophorese	44
Abb. 3.2 Differentieller Peak B12-363 bp.....	47
Abb. 3.3 Isolierte cDNA-Fragmente nach Gravistimulation.....	48
Abb. 3.4 Isolierte cDNA-Fragmente nach Auxinstimulation.....	49
Abb. 3.5 Isolierte cDNA-Fragmente nach Auxinstimulation.....	49
Abb. 3.6 Verifizierung der differentiellen Ran-Expression.....	55
Abb. 3.7 Verifizierung der differentiellen Expression von Cytochrom c.....	56
Abb. 3.8 Verifizierung der differentiellen Expression von eIF1	56
Abb. 3.9 Expression der Ran-mRNA (B10-666 bp) in Auxin-stimulierter cDNA	58
Abb. 3.10 Expression der Cytochrom c-mRNA (D02-492 bp) in Auxin-stimulierter cDNA.....	58
Abb. 3.11 Expression der eIF1-mRNA (B04-505 bp) in gravistimulierter cDNA.....	59
Abb. 3.12 Ran-Expression nach 0, 200 und 400 s simulierter Schwerelosigkeit im schnelldrehenden Klinostaten	61
Abb. 3.13 eIF1-Expression nach 0, 200 und 400 s simulierter Schwerelosigkeit im schnelldrehenden Klinostaten	62
Abb. 3.14 Parabelflug der TEXUS40 Rakete	63
Abb. 3.15 Ran-Expression in apikalen Protoplasten während des TEXUS40-Fluges	64
Abb. 3.16 Ran-Expression in basalen Protoplasten während des TEXUS40-Fluges.....	65
Abb. 4.1 Modell der gravitropen Signaltransduktion	100

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1 KCl- und Saccharose-Puffer	22
Tabelle 2.2 Enzymlösung für die Isolation der Hypokotylprotoplasten.....	22
Tabelle 2.3 Versuchsplan des μ g-Flugexperimentes	24
Tabelle 3.1 Differentielle Peaks	45
Tabelle 3.2 Homologien	53

1 Einleitung

1.1 Gravitropismus

Das Wachstum höherer Pflanzen ist durch ein ausgeprägtes Schwerkraft-abhängiges Verhalten gekennzeichnet. Diese Orientierung an der Schwerkraft nennt man Gravitropismus. Sie führt dazu, dass der Spross (negativ gravitrop) aus der Erde heraus nach oben wächst, während die Wurzel in der Erde bleibt und (positiv gravitrop) nach unten wächst. Auf diese Weise ist es der Pflanze möglich, Wasser und Nährstoffe aus dem Boden aufzunehmen sowie mit den oberirdischen Pflanzenorganen Photosynthese zu betreiben. Bringt man nun eine Pflanze in eine horizontale Position und ändert damit die Orientierung zum Schwerkraftvektor kann man nach einiger Zeit eine Krümmung der Pflanzenorgane in die Ausgangsrichtung erkennen.

Auf welchem Weg die Pflanze den Gravitationsreiz empfängt (Graviperzeption) und wie genau dieser Reiz weitergeleitet wird (Signaltransduktion), ist Objekt zahlreicher Untersuchungen. Während es zur Graviperzeption einige Theorien gibt (Kiss et al., 1989; Staves, 1997; Blancaflor und Masson, 2003), ist die gravitrope Signaltransduktion weitgehend ungeklärt. Auxin scheint als essentieller Pflanzenwuchsstoff eine wichtige Rolle in dem gravitrop gerichteten Wachstum zu spielen. Das belegen sowohl Studien mit agravitropen Mutanten (Firn et al., 2000) als auch der Nachweis, dass es während der Krümmungsreaktion infolge eines veränderten Schwerkraftvektors zu einer polaren Querverteilung von Auxin im Gewebe kommt (Young et al., 1990).

Mit der Krümmungsreaktion als Antwort auf einen veränderten Gravitationsreiz bleibt die Frage offen, wie es zu der Umverteilung von Auxin in der Pflanze kommt. Hierbei können Genexpressionsstudien auf molekularer Ebene die Suche nach sekundären Botenstoffen, die für die Signalweiterleitung von Bedeutung sind, unterstützen. Die Isolation und Charakterisierung gravitrop relevanter Gene können bei der Identifizierung der einzelnen Schritte in der Signalabfolge während der gravitropen Antwort helfen.

1.2 Graviperzeption

Die am weitesten verbreitete Erklärung dafür, wie Pflanzen die Änderung des Schwerkraftvektors wahrnehmen, ist die Stärke-Statolithen-Hypothese (Kiss et al., 1989). Hierbei sedimentieren Stärke-gefüllte Amyloplasten aufgrund ihrer hohen Dichte im Vergleich zum Cytoplasma auf die physikalische Unterseite der Zelle. Die Bewegung der

Amyloplasten wird dann entweder durch das Cytoskelett (Sievers et al., 1991; Buchen et al., 1993; Volkmann et al., 1999; Palmieri und Kiss, 2005) oder am Endpunkt ihrer Sedimentation wahrgenommen. Hier kommt eventuell der Kontakt zwischen den sedimentierenden Amyloplasten und dem Endoplasmatischen Reticulum (Perbal und Driss-Ecole, 1994; Sack, 1997) oder der Vakuole nahe der internen Plasmamembran für die Perzeption der Schwerkraft in Frage (Merkys und Darginaviciene, 1997; Morita et al., 2002). Amyloplasten findet man beispielsweise in den Columellazellen der Wurzel oder in der Endodermis von jungen dikotylen Sprossen (Sack, 1987; 1991). Fehlt die Stärkescheide, die als Zellschicht das Leitbündel umgibt wie bei der *scarecrow*-Mutante aus *Arabidopsis*, reagiert der Spross der Pflanze agravitrop, während die Wurzel trotz Fehlen der Endodermis eine normale gravitrope Reaktion zeigt (Fukaki et al., 1998). Im Gegenzug dazu konnte bei der Entfernung der Columellazellen mit Hilfe eines Lasers gezeigt werden, dass die Wurzel nach Gravistimulation stark in ihrer Krümmung behindert war (Blancaflor et al., 1998). Dabei reagieren stärkearme Mutanten langsamer auf den Schwerkraftreiz als Wildtypen (Kiss et al., 1996). Allerdings zeigen auch stärkefreie Mutanten eine gewisse gravitrope Reaktion, was bedeutet, dass es vermutlich auch einen Stärke-unabhängigen Mechanismus geben muss (Caspar und Pickard, 1989). Dabei können eventuell die stärkefreien Plastiden selber oder auch der Zellkern als Statolith fungieren und das Cytoskelett kann diese Bewegung wahrnehmen (Kiss et al., 1989; Sack, 1991). Die gravitrope Antwort von niederen Pilzen wie *Phycomyces* und *Physcomitrella* sowie die Differenzierung der Leitbündel und die Polarität der Cytoplasmaströmung in den Internodialzellen mancher Algen wie den *Characeen*, die vollkommen unabhängig von sedimentierenden Statolithen ist, führten zur Theorie des „gravitational pressure models“ (Staves, 1997). Hier wird der Schwerkraftreiz durch den gesamten Protoplasten wahrgenommen, wobei Stärke gefüllte Statolithen die Funktion zusätzlichen Ballasts übernehmen und so die Empfindlichkeit steigern können. Der Protoplast nimmt den Auftrieb innerhalb der Zellwand wahr, so dass die Kräfte, die durch die Gravitation als mechanische Belastung auf die Plasmamembran wirken, Stretch-aktivierbare Ionenkanäle öffnen (Kanzaki et al., 1999).

Als Gravi-Mechanorezeptoren werden Integrine vorgeschlagen, denen in tierischen Zellen eine Beteiligung an Signaltransduktionsprozessen bei mechanischem Stress nachgewiesen werden konnte (Wang et al., 1993; Clark und Brugge, 1995; Ingber, 1999). Integrine verbinden die extrazelluläre Matrix mit dem Cytoskelett oder mit Enzymen des Signaltransduktionsweges (Proteinkinasen, Phospholipidkinasen, Phospholipase C) und

vermitteln möglicherweise die Transduktion der Gravitationskräfte durch die Plasmamembran. In Pflanzen konnten Integrin-ähnliche Proteine als mögliche Elemente einer alternativen Signaltransduktionskette durch Kreuzreaktionen mit Antikörpern gegen tierische Integrine in der Wurzelspitze von *Arabidopsis* sowie in epidermalen Zellen von Seegrassblättern identifiziert werden (Swatzell et al., 1999; Sakurai et al., 2004). *beta1*-Integrin-artige Proteine wurden sogar an der inneren Membran von Amyloplasten festgestellt, was auf einen durch Amyloplastensedimentation initiierten Integrin-vermittelten gravitropen Signalweg hinweist (Lynch et al., 1998). Auch Reuzeau et al. (1997) gingen davon aus, dass das Endomembran-System, welches die äußeren Membranen der Organellen mit einschließt, beta-1 Integrin enthält, und dieses in Assoziation mit dem Cytoskelett wichtige Stoffwechselprozesse durch die Modulation und Bereitstellung von endomembranen Kanälen reguliert. Daher sind Integrine durch ihre Lokalisierung an Endomembranen vielleicht auch innerhalb der Zelle in die Signalweiterleitung involviert.

1.3 Signaltransduktion

1.3.1 Auxin als primärer Botenstoff

Es ist allgemein anerkannt, dass die gravitrope Krümmung nach Verlagerung des Schwerkraftvektors aus einer lateralen Umverteilung von Auxin resultiert. Auxin kommt in Pflanzen natürlicherweise hauptsächlich als Indol-3-Essigsäure (IAA) vor und ist als Wachstumshormon für die Pflanze essentiell. Während Auxin im Spross das Wachstum fördert, wirkt es bei gleichen Konzentrationen auf die Wurzel wachstumshemmend. Dabei wird Auxin im Sprossapex synthetisiert und polar in den Parenchymzellen der Bündelscheide in die darunter liegenden Gewebe bis in die Wurzelspitze transportiert. Vom Leitbündelgewebe aus wird Auxin dann lateral in die äußeren Gewebe der Wachstumszone geleitet.

Schon 1928 konnten Cholodny und Went zeigen, dass nicht nur infolge eines einseitigen Lichtreizes wie im Phototropismus, sondern auch durch die Perzeption eines geänderten Schwerkraftvektors ein Quertransport von Auxin als Reaktion auf diesen Reiz stattfindet (Trewavas, 1992). Dabei wird der mechanische Stimulus der intrazellulären Amyloplastenumverteilung in ein biochemisches Signal umgewandelt, welches einen Auxingradienten quer durch die ganze Pflanze auslöst (Masson, 1995; Blancaflor und Masson, 2003; Perbal und Driss-Ecole, 2003). Dieser laterale Auxintransport konnte ebenfalls durch radiomarkiertes IAA sowohl im Spross (Parker und Briggs, 1990) als auch in der

Wurzel (Young et al., 1990; Young und Evans, 1996) nachgewiesen werden. Während der basipetale Auxintransport in der Wurzel in einer vertikal wachsenden Pflanze symmetrisch ist, wird Auxin in einer horizontal ausgerichteten Pflanze hauptsächlich in der unteren Flanke polar transportiert und hemmt dort das Wachstum (Young et al., 1990). Allerdings konnten Experimente mit exogen appliziertem Auxin zeigen, dass die frühe Phase der gravitropen Krümmung der Wurzelspitze, welche eine gesteigerte Zellstreckungsrate in der distalen Streckungszone voraussetzt, nicht durch Auxin gehemmt werden konnte und demnach für Auxin unempfindlich zu sein scheint (Ishikawa und Evans, 1993).

Der interzelluläre Transport von Auxin wird durch transmembrane Transporter vermittelt. Dabei konnten in der Wurzel und im Spross sowohl Mitglieder der AUX1-Familie als Influx-Carrier identifiziert werden, die IAA in seiner protonisierten Form aus dem Apoplasten aufnehmen, als auch Proteine der AGR/PIN Familie, die als Efflux-Carrier IAA in der Ionenform aus der Zelle heraus transportieren (Noh et al., 2003; Friml, 2003). PIN1 und AUX1 scheinen eine Funktion bei dem Transport von Auxin aus den Leitgefäßen in die Wurzelspitze zu übernehmen, woraufhin PIN4 den Transport von Auxin in Richtung der apikalen Columellazellen reguliert. In den Columellazellen ist AUX1 schließlich für die Aufnahme von Auxin verantwortlich, während PIN3 den Auxin-Efflux gewährleistet (Swarup et al., 2004; Friml et al., 2002).

Nach einer Gravistimulation konnte beobachtet werden, dass der laterale Auxintransport von einer schnellen Umverteilung von Auxin-Efflux Carriern begleitet ist (Friml et al., 2002; Friml, 2003). Bei PIN3 kann man beispielsweise innerhalb von zwei Minuten nach Gravistimulation eine Bewegung von einer basalen zu einer lateralen Position in der Zelle beobachten (Friml et al., 2002). Möglicherweise wird die Verteilung von Auxin-Transportern direkt durch Veränderungen des Aktin-Netzwerks reguliert (Friml et al., 2002). Alternativ könnte die Verteilung bzw. die Aktivität der Auxintransporter auch durch die gravitrop induzierte Veränderung des pH-Wertes und des Ca^{2+} -Spiegels in der Wurzelcolumella oder durch Signaltransduktionsprozesse wie der Proteinphosphorylierung reguliert werden (Scott und Allen, 1999; Plieth und Trewavas, 2002; Muday und Murphy, 2002).

Zudem ist Auxin, nach der Säure-Wachstums-Hypothese, möglicherweise durch die Aktivierung der Plasmamembran H^+ -ATPase an der differentiellen Zellstreckung auf der dem Gravitationsreiz zugewandten Seite (im Falle der Wurzel) und auf der vom Gravitationsreiz abgewandten Seite (im Falle des Sprosses) beteiligt (Rayle und Cleland, 1992). Im Zuge der

Auxin-Querverteilung säuert sich hierbei die konvexe, stärker wachsende Flanke an. Dabei erfolgt die pH-Wert-Änderung wahrscheinlich sowohl durch eine Auxin-induzierte Aktivierung vorhandener H^+ -ATPasen (Kim und Kaufman, 1995) als auch durch deren Neusynthese (Frias et al., 1996). Der darauf folgende Protonenausstrom in die Zellwand ist für eine gesteigerte Dehnbarkeit der Zellwand verantwortlich. Die apoplastische pH-Wert-Absenkung führt nämlich zu einer Aktivierung von Enzymen, die Ionenbindungen in der Zellwand lösen können. Zu diesen Enzymen gehören die Expansine, die im sauren pH-Bereich Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Polysacchariden der Zellwand lösen (Cosgrove und Li, 1993), und wahrscheinlich auch Transglycosylasen wie die Xyloglucan-Endotrans-Glycosylase, welche Zuckerreste von einem auf ein anderes Polysaccharid übertragen (Catala et al., 1997). Ebenso steigert Auxin durch Stimulierung der H^+ -ATPase auch die Aufnahme osmotisch wirksamer Substanzen sowie die Aktivität von Enzymen, die am Aufbau der Zellwand beteiligt sind.

1.3.2 Auxin-Rezeptoren

Nach Erreichen des Zielortes kann Auxin zum einen durch direkte Effekte, aber auch indirekt über die Genexpression auf die Zelle wirken. Zu den direkten Auswirkungen von Auxin gehören zum Beispiel Veränderungen in der Ionen-Bewegung in und aus der Zelle durch die Plasmamembran sowie eine in der Zellstreckung resultierende Zellwandausdehnung. Diese Vorgänge werden nach Bindung von Auxin an spezifische transmembrane Proteinrezeptoren eingeleitet. Einen möglichen Auxinrezeptor stellt das Auxin-bindende Protein ABP1 dar. In Mais, wo es zuerst isoliert werden konnte, wurde es vorwiegend im ER gefunden, obwohl der pH-Wert im ER eigentlich zu hoch für eine Auxin-Bindung ist. Kleinere Fraktionen konnten aber auch an der Plasmamembran nachgewiesen werden (Leyser, 2002). In Reis wiederum scheint ein intrazelluläres ABP1 mit der Plasmamembran-Protonenpumpe zu interagieren und als Auxinrezeptor zu dienen (Kim et al., 2001b). Vielleicht wird eine geringe Menge des Proteins auch an die Oberfläche der Zellen transportiert und fungiert dort als Rezeptor. In jedem Fall kann die Auxin-induzierte Zunahme der Membranspannung nicht nur mit Antikörpern gegen die $PM-H^+$ -ATPase gehemmt werden, sondern auch mit Antikörpern gegen ABP1. Das bedeutet, dass ABP1 an der Hyperpolarisation durch die Aktivierung der Protonenpumpe beteiligt ist (Leblanc et al., 1999).

Die indirekten Auxin-Effekte werden hingegen durch Änderungen auf Transkriptionsebene vermittelt. Dabei können durch Auxin induzierbare Gene in primäre und sekundäre Gene eingeteilt werden. Zu den primären Genen gehören zum Beispiel eine Gruppe von Auxin-

stimulierten mRNAs, die so genannten SAURs (small auxin up-regulated RNAs), deren asymmetrische Verteilung während der gravitropen Reaktion innerhalb von 20 Minuten nachgewiesen werden konnte. Daneben gibt es die Aux/IAA-Genfamilie, die als Repressoren oder Aktivatoren für die Expression der späten Auxin-induzierbaren Gene dienen, die GH3-Genfamilie, die in die Inaktivierung von IAA involviert ist, die Stress-induzierbaren GST-ähnlichen Proteine (Glutathion-S-Transferase) und Gene für die ACC-Synthase (1-Aminocyclopropan-1-Carboxylase), die den Ethylenbiosyntheseweg regulieren. Sie werden induziert, indem bereits vorhandene Proteine, hauptsächlich Transkriptionsfaktoren, durch Phosphorylierung aktiviert werden (Hagen und Guilfoyle, 2002). Diese wandern daraufhin in den Kern, um dort die Expression der so genannten frühen Gene zu verstärken oder zu unterdrücken (Abel und Theologis, 1996). Die Auxin-induzierbaren Gene beinhalten in ihren Promotoren Auxin-sensitive Elemente (AuxRE), an denen Transkriptionsfaktoren aus der Familie der „Auxin-response“-Faktoren (ARF) binden (Ulmasov et al., 1997a, 1999; Hagen and Guilfoyle, 2002). Während bei niedrigen Konzentrationen von Auxin die Transkriptionsfaktoren durch eine Interaktion mit Aux/IAA-Proteinen gehemmt werden (Ulmasov et al., 1997b), induzieren hohe Konzentrationen den Abbau von Aux/IAA-Proteinen. Bei diesem Prozess stimuliert Auxin eine Interaktion mit dem SCF^{TIR1} E3 Ubiquitin Ligase Komplex, der für die Ubiquitinierung der als Repressoren agierenden Aux/IAA-Proteinen verantwortlich ist und somit die Inhibierung der ARF Transkriptionsfaktoren aufhebt (Tiwari et al., 2001, 2003). Diese Modifikation konnte als eine direkte Bindung von Auxin mit dem TIR1-Rezeptor (transport inhibitor response) identifiziert werden (Kepinski und Leyser, 2005; Dharmasiri et al., 2005). Auf diese Weise regulieren ARFs sowohl in der Wurzel als auch im Hypokotyl die Expression von „Auxin-responsive“-Genen, gleichzeitig verstärken sie in einem Regelmechanismus wiederum die Transkription von Aux/IAA Genen (Weijers et al., 2005).

Zu den Auxin-induzierbaren Genen gehören vor allem die Gene, die während der Zellstreckung eine Rolle spielen. Daher aktiviert Auxin Gene für die Induktion und Beschleunigung von exocytotischen Prozessen sowie Gene für die Synthese von Proteinen, die für die Fusion von Membranen notwendig sind. Daneben werden Gene für die Synthese der PM/H⁺-ATPase induziert, wodurch die Kapazität für den H⁺-Ausstrom in den Apoplasten als Vorbedingung für die Zellwandausdehnung erhöht wird (Hager et al., 1991). Und schließlich werden Gene für die Synthese und Exocytose von bestimmten Proteinen,

Enzymen und Zellwandzwischenprodukten aktiviert, die für den Zellwandmetabolismus und die „Reparatur“ der Protonen-freien und Turgor-gedehnten Zellwand notwendig sind.

1.3.3 Sekundäre Botenstoffe

Während primäre Botenstoffe als Signale vom Ort der Wahrnehmung zum Ort der Reaktion verlagert werden, setzen sekundäre Botenstoffe (*second messenger*) das Signal in eine physiologische Reaktion um. Die Wahrnehmung des gravitropen Signals führt so zu einem transienten Anstieg bestimmter Signalmoleküle im Cytocol, die als *second messenger* die Signalwirkung verstärken. Zu diesen *second messengern* gehören Calcium, Wasserstoff H^+ , und Inositoltrisphosphat ($Ins(1, 4,5)P_3$), deren kurzfristiges Auftreten in den frühen Stadien des Gravitropismus beobachtet werden konnte (Scott and Allen, 1999; Fasano et al., 2001; Perera et al., 2001; Plieth and Trewavas, 2002).

Als Protonenquelle kommt zum einen das Endoplasmatische Retikulum in Frage, indem es als Reaktion auf ein Amyloplasten-Kontakt oder durch Aktin-induzierte Druck- und Zugkräfte möglicherweise Calcium-Ionen abgibt (Yoder et al., 2001; Zheng und Staehelin, 2001). Zum anderen werden an den Stellen in der Plasmamembran, an denen das Cytoskelett und die Zellwand miteinander verbunden sind, mechanosensitive Calcium-Kanäle durch Druck- und Zugkräfte geöffnet, was ebenfalls in einem Anstieg an cytosolischen Calcium und der Aktivierung an Calcium-abhängigen biochemischen Abläufen und Entwicklungsvorgängen resultiert (Trewavas und Knight, 1994).

Ein weiterer Beweis für die Bedeutung von Calcium im Gravitropismus ist der gravitrop induzierte Anstieg des sekundären Botenstoffs $Ins(1,4,5)P_3$, durch dessen Bindung an endomembrane $Ins(1,4,5)P_3$ -Rezeptoren Ca^{2+} aus dem ER oder der Vakuole freigesetzt werden kann (Munnik et al., 1998). Die Ausschüttung von $Ins(1, 4,5)P_3$ gehört mit zu den frühesten Reaktionen auf verschiedenste Stimuli (Perera et al., 1999). Auch in gravitrop stimulierten Hypokotyl-Protoplasten aus *Helianthus annuus* konnte bereits gezeigt werden, dass der Phosphoinositid-Signalweg ein Element der gravitropen Signaltransduktionskette darstellt (Müller, 2000; Schnabl, 2001; 2002). Hier konnte sowohl eine μg -Stimulierung der Protoplasten während des TEXUS35-Fluges und im schnell drehenden Klinostaten als auch eine Auxinbehandlung einen Anstieg von $Ins(1,4,5)P_3$ nach verschiedenen Zeitintervallen im Vergleich zu den nicht stimulierten Kontrollen auslösen.

Des Weiteren scheinen H^+ -Ionen bei der Vermittlung des differentiellen Wachstums eine wichtige Rolle zu spielen. Während der gravitropen Antwort kann man eine vorübergehende

Alkalinisierung des Cytosols und eine Ansäuerung des Apoplasten beobachten (Scott und Allen, 1999; Fasano et al., 2001; Johannes et al., 2001). Dabei sind gravistimulierte Änderungen des Membranpotentials (Monshausen et al., 1996; Sievers et al., 1995) im Einklang mit der Aktivierung der Plasmamembran H^+ -ATPase in der frühen Phase der Schwerkraftwahrnehmung. Auch die vakuoläre H^+ -ATPase als Protonen freisetzendes Protein, ist in den Gravitropismus involviert, da sie für die Erhaltung des pH-Wertes wichtig ist. Durch eine Inhibierung der V-ATPase mit Bafilomycin A1 konnte eine verstärkte Wurzelkrümmung in *Arabidopsis* gezeigt werden (Scott und Allen, 1999).

1.4 Gravitrope Genexpression

Für die Analyse der molekularen Abläufe hinsichtlich der Reaktion höherer Pflanzen auf die Schwerkraft werden sehr oft Mutanten mit einem veränderten gravitropen Verhalten herangezogen (Simmons et al., 1995; Migliaccio et al., 2002). Durch deren Vergleich mit den Wildtypen können diejenigen Gene isoliert werden, die für ein normal gerichtetes schwerkraftabhängiges Wachstum essentiell sind. Obwohl schon verschiedene Gravitropismus-Gene identifiziert werden konnten, scheint bis jetzt nur ein Gen, *ARG1* (Altered Response to Gravity), welches in *Arabidopsis*-Mutanten isoliert werden konnte, mit großer Wahrscheinlichkeit in der frühen Phase der gravitropen Signalwahrnehmung und Signaltransduktion bedeutend zu sein (Sedbrook et al., 1999). Die ARG-Mutante zeigt sowohl einen veränderten Gravitropismus in der Wurzel als auch im Spross (Sedbrook et al., 1999). Das Protein besitzt eine DNA-J-Domäne, die in Wechselwirkung mit dem Cytoskelett steht, indem sie Calmodulin-abhängig an Aktinfilamente bindet und auf diese Weise spezifische Signalkaskaden vermittelt. Daneben sind zahlreiche Mutanten untersucht worden, die eine Unter- bzw. Über-Empfindlichkeit gegenüber Auxin zeigen wie zum Beispiel die Wurzel-Gravitropismus-Mutanten *axr2* und *axr3*. Doch nur in wenigen Fällen wie bei den Auxin-Influx- und Efflux-Carriern konnte die genaue Funktion des defekten Gens charakterisiert und somit ein näherer Einblick in den Wahrnehmungs- bzw. Signalweiterleitungsmechanismus verschafft werden (Firn et al., 2000).

Neben den langwierigen Mutationsanalysen gibt es auch Untersuchungen zur gravitropen Genexpression. Hierbei wird die Tatsache genutzt, dass der Transkriptionslevel spezifischer Gene schon früh während der Signaltransduktion nach Gravistimulation reguliert wird (McClure and Guilfoyle, 1989). Mit Hilfe einer Microarray-Analyse zur Untersuchung des Transkriptionsmusters in *Arabidopsis*-Keimlingen in der frühen gravitropen Antwort konnten

Moseyko et al., (2002) zeigen, dass die gravitrop regulierten Gene hauptsächlich in die funktionalen Kategorien oxidativer Stress, Pathogenabwehr, Stoffwechsel, Transkription, Zellwand/Plasmamembran, Signalweiterleitung, Hitzeschockproteine, Ethylen-empfindliche Bindungsfaktoren und Calcium-bindende Proteine eingeteilt werden können. Weiterhin konnte das erste Mal eine Beteiligung von Genen, die bei oxidativem Stress auftreten wie Cytochrom P450, Peroxidase ATP N, Glutathion S-Transferase, β -Glucosidase usw., festgestellt werden (Moseyko et al., 2002). Es wurden auch mögliche regulatorische Elemente in der Promotorregion gefunden, die eventuell gravitrop spezifische cis-Elemente darstellen. Auch von Kimbrough et al. (2004) wurde eine Mikroarray-Studie durchgeführt, in der das gravitrope Transkriptionsmuster in der Wurzelspitze von *Arabidopsis* analysiert wurde. Hier gehören die meisten der regulierten Gene in die funktionalen Kategorien Transkription (15%), Zellwandsynthese und Modifikation (8,4%), Stoffwechsel (8,4%), Protein-Umsatz (6,6%) und Signaltransduktion (5,6%). Die meisten der gravitationsspezifischen Gene wurden zwischen fünf und 15 Minuten nach Gravistimulation hochreguliert und konnten als Transkriptionsfaktoren klassifiziert werden (Kimbrough et al., 2004). In der Tendenz konnte eine Herunterregulation der Gene festgestellt werden, die in die Zellwandsynthese, Zellzyklusaktivität und Cytoskelett-Elemente involviert sind, während gleichzeitig eine Hochregulation der Gene gezeigt werden konnte, die in den Stoffwechsel, Elektronentransfer, Abwehrmechanismus und transkriptionale Aktivitäten involviert sind.

Dabei konnte eine sehr schnelle Regulation (*up*- und *down*-Regulation) von Auxin-induzierbaren Genen innerhalb von zwei Minuten nach Gravistimulation konstatiert werden (Kimbrough et al., 2004). Für die polaren Auxin-Carrier AUX1 und EIR1 (PIN2, AGR1) konnte allerdings keine differentielle Expression gezeigt werden (Moseyko et al., 2002). Kimbrough et al. (2004) zeigten ebenfalls, dass der wurzelspezifische Efflux Carrier EIR1, entgegen der bekannten Beteiligung in der gravitropen Antwort, herunterreguliert wurde. Daher wird EIR1 wahrscheinlich auf dem posttranslationalen Level kontrolliert (Sieberer et al., 2000).

1.5 Ziele der Arbeit

Thema der vorliegenden Dissertation ist die Identifizierung und Charakterisierung differentiell exprimierter Gene in gravistimulierten und Auxin-stimulierten Sonnenblumen-Hypokotylen, mit deren Hilfe ein näherer Einblick in die gravitrope Signaltransduktion in *Helianthus annuus* gegeben werden soll.

Zur Stimulierung eines Gravitationsreizes sollen Sonnenblumen-Hypokotyle herangezogen werden, die durch Kippen in einem Winkel von 45° in ihrer Orientierung zum Schwerkraftvektor verlagert werden. Für die Auxinstimulationsexperimente werden dagegen isolierte Hypokotylprotoplasten verwendet, um eine schnelle und homogene Auxinaufnahme zu gewährleisten. Des Weiteren soll eine Segmentierung der Hypokotyle in einen apikalen und basalen Abschnitt vorgenommen werden, um eine detailliertere Bestimmung des eigentlich gravisensitiven Gewebes zu ermöglichen.

Da viele Gene, die zwar eine wichtige physiologische Rolle spielen, nur auf einem niedrigen Level exprimiert werden, sind für eine Charakterisierung sehr genaue Quantifizierungsmethoden mit einer adäquaten Sensitivität erforderlich. Für die Genexpressionsanalysen wird daher die sensitive Methode der Differential Display (DD) RT-PCR gewählt (Liang und Pardee, 1997). Diese direkte Analyse gehört zu den ursprünglichen Methoden zur Identifizierung von differentiell regulierten Genen und beruht auf der reversen Transkription und der Amplifikation von cDNA-Teilpopulationen aus Gesamt-RNA bzw. PolyA⁺-RNA mit Hilfe von Zufallsprimern. Gleichzeitig wird die Auftrennung der erhaltenen cDNA-Fragmente mit einer hochsensitiven Kapillarelektrophorese durchgeführt, die, besonders wenn mehr als zwei Proben miteinander verglichen werden sollen, eine sehr gute Quantifizierungsmöglichkeit bietet.

Die in dieser Arbeit identifizierten gravitrop und durch Auxin regulierten Gene sollen isoliert und sequenziert, und daraufhin mit genspezifischen Primern untersucht werden, um die differentielle Expression zu verifizieren. In Weiterführung der Dissertation von Ralf Theisen (2005) soll zudem die Charakterisierung der ebenfalls mittels Differential Display identifizierten gravitrop regulierten Gene aus gravistimulierten Gesamthypokotylen erfolgen. Dazu gehören ein bereits sequenziertes partielles cDNA-Fragment, bei dem es sich um die GTPase Ran handelt sowie weitere noch zu isolierende differentiell exprimierte cDNA-Fragmente.

Weiterhin soll die Expression der Auxin-induzierten Gene in gravistimuliertem Gewebe sowie der gravitrop induzierten Gene in Auxin-stimuliertem Gewebe untersucht werden, die die nähere Charakterisierung der identifizierten Gene unterstützen. Durch einen Vergleich der transkriptionalen Veränderungen in gravistimulierter und Auxin-stimulierter cDNA können

die identifizierten Gene in Abhängigkeit von Auxin in die gravitrope Signaltransduktion eingeordnet werden.

Schließlich sollen die Gravistimulationsexperimente durch Untersuchungen der Expression unter simulierten und realen Mikrogravitationsbedingungen in apikalen und basalen Hypokotylprotoplasten ergänzt werden.

2 Material und Methoden

2.1 Pflanzenmaterial und Pflanzenanzucht

Für die Stimulationsexperimente wurden Sonnenblumenhypokotyle (*Helianthus annuus*; var. Albena, KWS) sowie Protoplasten, die aus den Sonnenblumenhypokotylen isoliert wurden, verwendet.

Die Oberflächensterilisation der Sonnenblumensamen erfolgte in 3 bis 5%iger Natriumhypochloritlösung sowie 1 % Detergenz (Spüli) für 30 min abgedeckt unter ständigem Rühren auf dem Magnetrührer. Anschließend wurden die Samen mehrmals gründlich mit Leitungswasser gewaschen, bevor sie auf gewässerten Vermiculit als Kultursubstrat in 20 cm x 40 cm Saatschalen ausgesät wurden. Die weitere Anzucht erfolgte in einem Brutschrank im Dunkeln bei 25 °C und 80 % Luftfeuchtigkeit. Nach 7 Tagen wurden die Keimlinge für die Isolation der Hypokotylprotoplasten geerntet oder für die Gravistimulationsexperimente herangezogen.

2.2 Protoplastierung

Eine Protoplastierung der Sonnenblumenhypokotyle war notwendig für die Auxinstimulation, sowie für die Stimulation durch reale und simulierte Schwerelosigkeit. Für die Isolation der Hypokotylprotoplasten in Anlehnung an Lenne et al. (1983) sowie Schmitz und Schnabl (1989), wurden 7 Tage alte Sonnenblumenhypokotyle mit einer Länge von 10 cm bis 12 cm und einem Durchmesser von 2,6 mm geerntet. Diese wurden zunächst von Wurzel und Keimblätter befreit und dann in einen apikalen und basalen Bereich geteilt, wobei die ersten 4 cm vom Keimblatt ausgehend als apikal definiert wurden. Danach wurden die apikalen und basalen Segmente durch ein speziell entwickeltes Schneidegerät mit zwei parallel angeordneten Rasierklingen gezogen, wodurch man eine dreifache Längsteilung erzielte. Die Hypokotylabschnitte (20 g FM) wurden auf jeweils 30 mL Enzymlösung (Tab. 2.2) in 10 cm x 20 cm Plastikschalen (Gerda-Box) verteilt, so dass sie nebeneinander angeordnet liegend nur leicht mit der Enzymlösung bedeckt waren. Nach einer Inkubationszeit von 5,5 h in einem Wasserbad (Schüttelwasserbad 1083, Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel) bei 25 °C unter leichtem Schütteln waren die Hypokotylabschnitte so weit verdaut, dass die Protoplasten aus dem Gewebe herausgelöst werden konnten. Dieses wurde durch ein vorsichtiges Bewegen der Hypokotyle mit einem Spatel unterstützt. Um das unverdaute

Pflanzenmaterial abzutrennen, wurde die Protoplastensuspension anschließend durch ein Nylonnetz (200 µm) gesiebt, und in einem 50 mL Zentrifugenröhrchen gesammelt. Nach einer Zentrifugation für 5 min bei 50 g (Heraeus; Minifuge GL) wurde der Überstand abgesaugt und das Pellet durch langsames Invertieren in KCl-Puffer I (Tab. 2.1) gewaschen. Dieser Schritt wurde nochmals wiederholt und die Protoplasten konnten sich nach der Zentrifugation in KCl-Puffer I über Nacht im Kühlschrank (5 °C) regenerieren. Die über Nacht sedimentierten Protoplasten wurden in 30 mL Saccharose-Puffer II:KCl-Puffer I (Tab. 2.1) Gemisch (50:50) resuspendiert und mit 1 bis 2 mL KCl-Puffer I überschichtet. Bei der nun folgenden Zentrifugation (5 min; 50 g) sammelten sich die Protoplasten in der Interphase und wurden mit einer abgeschnittenen 1000 µL Pipettenspitze vorsichtig abgenommen. Nach zwei weiteren Waschschrritten mit KCl-Puffer I wurden die gereinigten Protoplasten mit einem Hämocytometer gezählt und die Vitalität anhand von Cytoplasmaströmungen unter einem Lichtmikroskop (250-fache Vergrößerung, Leitz Laborlux) kontrolliert.

Tabelle 2.1 KCl- und Saccharose-Puffer

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

Tabelle 2.2 Enzymlösung für die Isolation der Hypokotylprotoplasten

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

2.3 Auxinstimulation

Um eine gleichmäßige Verfügbarkeit von Auxin für alle Zellen des gesamten Hypokotyls zu gewährleisten, wurden für die Auxinstimulation Protoplasten verwendet. Hierzu wurden die apikalen und basalen Hypokotylprotoplasten zunächst in einer nicht so stark gepufferten KCl-Lösung (KCl-Puffer II, Tab. 2.1) resuspendiert und die Konzentration auf $2,5 \cdot 10^6$ Protoplasten pro Milliliter eingestellt. Pro Ansatz wurden 500 μL der Protoplastensuspension mit 5 μL IAA-Stammlösung (10 mM) versetzt (100 μM Finalkonzentration). Dabei wurde das Natriumsalz der Indol-3-Essigsäure (Sigma), angesetzt in KCl II Puffer, verwendet, welches im Gegensatz zur freien Säure wasserlöslich ist. Eine Finalkonzentration von 100 μM IAA war im Gegensatz zu 10 μM IAA in Sonnenblumenhypokotylen in der Lage die PM- H^+ -ATPase zu aktivieren (Müller, 2000). Nach Zugabe von Auxin wurden die Proben 3 bis 4 mal vorsichtig invertiert und nach einer Inkubationszeit von 0 min, 30 min und 60 min mit 1,2 mL Lysispuffer OL1 (Qiagen) fixiert und in flüssigem Stickstoff eingefroren.

2.4 Stimulation durch simulierte Mikrogravitation

Als Vorversuch für das Flug-Experiment TEXUS40 (siehe 2.5) wurde die Simulation der Mikrogravitation (μg) mit Hilfe des schnellrotierenden Klinostaten durchgeführt und die Wirkung auf die Genexpression in den Hypokotylprotoplasten von *Helianthus annuus* untersucht. Im Klinostaten wird die Rotation der Zellen um eine Achse waagrecht zur Richtung des Schwerkraftvektors ermöglicht (Briegleb, 1992). Hierfür wurden jeweils 400000 basale Protoplasten und 1000000 apikale Protoplasten in 500 μL KCl-Puffer I resuspendiert und in Glasröhrchen (4 mm Innendurchmesser) gefüllt. Die Klinorotation erfolgte für jeweils 200 s und 400 s bei 60 rpm. Die Kontrollen wurden währenddessen bei 1 g gelagert. Anschließend wurde die Protoplastensuspension mit 1,2 μL Lysispuffer OL1 (Qiagen) fixiert.

2.5 Stimulation durch reale Mikrogravitation im Flugexperiment TEXUS40

Um den Einfluss von μg auf die Genexpression von pflanzlichen Zellen zu untersuchen, wurde das Flug-Experiment TEXUS40 auf der Raketenabschußstation ESRANGE in Kiruna (Nord-Schweden) in Zusammenarbeit mit der DLR (Deutsches Zentrum für Luft- und Raumfahrt) durchgeführt. Hierbei handelte es sich um ein Parabelflugprogramm mit Höhenforschungsraketen. Nach der Startbeschleunigung wurden nach erreichter Flughöhe von

250 km während der parabelförmigen, beschleunigungslosen Flugphase außerhalb der Erdatmosphäre μ g-Bedingungen von ca. 6 min Dauer erreicht.

Für die μ g-Stimulation wurden frisch isolierte Protoplasten aus *Helianthus annuus* Hypokotylen verwendet und in apikal und basal unterteilt. Die Protoplastensuspension (10^6 Protoplasten/mL) wurde in Einwegspritzen mit einem Volumen von 2,5 mL gefüllt. Diese Spritzen waren durch ein Verbindungsstück, welches mit einer Viton-Kugel verschlossen war, mit einer zweiten Spritze gleichen Volumens verbunden. Die zweite Spritze enthielt 1 mL des Fixiermittels (Lysispuffer OL1, Qiagen). Die Experimentiereinheiten wurden in das auf 4 °C vorgekühlte Modul (TEM-06-21, EADS-Raumfahrttechnik GmbH) eingesetzt und ca. 2 h vor dem Start in die Nutzlast eingebaut. Dort wurden die Proben langsam auf 23 °C temperiert. Während des Fluges wurden die Proben zu acht verschiedenen Zeitpunkten (Tab. 2.3) fixiert, indem das Fixiermittel ferngesteuert in die Protoplastensuspension injiziert wurde. Insgesamt befand sich die Rakete ca. 6 min lang unter μ g-Bedingungen. Eine Stunde nach der Landung konnten die Proben geborgen und bei -20 °C gelagert werden.

Tabelle 2.3 Versuchsplan des μ g-Flugexperimentes

Event	1***	2	3	4	5	6	7	8	9
Zeit [s]*	-22	33	68	134	200	266	332	400	460
g**	1	8	8	μ	μ	μ	μ	μ	>13

* Zeitpunkt vor bzw. nach Start, ** Erdbeschleunigung [$9,81\text{m/s}^2$], *** Bodenkontrolle

2.6 Gravistimulation

Für die Gravistimulation der Sonnenblumenhypokotyle wurden 7 Tage alte Pflanzen im Dunkeln in ihrer Pflanzschale in einem Winkel von 45° gekippt. Nach 15 min konnte man den Beginn einer Aufwärtskrümmung des Hypokotyls erkennen, während nach zwei Stunden ein maximaler Krümmungswinkel erreicht war. Der Vorgang wurde jeweils nach 30 min und 60 min abgestoppt. Dazu wurden die Hypokotyle zuerst in einen apikalen (4 cm ab Keimblatt) und basalen Abschnitt segmentiert und in ca. 1 cm großen Stücken in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Kontrollen wurden anschließend ohne vorheriges Kippen ebenfalls segmentiert und direkt in flüssigem Stickstoff fixiert.

2.7 Isolierung von Nukleinsäuren

2.7.1 Vorbehandlung von Lösungen und Geräten

Zur Sterilisation und Inaktivierung von DNasen wurden alle hitzebeständigen Geräte und Lösungen für 20 min bei 1,3 bar und 120 °C Dampfdruck autoklaviert (Laboratory Vertical Steam Sterilizer Tuttnauer Systec, Breda). Für alle Arbeiten mit RNA wurden die benötigten Glas- und Kunststoffmaterialien 60 min lang bei 1,3 bar und 120 °C Dampfdruck autoklaviert. Hitzeempfindliche Substanzen wurden sterilfiltriert (0,2 µm-Filter).

2.7.2 Isolierung von mRNA aus Hypokotylen und Hypokotylprotoplasten

Die Extraktion der mRNA aus den auxin- und µg-stimulierten Protoplasten sowie den gravitativ stimulierten Gewebe wurde mit dem Oligotex Direct mRNA Micro Kit (QIAGEN GmbH, Hilden) mittels Affinitätschromatographie durchgeführt. Die in flüssigen Stickstoff fixierten ca. 1 cm großen Hypokotylabschnitte (1,2 g) wurden zunächst in ebenfalls in Flüssigstickstoff gekühlten Metallmörsern durch Druck zerkleinert und anschließend in 2 mL Lysispuffer OL1 (Guanidin-Isothiocyanat) zur Denaturierung und Inaktivierung der RNasen unter Vortexen bei Raumtemperatur lysiert. Die Protoplastensuspensionen wurden direkt mit dem Lysispuffer OL1 (mind. 1:1 (v/v)) versetzt. Um die Viskosität der hochmolekularen genomischen DNA und anderer Zellkomponenten im Lysat zu reduzieren, wurden die Proben zusätzlich mit einem QIAshredder 2 bis 5 min bei 13000 rpm (Biofuge 13, Heraeus-Sepatech, Düsseldorf) homogenisiert. Anschließend wurden 600 µL des Eluats in 1,2 mL ODB Puffer verdünnt, und der Rest des Lysats bei -80 °C eingefroren. Nach einem 3 minütigen Zentrifugationsschritt bei 18000 x g (Tischkühlzentrifuge 1K15, Sigma, Osterode), um verbleibende Proteine und Zelltrümmer zu präzipitieren, wurde der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt und mit 50 µL (Hypokotyle) bzw. 20 µL (Protoplasten) Oligotex Suspension vermischt. Bei der Oligotex-Suspension handelt es sich um Polystyren Latex Partikel, an die dC₁₀T₃₀ Oligonukleotide gekoppelt sind. Da eukaryotische mRNA mit einem Homopolymer von 20 bis 250 Adenosin-Nukleotiden (‘Poly A-Schwanz’) endet, unterscheidet sie sich von der rRNA und der tRNA, und kann so durch die Hybridisierung an Oligo dT Nukleotide von der Gesamt-RNA getrennt werden. Durch die Zugabe einer standardisierten Menge an Oligotex-Suspension erreicht man gleichzeitig eine Nivellierung der mRNA-Mengen. Voraussetzung ist dabei eine Sättigung der Bindung zwischen Oligotex-Partikel und mRNA, wobei die maximale theoretische Bindungskapazität bei 6 µg mRNA pro 10 µl Oligotex-Suspension liegt. Für die Hybridisierung der mRNA an die Säule wurden die

Proben unter hohen Salzkonzentrationsbedingungen (ODB Puffer) und niedrigem pH-Wert 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend 5 min bei 18000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig verworfen, und das Pellet in 100 µL OL1 Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von 400 µL ODB-Puffer wurden die Proben 3 min bei 70 °C im Wasserbad (Schüttelwasserbad 1083, GFL, Burgwedel) erhitzt und wiederum 10 min bei RT inkubiert, um die Poly A⁺ RNA gegenüber der rRNA anzureichern. Es folgte eine Zentrifugation für 5 min bei 18000 g. Der Überstand wurde wieder verworfen und das Pellet wurde in 350 µL Waschpuffer OW1 aufgenommen, um die Oligotex:mRNA Suspension anschließend zur Bindung auf die QIASäule aufzutragen und für 1 min bei 13000 rpm zu zentrifugieren. Die Säule wurde daraufhin noch zweimal mit 350 µL OW2 Puffer gewaschen, indem zweimal für 1 min zentrifugiert wurde. Im Gegensatz zur Hybridisierung der mRNA an die Oligo-dT-Partikel unter hohen Salzbedingungen, wurde nun durch die Reduzierung der Ionenstärke die Poly A⁺ RNA mit 50 µL OEB Puffer eluiert.

2.8 Reverse Transkription (RT)

Zur Herstellung von cDNA wurde das 1st Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (AMV) von Roche verwendet. Als Primer für die reverse Transkription wurden geankerte Oligo-dT-N-Primer der Form T₁₇A, T₁₇C und T₁₇G zu gleichen Teilen verwendet. Dies ermöglichte ein Hybridisieren des Oligo-dT-Primers am Übergang vom Poly-A-Schwanz zum 3'-untranslatierten Bereich einer mRNA, wodurch unerwünschte Variationen der Produktlänge durch Bindung des Oligo-dT-Primers an zufälligen Stellen innerhalb des Poly-A-Schwanzes vermieden wurden. Zusätzlich war der Primer am 5'-Ende durch die Sequenz des M13-reverse-Primers modifiziert und für die spätere Auswertung der PCR-Produkte an der Kapillarelektrophorese mit einem Fluoreszenz-Farbstoff markiert (6-FAM). Die Integration der M13-Sequenz wiederum ermöglichte eine spätere Reamplifikation bei einer höheren Annealingtemperatur. Die Reaktion wurde in einem Gesamtvolumen von 20 µl in 0,5 mL Eppendorfgefäße durchgeführt und setzte sich wie folgt zusammen:

mRNA-Lösung	6,9 µL
RT-Puffer 10x	2 µL
MgCl ₂ 25 mM	4 µL
dNTPs 10 mM	2 µL
Oligo-dT-Primer 80 µM	3,3 µL
RNase Inhibitor (50 U / µl)	1 µL
AMV Reverse Transkriptase (20 U / µl)	0,8 µL

Nach 10 min Annealing bei 25 °C erfolgte die reverse Transkription für 60 min bei 42 °C und wurde mit 5 min bei 99 °C zur Inaktivierung des Enzyms abgeschlossen (Genius Model FGN02TD Techne, Cambridge).

Primer

Oligo-dT₁₇-A 5'-FAM-CGG GCC TCT TCG CTA TTT TTT TTT TTT TTT TTA-3'
 Oligo-dT₁₇-C 5'-FAM-CGG GCC TCT TCG CTA TTT TTT TTT TTT TTT TTC-3'
 Oligo-dT₁₇-G 5'-FAM-CGG GCC TCT TCG CTA TTT TTT TTT TTT TTT TTG-3'

2.9 Polymerase Chain Reaction (PCR)

Die PCR-Technik wurde in dieser Arbeit für verschiedene Zielsetzungen herangezogen. Dazu gehörte die Synthese spezifischer cDNA-Fragmente, die Überprüfung von Bakterienkolonien auf die Präsenz eines gewünschten Inserts mit Hilfe von Vektorprimern, die Amplifikation von 5'cDNA Enden (RACE) sowie das „Differential Display“. Eine Standardreaktion wurde in 0,2 mL Eppendorfgefäßen in einem Volumen von 20 µL durchgeführt (Thermocycler: iCycler Biorad, Hercules (USA); Genius Model FGN02TD Techne, Cambridge) und enthielt die folgenden Komponenten:

Template-cDNA	1	µL
<i>Taq</i> Polymerasepuffer 10x	2	µL
MgCl ₂ 25mM	2	µL
dNTPs 10mM	0,4125	µL
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase (5 U / µl)	0,2	µL
Primer (ohne Label) 10 µM	1,4	µL
Primer (6-FAM) 100 nM	1,4	µL
H ₂ O ad 20 µL	11,5875	µL

Die Amplifikation der Fragmente erfolgte in der Regel in 35 bis 40 Zyklen. Für die Detektion spezifischer PCR-Produkte mit der Kapillarelektrophorese waren 18 Zyklen ausreichend, da sonst eine Sättigung den Vergleich der Expression verschiedener mRNAs verhinderte. Nach anfänglicher Denaturierung von 3 bis 5 min wurde folgendes Standardprogramm durchlaufen:

Denaturierung	95 °C	30 s
Annealing	x °C	60 s
Elongation	72 °C	60 s

Nach dem letzten Zyklus wurden für die finale Elongation weitere 10 min bei 72 °C inkubiert und abschließend auf 4 °C herunter gekühlt. Die Hybridisierungstemperatur der beiden Primer wurde nach folgender Formel berechnet (Chester und Marshak, 1993) und eventuell noch optimiert.

$$T_m = 69,3 + 0,41 \times GC / bp - 650 / bp$$

Daher ist die tatsächlich verwendete Annealingtemperatur nach den jeweiligen Primern angegeben. Zusätzlich auftretende unspezifische Banden konnten durch schrittweise Erhöhung der Hybridisierungstemperatur oder durch Erhöhung der MgCl₂-Konzentration eliminiert werden. Bei GC-reichem Template war der Zusatz einer GC-RICH Solution von 10 % (v/v) im Reaktionsansatz essentiell. Alternativ konnte auch durch den Einsatz der FastStart Taq DNA Polymerase (Roche) die Ausbeute und Spezifität der Reaktion erhöht werden. Sollten die amplifizierten DNA-Fragmente für Klonierungen oder Sequenzierungen verwendet werden, wurden die PCR-Produkte vorher aufgereinigt.

Vektorprimer

		Annealingtemperatur
M13 F	5'-GTA AAA CGA CGG CCA G-3'	64 °C
M13 R	5'-CAG GAA ACA GCT ATG AC-3'	
T3 for	5'-ATT AAC CCT CAC TAA AGG GA-3'	55 °C
T7 rev	5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG-3'	

Spezifische Primer

D02-g-for	5'- FAM -CAA AGT GCG CTC AAT GTC ACA CC-3'	60 °C
D02-g-rev	5'-AGA TCT GCA CGC TCC TGT GG-3'	
B04-for	5'- FAM -AAC AAG ATT CGG GCG GTG GT-3'	59,4 °C
B04-rev	5'-TCA CAA TAC CTG CAC GGC TCA-3'	
RAN-for	5'-CTG CCG AAT CAG CAA ACT GTT GA-3'	55 °C
RAN-rev	5'- FAM -GTT TTC ACA CAC ACG GCA AAG ATC ACG-3'	

2.9.1 Aufreinigung der PCR-Produkte

Die Reinigung der PCR-Produkte erfolgte entweder über die Auftrennung in einem 1 bis 4%igen Agarosegel mit anschließender Extraktion (siehe 2.12.3) oder mit dem QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden). Die Aufreinigung wurde nach dem Standardprotokoll gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.10 Differential Display (DD)-RT-PCR

Die Methode des „Differential Displays“ wurde 1997 von Liang und Pardee beschrieben (Liang und Pardee, 1997). Dabei handelt es sich um eine Technik zur Erkennung des Expressionsmusters, die den Vorteil hat, dass man eine hohe Anzahl von differentiellen cDNA-Fragmenten generieren kann, ohne dabei eine Sequenzinformation der DNA besitzen zu müssen. Weiterhin ist es möglich, differentiell exprimierte Gene in mehr als einer Population zu identifizieren, indem mehrere Zellpopulationen oder Variablen simultan verglichen werden können. Da Amplifikationsreaktionen genutzt werden, ist die Methode bei der Detektion von niedrig konzentrierten mRNA-Spezies sehr sensitiv, so dass sogar feine Veränderungen wahrgenommen werden können und nur kleine Mengen an RNA notwendig sind. Gleichzeitig werden für jedes Gewebe hoch reproduzierbare Expressionsmuster generiert, welche so charakteristisch sind, dass sie als genetischer Fingerabdruck dienen könnten (Zhong und Yeung, 2003).

Zunächst werden durch reverse Transkription und anschließende PCR die 3'-Enden von mRNA-Molekülen in cDNA umgeschrieben und amplifiziert. Die Analyse der PCR-Produkte aus verschiedenen mRNA-Quellen führt anschließend zur Detektion jener cDNAs, die mögliche differentiell exprimierte mRNAs repräsentieren. Jeder Zelltyp exprimiert durchschnittlich ungefähr 10000 - 20000 verschiedene mRNA Moleküle, die abhängig vom physiologischen Zustand der Zelle in stark variierender Kopienzahl (zwischen 3 % und weniger als 0,01 %) vorliegen. Durch die Verwendung von 5' Random-Primern (Roth) mit 10 Nukleotiden Länge und zufälliger Sequenz können unter geeigneten PCR-Bedingungen die meisten mRNAs amplifiziert werden. In dieser Arbeit wurde mit 40 modifizierten Randomprimern (B01-20; D01-20) in Kombination mit dem in der RT-PCR eingesetzten 3' Ankerprimer nach differentiellen Genen gescreent. Die Modifikation der Random-Primer bestand aus einer am 5'-Ende angehängten Sequenz eines M13-forward-Primers. Für die Bindung der Randomprimer wurde zunächst 10 Zyklen bei einer niedrigen Annealingtemperatur (33 °C) hybridisiert und anschließend die Temperatur für 30 Zyklen auf 64,8 °C hochgefahren, um mit dem Einbau der Modifizierungssequenzen eine spezifische Amplifizierung zu erzielen. Dadurch wurde die Anzahl der PCR-Produkte auf die bis dahin amplifizierten Fragmente beschränkt, was eine bessere Auswertbarkeit und Reproduzierbarkeit des Peakmusters gewährleistete.

Die PCR-Reaktion setzte sich aus den in 2.9 beschriebenen Reagenzien zusammen und durchlief folgendes PCR-Programm:

Zyklen 1-10: 95 °C, 30 s; 33 °C, 60 s; 72 °C, 60 s

Zyklen 11-40: 95 °C, 30 s; 64,8 °C, 60 s; 72 °C, 60 s

Die erhaltenen PCR-Produkte wurden anschließend mit der Kapillarelektrophorese (2.12.1) analysiert.

Primer B(01-20)-mod, D(01-20)-mod

B01-mod	5'-TTAGCTCACTCATTAGGGTTTCGCTCC-3'
B02-mod	5'-TTAGCTCACTCATTAGGGTATCCCTGG-3'
B03-mod	5'-TTAGCTCACTCATTAGGCATCCCCCTG-3'
B04-mod	5'-TTAGCTCACTCATTAGGGGACTGGAGT-3'
B05-mod	5'-TTAGCTCACTCATTAGGGTGCGCCCTTC-3'
B06-mod	5'-TTAGCTCACTCATTAGGGTGCTCTGCCC-3'
B07-mod	5'-TTAGCTCACTCATTAGGGGTGACGCAG-3'
B08-mod	5'-TTAGCTCACTCATTAGGGTCCACACGG-3'
B09-mod	5'-TTAGCTCACTCATTAGGGTGGGGGACTC-3'
B10-mod	5'-TTAGCTCACTCATTAGGCTGCTGGGAC-3'
B11-mod	5'-TTAGCTCACTCATTAGGGTAGACCCGT-3'
B12-mod	5'-TTAGCTCACTCATTAGGCCTTGACGCA-3'
B13-mod	5'-TTAGCTCACTCATTAGGGTCCCCCGCT-3'
B14-mod	5'-TTAGCTCACTCATTAGGTCCGCTCTGG-3'
B15-mod	5'-TTAGCTCACTCATTAGGGGAGGGTGTT-3'
B16-mod	5'-TTAGCTCACTCATTAGGGTTTGCCCGGA-3'
B17-mod	5'-TTAGCTCACTCATTAGGAGGGAACGAG-3'
B18-mod	5'-TTAGCTCACTCATTAGGCCACAGCAGT-3'
B19-mod	5'-TTAGCTCACTCATTAGGACCCCCGAAG-3'
B20-mod	5'-TTAGCTCACTCATTAGGGGACCCTTAC-3'
D01-mod	5'-TTAGCTCACTCATTAGGACCGCGAAGG-3'
D02-mod	5'-TTAGCTCACTCATTAGGGGACCCAACC-3'
D03-mod	5'-TTAGCTCACTCATTAGGGTCCGCCGTCA-3'
D04-mod	5'-TTAGCTCACTCATTAGGTCTGGTGAGG-3'
D05-mod	5'-TTAGCTCACTCATTAGGTGAGCGGACA-3'
D06-mod	5'-TTAGCTCACTCATTAGGACCTGAACGG-3'
D07-mod	5'-TTAGCTCACTCATTAGGTTGGCACGGG-3'
D08-mod	5'-TTAGCTCACTCATTAGGGTGTGCCCA-3'
D09-mod	5'-TTAGCTCACTCATTAGGCTCTGGAGAC-3'
D10-mod	5'-TTAGCTCACTCATTAGGGGTCTACACC-3'
D11-mod	5'-TTAGCTCACTCATTAGGAGCGCCATTG-3'
D12-mod	5'-TTAGCTCACTCATTAGGCACCGTATCC-3'
D13-mod	5'-TTAGCTCACTCATTAGGGGGGTGACGA-3'
D14-mod	5'-TTAGCTCACTCATTAGGCTTCCCCAAG-3'
D15-mod	5'-TTAGCTCACTCATTAGGCATCCGTGCT-3'
D16-mod	5'-TTAGCTCACTCATTAGGAGGGCGTAAG-3'
D17-mod	5'-TTAGCTCACTCATTAGGTTTCCCACGG-3'
D18-mod	5'-TTAGCTCACTCATTAGGGAGAGCCAAC-3'
D19-mod	5'-TTAGCTCACTCATTAGGCTGGGGACTT-3'
D20-mod	5'-TTAGCTCACTCATTAGGACCCGGTCAC-3'

2.11 Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE)

Mit der RACE-PCR wurden die noch unbekanntes 5'-Enden der differentiell exprimierten cDNA-Fragmente identifiziert. Hierfür wurden zwei verschiedene Methoden herangezogen, bei denen an die zu amplifizierende unbekanntes Sequenz eine kurze bekannte Sequenz für eine Primeranbindung angehängt wurde. Zum einen wurde mit dem GeneRacer™ Kit gearbeitet, welches vom Prinzip her direkt die vollständige cDNA amplifizierte, da die Cap-Struktur durch die Primerbindungsstelle ausgetauscht wurde. Zum anderen wurde das 5'RACE System (Version 2.0) verwendet, mit dem die partielle cDNA schrittweise in 5' Richtung verlängert wurde (beide Invitrogen).

2.11.1 GeneRacer™ Kit

Das GeneRacer™ Kit gliedert sich in folgende Schritte. Zunächst wurde die mRNA mit Calf Intestinal Phosphatase (CIP) behandelt, um von allen unvollständigen mRNAs die 5'Phosphatase zu entfernen. Anschließend wurde die dephosphorylierte mRNA mit Tobacco Acid Pyrophosphatase (TAP) versetzt, welche die CAP-Struktur von der intakten vollständigen mRNA entfernte. Daraufhin wurde die GeneRacer™ RNA Oligo-Sequenz mit der T4 RNA Ligase an das 5'Ende der intakten mRNA ligiert. Mit der AMV-Reverse Transkriptase und dem GeneRacer™ Oligo dT Primer wurde nun die ligierte mRNA in cDNA transkribiert. Durch die angehängte GeneRacer™ RNA Oligo-Sequenz war es nun möglich zusammen mit einem GeneRacer™ 5'Primer und einem reversen genspezifischen Primer (GSP) die 5'Enden der differentiellen Gene zu amplifizieren. Bei auftretenden Nebenbanden oder bei unzureichender Menge an PCR-Produkt wurde eine nested PCR mit einem dafür vorgesehenen GeneRacer™ 5'Nested Primer und einem zweiten genspezifischen Primer angeschlossen.

Phenol/Chloroform Fällung von RNA

Um störende Effekte durch nicht Hitze inaktivierbare Enzyme in nachfolgenden Reaktionen zu vermeiden, wurde nach der Behandlung mit CIP, TAP und T4 RNA Ligase eine RNA Fällung durchgeführt. Zunächst wurde die RNA-Lösung mit 90 µL DEPC Wasser und 100 µL Phenol:Chloroform versetzt und 30 s gevortext. Nach 5 min Zentrifugation bei 13000 rpm (Biofuge 13, Heraeus-Sepatech) und Raumtemperatur wurde eine Phasentrennung erreicht, bei der die obere Phase in ein neues Eppendorfgefäß überführt (~100 µL). Daraufhin wurden 2 µL Muschel Glycogen (10 mg/mL) und 10 µL Natriumacetat (3 M, pH 5,2) zugegeben und

gut vermischt. Nach Zugabe von 220 μl 95%igem Ethanol wurde die RNA für mind. 10 min bei -80°C gefällt. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation für 30 min (5000 g, 4°C). Das erhaltene Pellet wurde daraufhin mit 500 μl 70%igem Ethanol durch Invertieren und kurzem Vortexen gewaschen und bei 4°C abzentrifugiert. Durch Abpipettieren und nochmaligem Zentrifugieren wurde das Ethanol wieder entfernt, das Pellet 1-2 min bei RT getrocknet und in 7 μl (nach der Ligation der RNA-Oligo Sequenz in 10 μl) DEPC-Wasser aufgenommen.

Dephosphorylierung

Die Dephosphorylierungs-Reaktion wurde in 1,5 ml Eppendorfgefäße mit einem Gesamtvolumen von 10 μl durchgeführt. Das Reaktionsgemisch wurde für 1 h bei 50°C inkubiert.

RNA	7 μl
10x CIP-Puffer	1 μl
RNaseOUT TM (40 U/ μl)	1 μl
CIP (10 U/ μl)	1 μl

Entfernen der Cap-Struktur

Zum Entfernen der Cap-Struktur wurden die beschriebenen Reagenzien mit einem Gesamtvolumen von 10 μl in einem 1,5 ml Eppendorfgefäß zusammen pipettiert und bei 37°C für 1 h inkubiert.

Dephosphorylierte RNA	7 μl
10x TAP Puffer	1 μl
RNaseOUT TM (40 U/ μl)	1 μl
TAP (0,5 U/ μl)	1 μl

Ligation der RNA Oligo-Sequenz

Für die Ligation der Oligo-Sequenz wurden 7 μl der behandelten mRNA mit 0,25 μg der GeneRacerTM RNA Oligo Sequenz vermischt, die in einem Gefäß aliquotiert vorlagen. Das Gemisch wurde 5 min bei 65°C inkubiert und anschließend auf Eis gekühlt. Nach Zugabe der folgenden Reagenzien (ges. 11 μl) schloss sich eine Inkubation für 1 h bei 37°C an.

10x Ligase Puffer	1 μl
ATP (10mM)	1 μl
RNaseOUT TM (40 U/ μl)	1 μl
T4 RNA Ligase (5 U/ μl)	1 μl

Reverse Transkription

Bei der reversen Transkription der mRNA wurden zunächst 1 μl des GeneRacer™ Oligo dT Primers sowie 1 μl des dNTP Mixes (25 mM each) zu 10 μl der ligierten mRNA gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde daraufhin für 5 min bei 65 °C inkubiert und auf Eis abgekühlt. Anschließend wurden die folgenden Reagenzien der Reaktion zugefügt. Die reverse Transkription erfolgte bei 42 °C für 1 h. Die reverse Transkriptase wurde anschließend für 15 min bei 85 °C inaktiviert.

10x RT Puffer	2 μl
AMV-RT (5 U/ μl)	1 μl
H ₂ O (steril)	4 μl
RNaseOUT™ (40 U/ μl)	1 μl
Gesamt	20 μl

Amplifikation der 5'-cDNA-Enden

RT-Template	0,1 – 2 μl
GeneRacer™ 5'Primer (10 μM)	3 μl
Reverser GSP (10 μM)	1 μl
10x Puffer	5 μl
MgCl ₂ (25 mM)	4 μl
dNTPs (10mM each)	1 μl
FastStart <i>Taq</i> DNA Polymerase (5 U/ μl)	0,5 μl
H ₂ O (steril)	ad 50 μl

'touch down'- PCR:

5 Zyklen 95 °C, 30 s; 72 °C, 1 – 3 min

5 Zyklen 95 °C, 30 s; 70 °C, 1 – 3 min

5 Zyklen 95 °C, 30 s; 68 °C, 1 – 3 min

25 Zyklen 95 °C, 30 s; 55 - 65 °C, 30 s, 1 – 3 min

Die Elongationszeit wurde der zu erwartenden Sequenzlänge angepasst, wobei 1 min pro 1 kb berechnet wurde.

Nested PCR

Für die nested PCR wurde jeweils 1 μl des RACE-PCR-Produktes als Template sowie reverse und forward Primer zu gleichen Teilen (1 μl) eingesetzt. Es wurden 35 Zyklen nach einem Standardprogramm durchlaufen (siehe 2.9). Die verwendete Annealingtemperatur ist nach den entsprechenden Primern angegeben. Die Elongationszeit richtete sich nach der vorangehenden PCR.

Oligonukleotide

GeneRacer™ RNA Oligo Sequenz

5'-CGA CUG GAG CAC GAG GAC ACU GAC AUG GAC UGA AGG AGU AGA AA-3'

GeneRacer™ Oligo dT Primer Sequenz

5'-GCT GTC AAC GAT ACG CTA CGT AAC GGC ATG ACA GTG (T)₁₈-3'

Primer

GeneRacer™ 5'Primer 5'-CGA CTG GAG CAC GAG GAC ACT GA-3'

GeneRacer™ 5'Nested 5'-GGA CAC TGA CAT GGA CTG AAG GAG TA-3'

reverse GSP:

RACE-RAN	5'-GTT TTC CAC ACA CAC GGC AAA GAT CAC G-3'	60 °C
RACE-D02-g	5'-CTC CTG TGG CTT TTT CGG TCC TG-3'	60 °C
RACE-D02-g-nest	5'-CAG TGG TTC CCA GAC TGC CTT CCA-3'	55 °C
RACE-B04	5'-CCT GCA CAA CAG TGC CAT TAC AGC AG-3'	55 °C
RACE-B04-nest	5'-CTG AGC TCC TTT TTC AGA CCC TGA AC-3'	55 °C
RACE-B18	5'-CAT CTA GAA CCG TCC GCA GTC CAG-3'	55 °C
RACE-B18-nest	5'-CTC CAA CAT GCT TTG GGT TTT TCA C-3'	55 °C

2.11.2 5'RACE System (Version 2.0)

Bei dieser Methode wurde die mRNA mit der SuperScript™ II RT und genspezifischen Primern (GSP1) direkt in spezifische cDNA-Sequenzen umgeschrieben. Anschließend wurde mit einem RNase Mix (Invitrogen), welches RNase H und RNase T1 enthielt, sowohl einzelsträngige RNA als auch cDNA:RNA Hybriden entfernt und die cDNA mit dem MinElute PCR Purifikation Kit (QIAGEN) aufgereinigt und aufkonzentriert. An das 3'Ende der gereinigten cDNA wurde daraufhin mit der Terminal Deoxynucleotidyl Transferase (TdT) eine repetitive homo-polymere DNA (Poly(C) Schwanz) anpolymerisiert (Tailing). Nach Hitzeinaktivierung der TdT folgte die Amplifikation der dC-gebundenen cDNA mit dem komplementären homo-polymere 5' RACE Anker-Primer (Abridged Anchor Primer - AAP) und einem reversen genspezifischen Primer (GSP2). In den meisten Fällen war eine nested PCR erforderlich, bei der ein dritter genspezifischer Primer (GSP3) sowie der Abridged Universal Amplification Primer (AUAP) zum Einsatz kam.

Reverse Transkription

Zunächst wurden 13,75 µl der mRNA mit 0,25 µl des GSP1 Primers für 10 min bei 70°C denaturiert. Anschließend wurden folgende Reagenzien zugegeben und eine Minute lang auf 42 °C vorgeheizt.

10x Puffer	2,5 µl
MgCl ₂ (25 mM)	2,5 µl
dNTPs (10 mM)	1 µl
DTT (0,1 M)	2,5 µl

Nach Zugabe von 1 µl SuperScript™ II RT (200 U /µl) wurde das Reaktionsgemisch in einem Gesamtvolumen von 23,5 µl für 50 min bei 42°C inkubiert und die Reaktion bei 70°C für 15 min beendet. Nach anschließender Zentrifugation wurde eine RNase-Behandlung mit 1 µl RNAase-Mix (RNAase H und T) für 30 min bei 37°C durchgeführt.

TdT Tailing

Für die Anpolymerisierung des Poly C-Schwanzes wurde das folgende Reaktionsgemisch für 3 min bei 94°C denaturiert, bevor 1 µl der TDT zugegeben wurde. Die Inkubation erfolgte dann in einem Gesamtvolumen von 20 µl für 10 min bei 37°C und anschließenden 10 min bei 65°C.

DEPC Wasser	6,5 µl
5x Tailing Puffer	5 µl
dCTP (2 mM)	2,5 µl
cDNA	10 µl

Amplifikation der cDNA

cDNA	5 µl
10x Puffer	5 µl
MgCl ₂ (25 mM)	3 µl
dNTPs (10 mM)	1 µl
GSP2 (10 µM)	2 µl
AAP (10 µM)	2 µl
FastStart Taq DNA Polymerase (5 U/µl)	0,5 µl
H ₂ O (steril)	ad 50 µl

Es wurden 35 Zyklen nach einem Standardprogramm durchlaufen (2.9). Die Annealingtemperatur ist nach den entsprechenden Primern angegeben.

Nested PCR

PCR-Produkt (1:100 Verdünnung)	5	µl
10x Puffer	5	µl
MgCl ₂ (25 mM)	3	µl
dNTPs (10 mM)	1	µl
GSP3 (10 µM)	1	µl
AUAP (10 µM)	1	µl
FastStart Taq DNA Polymerase (5 U/µl)	0,5	µl
H ₂ O (steril)	ad 50	µl

Es wurden 35 Zyklen nach einem Standardprogramm durchlaufen (2.9). Die Annealingtemperatur ist nach den entsprechenden Primern angegeben.

RACE Primer

AAP	5'-GGC CAC GCG TCG ACT AGT ACG GGI IGG GII GGG IIG-3'	
AUAP	5'-GGC CAC GCG TCG ACT AGT AC-3'	
D19-GSP-1	5'-AAA GGA AAT TAC TAG AGT-3'	
D19-GSP-2	5'-GAC TGT TGC GCA TTG TTC TTC TTC C-3'	61 °C
D19-GSP-3	5'-TCC TGC ATT CCC TTT GGT CAT CAT C-3'	61 °C
B18-GSP-1	5'-AAC TTT CCT TTA GAT AAA-3'	
B18-GSP-2	5'-AGG AGT CAC ATC ACA GCA TC-3'	50 °C
B18-GSP-3	5'-CTT GCA GCA TCA AAT CCA GC-3'	50 °C
HIS-1 (B18)	5'-TTT GGC GTA CAT TTC CT-3'	
HIS-2 (B18)	5'-GAG TCA TGT CTT CAT GTG TCC CTG-3'	55 °C
HIS-3 (B18)	5'-GCC AGC TGT TAC GTC AGT TAC AAC-3'	55 °C
B02-a-GSP-1	5'-TTG TAT AGA ATT TAC ATC-3'	
B02-a-GSP-2	5'-GAA GGG TTC TGG TTC AAG TTT ACT CC-3'	55 °C
B02-a-GSP-3	5'-CGA ACA GAC AAA GGC AAC ACA AAC C-3'	55 °C

2.12 Auftrennung von DNA-Fragmenten

2.12.1 Kapillarelektrophorese

Die Detektion differentiell exprimierter mRNAs in verschiedenen RNA-Quellen sowie die Verifizierung der differentiellen Expression mit spezifischen Primern wurde mittels Kapillarelektrophorese ABI PRISM[®] 310 Genetic Analyser (Applied Biosystems, Weiterstadt) durchgeführt. Die Elektrophorese erfolgte in einer Kapillare (47 cm / 50 µm), die mit flüssigem Polymer (POP-4: Performance Optimized Polymer, Applied Biosystems) befüllt war. Die beiden Enden der Kapillare befanden sich dazu in 1x Elektrophoresepuffer (Applied Biosystems, Weiterstadt). Durch Anlegung einer Spannung von 15 kV wurde die negativ geladene DNA mit einer Injektionszeit von 1 - 5 s in die Kapillare aufgenommen und auf ihrem Weg zur positiv geladenen Anode der Größe nach aufgetrennt. Die Auftrennung der

Proben verlief dabei für 35 bis 45 min bei 60 °C und 15 kV. Dazu mussten die doppelsträngigen PCR-Fragmente vorher für 5 min bei 95 °C denaturiert, und anschließend sofort auf Eis gekühlt werden, um eine erneute Hybridisierung zu verhindern. Die Fluoreszenz-markierten Proben (1 µL des PCR-Produkts) wurden für die Elektrophorese in 12 µL deionisiertem Formamid aufgenommen und mit 0,5 µL Fluoreszenz-markiertem Längenstandard (ROX 2500, Applied Biosystems) versehen. Der Längenstandard bestand aus einer bestimmten Anzahl von DNA-Fragmenten mit einer definierten Größe und lief parallel mit jeder Probe mit. Die Detektion der DNA-Fragmente erfolgte durch einen Laser, den die Fluoreszenz-markierten DNA-Fragmente am Ende der Kapillare passieren und auf dessen Höhe sich ein Fenster in der Kapillare befindet. Sobald das von dem Laser emittierte Licht mit einer Wellenlänge von 488 nm und 514,5 nm auf ein markiertes DNA-Fragment traf, sendete dieses das Fluoreszenzlicht aus, welches nach Fokussierung auf einem Hohlspiegel prismatisch aufgespalten und auf den Chip einer CCD (Chargen Coupled Device)-Kamera verteilt wurde. Dabei konnte die Kamera die verschiedenen Farbstoffe des Längenstandards und der cDNA-Fragmente gleichzeitig detektieren. Anhand des mitlaufenden Längenstandards (Fluoreszenz-Farbstoff ROX) konnte so die Basenpaargröße der Fluoreszenz-markierten PCR-Produkte (6-FAM) mit Hilfe der GeneScan[®] Analysis Software (Applied Biosystems) in Form von Peaks ausgewertet werden. Zusätzlich konnten die zu vergleichenden Proben in einem Bild übereinander gelegt und die Menge der einzelnen cDNA-Fragmente anhand der Intensität der Fluoreszenz quantifiziert werden.

Die Isolation der identifizierten differentiellen cDNA-Fragmente erfolgte durch Auftrennung des PCR-Produktes in einem Agarosegel und anschließender Extraktion. Die erhaltenen Extrakte wurden allerdings daraufhin noch einmal in der Kapillarelektrophorese auf die exakte Fragmentgröße überprüft.

2.12.2 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese (Gel Electrophoresis Apparatus GNA-1000 Pharmacia Biotech, Uppsala) wurde zur Größen- und Mengenabschätzung von DNA-Fragmenten und deren Extraktion eingesetzt. Je nach Größe der aufzutrennenden Fragmente wurden Gele mit 1 bis 4 % Agarose in 1x TAE-Puffer (40 mM Tris, 40 mM Eisessig, 1 mM EDTA, pH 8,0) verwendet. Die Proben wurden vor dem Auftrag mit 1/5 VT Ladepuffer (0,06 % w/v Bromphenolblau, 0,06 % w/v Xylene Cyanol FF, 15 % w/v Ficoll 400, 30 mM EDTA) versetzt und bei 70 bis 90 V in 1x TAE-Puffer aufgetrennt. Als Standard zur Größen- und

Mengenabschätzung wurde das SUPERLADDER-MID1 dsDNA Marker Kit von Roth eingesetzt. Nach dem Anfärben des Gels im Ethidiumbromidbad (1,5 µg/mL) wurde die DNA mit einem UV-Transilluminationssystem (UV-Kontaktlampe Chroma 43; Kurt Migge GmbH Laborbedarf, Heidelberg) bei einer Wellenlänge von 254 nm sichtbar gemacht und konnte mit einer an einen Thermodrucker gekoppelten CCD-Kamera (Vilber Lourmat) aufgenommen und auf Thermopapier ausgedruckt werden.

2.12.3 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Sollte aus einem PCR-Produkt mit mehreren amplifizierten Fragmenten einzelne DNA-Fragmente für eine Klonierung und Sequenzierung isoliert werden, wurden die Fragmente in einem Agarosegel aufgetrennt und eluiert. Für die Elution der beim Differential Display identifizierten differentiellen Fragmente wurde ein 3 bis 4%iges Agarosegel verwendet, um die sehr nah beieinander liegenden Fragmente voneinander trennen zu können. In allen anderen Fällen war ein 0,8 - 1%iges Gel ausreichend. Zur präparativen Isolierung der cDNA-Fragmente wurde das QIAquick Gel Extraktion Kit (QIAGEN GmbH, Hilden) verwendet. Unter UV-Licht wurde das gewünschte DNA-Fragment herausgeschnitten und gemäß den Herstellerangaben extrahiert. War eine höhere Konzentration der DNA nach der Extraktion notwendig wurde das Volumen per Unterdruck (SpeedVac, SPD 121P, Thermo Savant) eingeengt.

2.13 Klonierung eines PCR-Produkts

Klonierungen wurden mit dem pGEM-T[®]-Easy System I (Promega) und dem TOPO TA Cloning[®] Kit for Sequencing (Invitrogen) durchgeführt.

2.13.1 Herstellung kompetenter *E. coli*-Stämme nach der CaCl₂-Methode

Aus einer Glycerin-Stammkultur des gewünschten Bakterienstammes (*E. coli* DH5α und JM109) wurde in 2 mL LB-Medium über Nacht bei 37 °C eine Vorkultur angelegt. Daraus wurden 100 mL LB-Medium angeimpft und bei 37 °C auf dem Schüttler (Schüttelinkubator 3031, GFL mbH, Burgwedel) bei 150 rpm bis zu einer OD₆₀₀ (SmartSpec[™] 3000 Spectrophotometer, Bio-Rad, Hercules, USA) von 0,3 bis 0,5 bebrütet. Die Bakterien wurden dann in zwei 50 mL Falcons überführt und bei 4 °C abzentrifugiert (4000 rpm, 15 min) (Centrifuge 5810R, Eppendorf, Hamburg). Nach Verwerfen des Überstandes wurden das

Pellet in 5 mL kaltem 0,1 M CaCl₂ resuspendiert und kurz auf Eis inkubiert. Die Bakterien wurden erneut pelletiert (4000 rpm, 15 min, 4 °C). Der Überstand wurde wieder verworfen und die Bakterien vorsichtig in 1 mL kaltem 0,1 M CaCl₂ + Glycerin aufgenommen und mit einer abgeschnittenen sterilen Pipettenspitze in gekühlte Eppendorfgefäße in Aliquots à 200 µL verteilt. Die kompetenten Bakterien wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert, bis sie zur Transformation eingesetzt wurden. Alle Schritte wurden steril und unter ständiger Kühlung durchgeführt.

2.13.2 Ligation

Die Durchführung erfolgte nach Angaben des jeweiligen Herstellers mit den mitgelieferten Puffern und Komponenten. Eingesetzt wurden je Reaktion 10 bis 50 ng Vektor-DNA mit einem 3 bis 10 molaren Überschuss an Insert-DNA. Mit dem pGEM-T[®] Easy System I wurde zur Ligation der DNA-Fragmente 3 U T4 DNA Ligase in 10 µL Reaktionsvolumen verwendet. Die Ligation erfolgte für 1 bis 2 h bei Raumtemperatur oder bei größeren Fragmenten über 1,5 kb bei 4 °C über Nacht.

Mit dem TOPO TA Cloning[®] Kit for Sequencing wurde eine Ligation durch den Einsatz einer an den Vektor kovalent gebundenen Topoisomerase umgangen. Nach einer Inkubationszeit von 5 min bei RT konnte mit der Transformation fortgefahren werden (2.13.3).

2.13.3 Hitzeschock-Transformation

Zu dem 10 µl Ligationsansatz (pGEM-T[®]-Easy System I) wurden 50 bis 100 µL der Suspension kompetenter Bakterien pipettiert und vorsichtig gemischt. Von der TOPO[®] Cloning Reaktion wurden 2 µL auf 50 µL TOP10 One Shot[®] chemisch kompetente Bakterien (*E. coli*) gegeben. Die Ansätze wurden 20 min lang auf Eis inkubiert und für 30 bis 45 s einem Hitzeschock bei 42 °C ausgesetzt. Nach kurzer Abkühlung auf Eis wurde je Ansatz 250 bis 600 µL SOC-Medium zugegeben und 60 bis 90 min bei 37 °C inkubiert. Je 50, 100 und 200 µl der Transformationsansätze wurden auf LB_{amp}-Platten plattiert, um eine Selektion der Bakterien mit Plasmid mittels Ampicillin durchzuführen. Nach Inkubation über Nacht bei 37 °C wurden die Kolonien rekombinanter Bakterien für eine In-cell-PCR gepickt und durch Sequenzierung weiter überprüft.

2.13.4 Medien

LB-Medium

10 % Trypton
5 % Hefeextrakt
10 % NaCl
15 % Agar Agar (für Festmedium)

LB_{amp}-Medium

Ampicillin 100 mg/l
in LB-Medium

S.O.C.-Medium

2 % Trypton
0,5 % Hefeextrakt
10 mM NaCl
2,5 mM KCl
10 mM MgCl₂
10 mM MgSO₄
20 mM Glucose

2.14 In-Cell-PCR

Für eine In-Cell-PCR wurden die Kolonien mit einer sterilen Pipettenspitze gepickt und in 100 µl Wasser verdünnt, wovon wiederum 1 µl als Template in einer Standard-PCR-Reaktion eingesetzt wurde (2.9). Als Primer wurden die Vektorprimer M13-F und M13-R oder T3 und T7 verwendet, wodurch anschließend auf einem Agarosegel anhand der Fragmentgröße überprüft werden konnte, ob das gewünschte Insert enthalten war, und ob es einfach oder mehrfach in den Vektor eingebaut worden war.

2.15 Sequenzierung

Die Sequenzierung der PCR-Produkte wurde von der Firma MWG-Biotech (Sequencing Service; Ebersberg) durchgeführt. Dafür wurden die Vektorprimer, die zur Klon-Identifizierung während der In-cell-PCR eingesetzt worden waren, mitgeschickt.

2.16 Genidentifikation

Die erhaltenen Nukleotidsequenzen und translatierten Aminosäuresequenzen wurden mit Hilfe des Programms Blastn für eine Nukleotidübereinstimmung sowie Blastx (NCBI) für eine Proteinübereinstimmung in einer GenBank auf Homologien zu bereits publizierten Sequenzen untersucht. Dabei wurden Übereinstimmungen, die über 80 % für eine 100 Basenpaar-Region lagen, als signifikant betrachtet.

3 Ergebnisse

3.1 Screening nach differentiellen Peaks in gravistimulierten Hypokotylen und Auxin-stimulierten Protoplasten

Für die Analyse der gravitrop regulierten Genexpression wurde mRNA aus gravistimulierten Hypokotylen, die für 30 und 60 min um 45° relativ zum Schwerkraftvektor gekippt wurden, sowie aus nicht stimulierten Hypokotylen als Kontrolle gewonnen. Hierbei wurden jeweils 1,2 g tiefgefrorenes Pflanzenmaterial verwendet, welches aus einem Gemisch von Pflanzen aus einer Pflanzschale bestand. In einem zweiten Versuchsansatz wurde die Auxin-abhängige Genexpression untersucht. Hierzu wurde die mRNA nach der Auxinbehandlung (0, 30 und 60 min) aus jeweils 1,25 Mio. Hypokotyl-Protoplasten isoliert. Durch den standardisierten Einsatz des Säulenmaterials (Oligotex-Partikel) von je 20 µl für Protoplasten und je 40 µl für Hypokotyle wurde die mRNA-Menge bei der mRNA-Isolation in allen Proben nivelliert. Insgesamt wurden 6 Wiederholungen von den Auxin-stimulierten Proben und 3 Wiederholungen von den gravistimulierten Proben verwendet.

Im Gegensatz zu den in der Dissertationsarbeit von Ralf Theisen (2005) bearbeiteten Sonnenblumenhypokotylen, die mit der gleichen Methode in einer Zeitreihe von 0, 15, 30, 45 und 60 min gravistimuliert wurden, wurde in dieser Arbeit in beiden Versuchsansätzen zwischen einem apikalen und einem basalen Hypokotylabschnitt unterschieden, um eine detailliertere Bestimmung der eigentlich gravisensitiven bzw. auxinsensitiven Zelltypen zu erzielen. Außerdem sollte so eine gesteigerte Sensitivität der Genexpressions-Analysen erreicht werden. Diese Segmentierung wurde zum einen aufgrund der gravitropen Krümmungsreaktion vorgenommen, welche nicht über die gesamte Pflanze gleichmäßig verläuft, sondern wie Vorversuche zeigten im apikalen Hypokotylabschnitt am stärksten ist. Zum anderen war aus den Arbeiten von Georg Müller (2000) bekannt, dass nicht nur die gravitrope Krümmung, sondern auch die Auxin-abhängige PM/H⁺-ATPase-Aktivität als Maß für die Auxinsensitivität der Zellen im apikalen Hypokotylabschnitt wesentlich stärker ausgeprägt ist als in den basalen Zellen.

Die Identifizierung von differentiell exprimierten Genen in den Auxin- und gravistimulierten Hypokotylen bzw. Protoplasten erfolgte mittels Differential Display (DD) RT-PCR. Hierbei handelt es sich um ein Screening-Verfahren, das den Vergleich der mRNA Expression während unterschiedlicher Zellprozesse erlaubt. Durch PCR-Amplifikation wurde eine große

Anzahl von unterschiedlich großen cDNA-Fragmenten generiert, die nach Auftrennung in der Kapillarelektrophorese ein spezifisches cDNA-Fragment- bzw. Peakmuster zeigten. Für die Genexpressions-Analysen wurden insgesamt 40 verschiedene 10mer Zufalls- (Random)-Primer (B01-B20; D01-D20) mit einem Ankerprimer (Oligo-dT₁₇) kombiniert. Die 5'- und 3'-Primer waren jeweils mit einer spezifischen 15mer M13-Sequenz modifiziert, um eine spätere Reamplifikation mit einer höheren und damit spezifischeren Annealingtemperatur zu ermöglichen. Für die anschließende Analyse mit der Kapillarelektrophorese (CE) war der Oligo-dT-Primer zusätzlich mit dem Fluoreszenz-Farbstoff 6-FAM markiert. Nach der Auftrennung der cDNA-Fragmente konnten alle zu vergleichenden Proben mit Hilfe des GeneScan[®] Analysis Programms farblich getrennt übereinander gelegt werden, was die Detektion von differentiellen Peaks ermöglichte.

3.1.1 Differential Display (DD)

Die Auftrennung der DD-RT-PCR-Produkte zeigte zunächst stark abgehobene Basislinien, die wahrscheinlich auf den riesigen Primer Peak zurückzuführen waren, der durch überschüssige, nicht eingebaute Fluoreszenz-markierte Primer entstand. Ebenso wurden scheinbar verhältnismäßig viele kleine Fragmente bis zu 300 bp amplifiziert. Durch eine Verringerung der ‚gelabelten‘ Primermenge um den Faktor 100 konnte der Primer Peak deutlich verkleinert werden. Gleichzeitig sank auch die Basislinie ab. Daneben wurde die Zyklenzahl mit der niedrigen Annealingtemperatur für die Anbindung der Randomprimer von 3 auf 10 Zyklen erhöht. Dadurch konnte ein höheres Peakniveau erreicht werden, das die Auswertung von Peaks erlaubte, die vorher im Rauschen lagen. Zum anderen wurden auch deutlich mehr größere Fragmente bis zu 800 bp amplifiziert. Die gleichmäßigere Verteilung der Fragmentgrößen hatte ebenfalls eine positive Auswirkung auf die Absenkung der Basislinie.

Nach den beschriebenen Optimierungsarbeiten lieferte das Differential Display der Auxin- und gravistimulierten Proben ein charakteristisches und reproduzierbares Peakmuster. Wie in Abb. 3.1 zu sehen, wurden sowohl in den apikalen als auch in den basalen Proben zu allen Zeitpunkten der Stimulation cDNA-Fragmente mit der gleichen Länge amplifiziert (angegeben in Basenpaare bp). Insgesamt konnten bis zu 100 Peaks pro Primerkombination ausgewertet werden. Dabei spiegelte die Peakhöhe die Intensität der Fluoreszenz der markierten PCR-Produkte gleicher Größe wider und war somit ein Maß für das relative Expressionslevel der entsprechenden mRNA. Die Fragment-Auftrennung zeigte, dass die Peakhöhe generell in den jeweiligen Hypokotylsegmenten unabhängig von der Stimulation

miteinander übereinstimmte, was auf eine gleichmäßige Isolation und Verarbeitung der mRNA hindeutete. Daher war eine differentielle Expression durch eine abweichende Peakhöhe zwischen den verschiedenen Zeitpunkten der Stimulationsreihe eindeutig zu identifizieren. Als ‚differentiell‘ exprimiert wurden alle Fragmente eingestuft, die sich aufgrund der spezifischen Stimulation in der Peakhöhe von der Basis ausgehend mindestens um den Faktor 2 innerhalb ‚apikal‘ oder ‚basal‘ voneinander unterschieden.

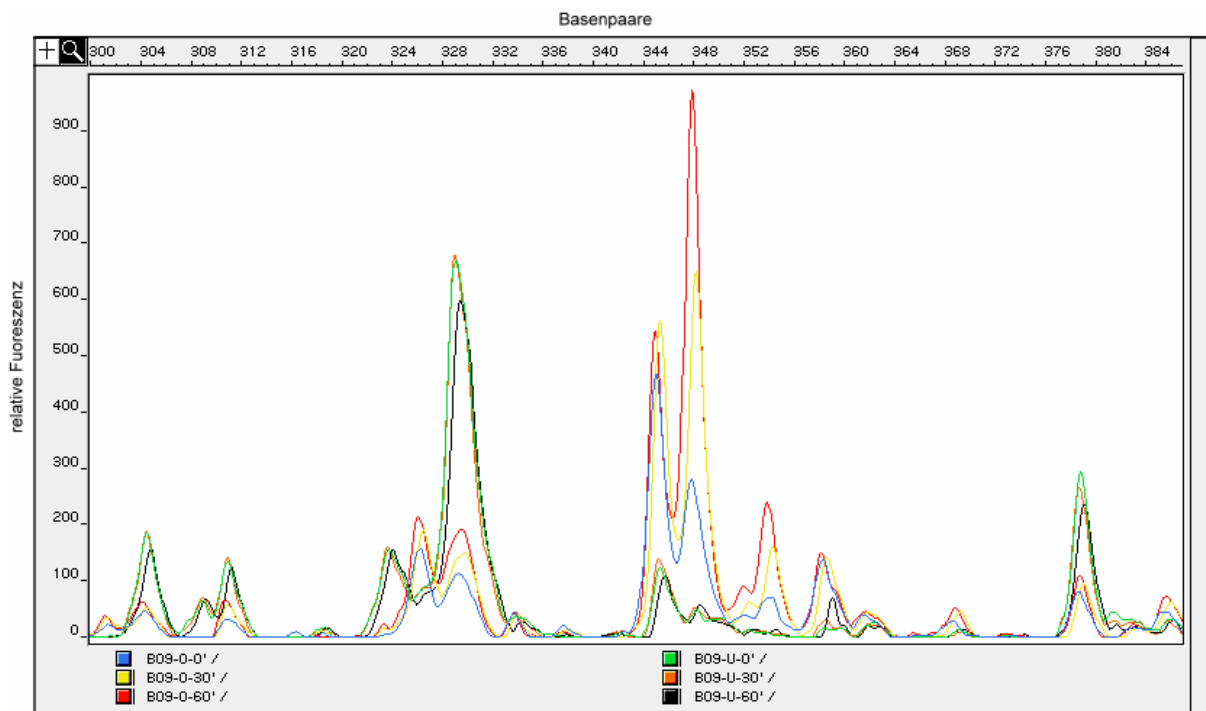


Abb. 3.1 Ausschnitt aus einem Differential Display nach Auftrennung auf der Kapillarelektrophorese (Primer B09, 0 = apikal, U = basal, Auxinstimulation 0, 30, 60 min).

In Abb. 3.1 kann man nach der ‚random‘-PCR mit dem Primer B09 in Auxin-stimulierter cDNA zwei hochregulierte Peaks mit einer Größe von 348 bp und 354 bp erkennen. Beide Fragmente, B09-348 bp und B09-354 bp, zeigen im apikalen Hypokotylabschnitt im Vergleich zur Kontrolle nach 30 und 60 min eine deutliche Hochregulation der Expressionsrate (blau = Kontrolle, gelb = 30 min, rot = 60 min). Unabhängig von der Stimulation konnten zwischen den apikalen (0, Abb. 3.1) und basalen (U, Abb. 3.1) Hypokotylabschnitten ebenfalls deutliche Unterschiede in der Expressionsstärke der einzelnen Peaks festgestellt werden, so dass jedes einzelne Fragment entweder im apikalen oder im basalen Bereich stärker exprimiert war. Dieses unterschiedliche Expressionsverhalten war somit eine Bestätigung für die Unterteilung und getrennte Bearbeitung der

Hypokotylsegmente, da ansonsten differentielle Peakhöhen möglicherweise ausgeglichen worden und dadurch unentdeckt geblieben wären.

3.1.2 Auswertung differentieller Peaks

Die Auswertung der aufgetrennten PCR-Produkte ergab insgesamt 19 differentiell exprimierte Fragmente (Tab. 3.1).

Tabelle 3.1 Differentielle Peaks

	Peak	Hypokotylabschnitt	Expression
Gravistimulation	B01-520 bp	apikal	+
	B12-363 bp	gesamt	+
	B16-378 bp	gesamt	+
	D02-492 bp	apikal	+
	D12-330 bp	apikal	+
	D19-405 bp	basal / apikal	+
Auxinstimulation	B02-270 bp	basal / apikal	-
	B02-339 bp	basal / apikal	-
	B03-287 bp	basal / apikal	+
	B04-505 bp	apikal	-
	B04-538 bp	basal / apikal	+
	B09-348 bp	apikal	+
	B09-354 bp	apikal	+
	B10-366 bp	apikal	+
	B12-363 bp	apikal	+
	B18-241 bp	apikal	-
	B18-265 bp	apikal	+
	D01-445 bp	apikal	+
	D09-435 bp	apikal	+

In der linken Spalte sind die Primer und die Fragmentgröße der Peaks in Basenpaaren angegeben.
+ = hochreguliert; - = herunterreguliert

Darunter waren aus den gravistimulierten Hypokotylen vier Peaks (B01-520 bp, D02-492 bp, D12-330 bp, D19-405 bp), die eine Hochregulation im apikalen Bereich im Vergleich zur Kontrolle zeigten (Tab. 3.1). Dabei war Peak D19-405 bp sowohl apikal als auch basal

hochreguliert. Die schon in der Dissertation von Ralf Theisen (2005) für das Screening von gravistimulierter cDNA aus Gesamthypokotylen eingesetzten Primer (B02, 08 - 12, 15 - 18), wurden für die in apikal und basal unterteilten gravistimulierten Proben in dieser Arbeit nicht mehr verwendet. Allerdings wurden in dieser Arbeit zwei differentielle Peaks (B12-363 bp und B16-378 bp) analysiert, die in den gravistimulierten Gesamthypokotylen identifiziert werden konnten (45°, 0, 15, 30, 45, 60 min). Diese beiden Fragmente waren ebenfalls gravitrop hochreguliert (Tab. 3.1, Abb. 3.2).

Im Vergleich der PCR-Produkte aus den Auxin-inkubierten Proben nach 0, 30 und 60 min zeigten insgesamt 13 verschiedene cDNA-Fragmente eine im Hinblick auf Auxin differentielle Expression. Wie in Tab. 3.1 zu sehen, waren davon neun Peaks hochreguliert (B03-287 bp, B04-538 bp, B09-348 bp, B09-354 bp, B10-366 bp, B12-363 bp, B18-265 bp, D01-445 bp, D09-435 bp) und vier Peaks herunterreguliert (B02-270 bp, B02-339 bp, B04-505 bp, B18-241 bp). Dabei beschränkte sich die differentielle Expression auf den apikalen Bereich, nur die Fragmente B02-270 und 339 bp, B03-287 bp und B04-538 bp zeigten neben dem apikalen auch im basalen Gewebe eine differentielle Expression.

Ein Vergleich der differentiellen Fragmente in Auxin-stimulierter und gravistimulierter cDNA zeigte, dass nur Peak B12-363 bp bei beiden Stimulationen differentiell reguliert war. Wie in Abb. 3.2 a) und b) zu sehen, war das 363 bp große Fragment nach 0, 15, 30, 45, 60 min Gravistimulation des Gesamthypokotyls sowie nach 0, 30 und 60 min Auxinstimulation hochreguliert. Da in beiden Fällen ein sehr charakteristisches Peakmuster zu erkennen war, handelt es sich bei beiden Peaks wahrscheinlich um identische cDNA-Fragmente. Allerdings könnten die jeweiligen Peaks durchaus auch aus unterschiedlichen Genfragmenten gleicher Größe bestehen. Das heißt, dass der unspezifische Randomprimer bei zwei verschiedenen Genen zufällig nach der gleichen Basenzahl bindet, so dass ein gleich großes Fragment amplifiziert wurde. Die anderen identifizierten Peaks waren dagegen nur nach einer der beiden Stimulationen differentiell reguliert. Nach Auxinstimulation war die allgemeine Peakhöhe allerdings oft sehr viel niedriger, was auf eine geringere mRNA-Menge zurückzuführen war, da bei der mRNA-Isolation nur die Hälfte der Oligotex-Partikel eingesetzt worden waren. Ebenso wurden die PCR-Bedingungen im Vergleich zu der Analyse der gravistimulierten Gesamthypokotyle leicht variiert (Theisen, 2005). Daher hoben sich einige Peaks nicht vom Hintergrundrauschen ab und konnten deshalb nicht mit den komplementären cDNA-Fragmenten verglichen werden.

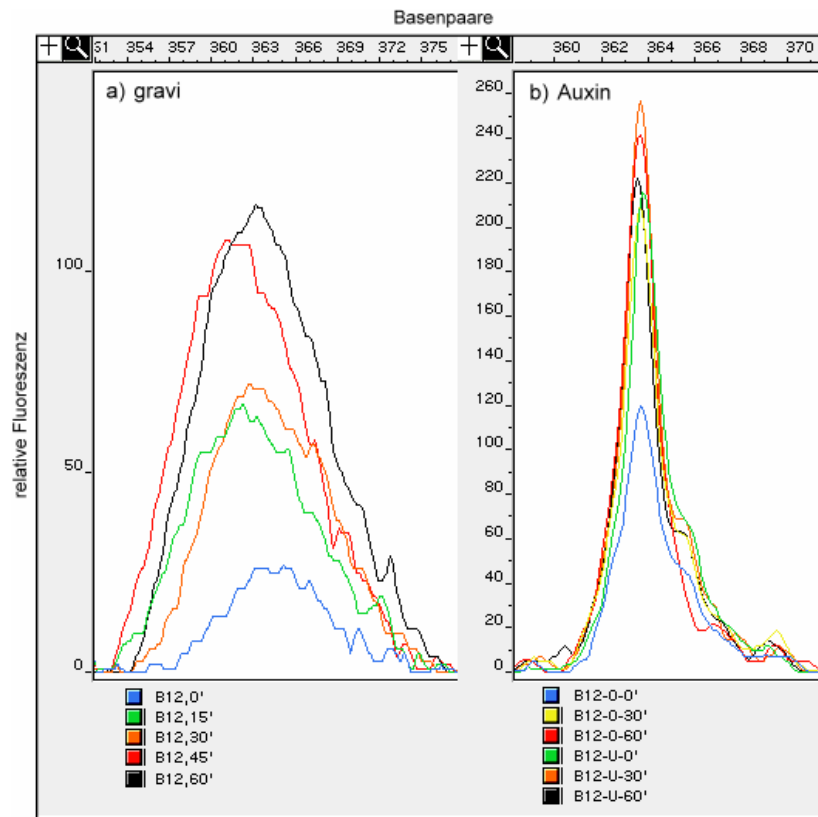


Abb. 3.2 Differenzieller Peak B12-363 bp.

a) Gravistimulation 0, 15, 30, 45, 60 min (Gesamthypokotyl) b) Auxinstimulation 0, 30, 60 min (0 = apikal, U = basal).

3.2 Isolierung, Klonierung und Sequenzierung der differentiellen cDNA-Fragmente

Um die detektierten differentiellen Fragmente zu isolieren, wurden die PCR-Ansätze auf ein höherprozentiges (3 bis 4 %) Agarosegel aufgetragen und bei einer niedrigen Spannung (20 bis 40 V) aufgetrennt. Da die Fragmente sehr dicht beieinander lagen, so dass im Gel keine einzelnen Banden zu erkennen waren, wurden pro Peak mehrere möglichst dünne Gel-Schnitte aus dem Agarosegel eluiert. Die eluierten Banden wurden daraufhin in der Kapillarelektrophorese aufgetrennt, um die exakte Fragmentgröße zu kontrollieren. Teilweise wurde erst durch eine anschließende Klonierung die Vereinzelung von zwei oder mehreren Fragmenten erreicht.

Elf Fragmente von den insgesamt 19 differentiellen Peaks wurden auf diesem Weg isoliert und anschließend sequenziert. (Eine Auflistung der entsprechenden Sequenzen befindet sich im Anhang. Die Funktion der Gene ist in Tab. 3.2 aufgeführt.)

Dazu gehörten die vier Fragmente, B12-363 bp (Abb. 3.2 a), B16-378 bp (Abb. 3.3 a), D02-492 bp (Abb. 3.3 b) und D19-405 bp (Abb. 3.3 c), die durch Gravistimulation in ihrer Expression hochreguliert worden waren.

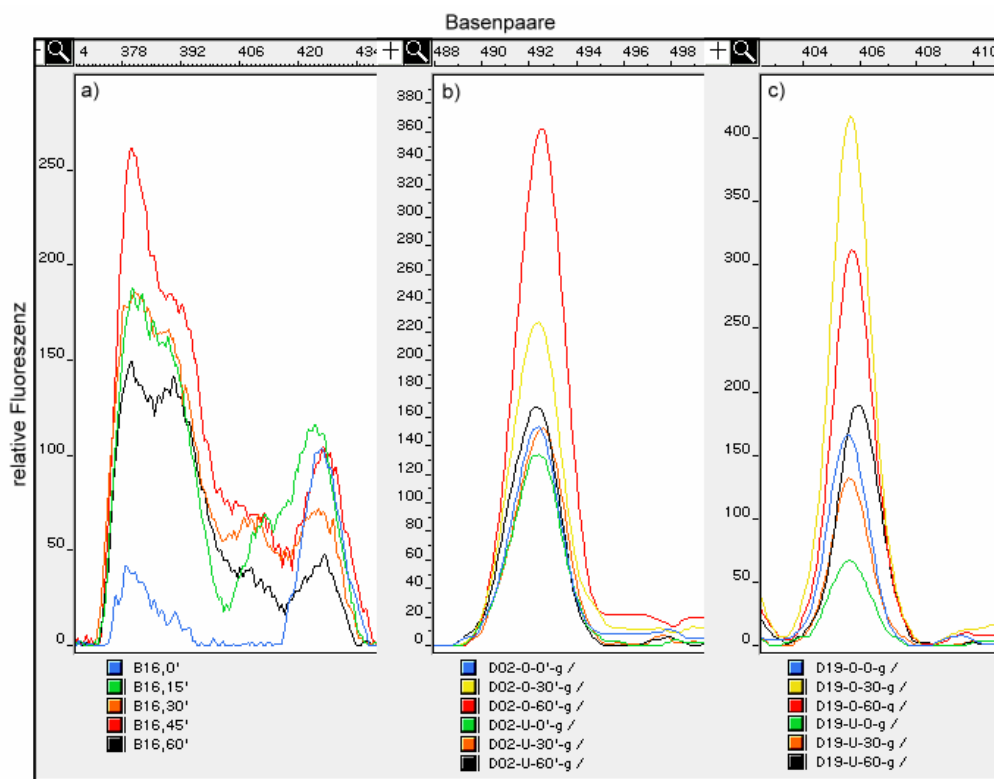


Abb. 3.3 Isolierte cDNA-Fragmente nach Gravistimulation.

a) Peak B16-378 bp, 0, 15, 20, 45, 60 min (Gesamthypokotyl) b) Peak D02-492 bp und c) Peak D19-405 bp, 0, 30, 60 min (0 = apikal, U = basal).

Von den Auxin-regulierten Peaks konnten fünf Fragmente, B02-270bp (Abb. 3.4 a), B02-339 bp (Abb. 3.4 b), B03-287 bp (Abb.3.4 c), B04-505 bp (Abb. 3.5 a) und B18-241 bp (Abb. 3.5 c) isoliert werden, die eine reduzierte Auxin-induzierte Expression aufwiesen, und zwei Fragmente B09-348 bp (Abb. 3.1) und B10-366 bp (Abb. 3.5 b) mit einer erhöhten Auxin-induzierten Expression.

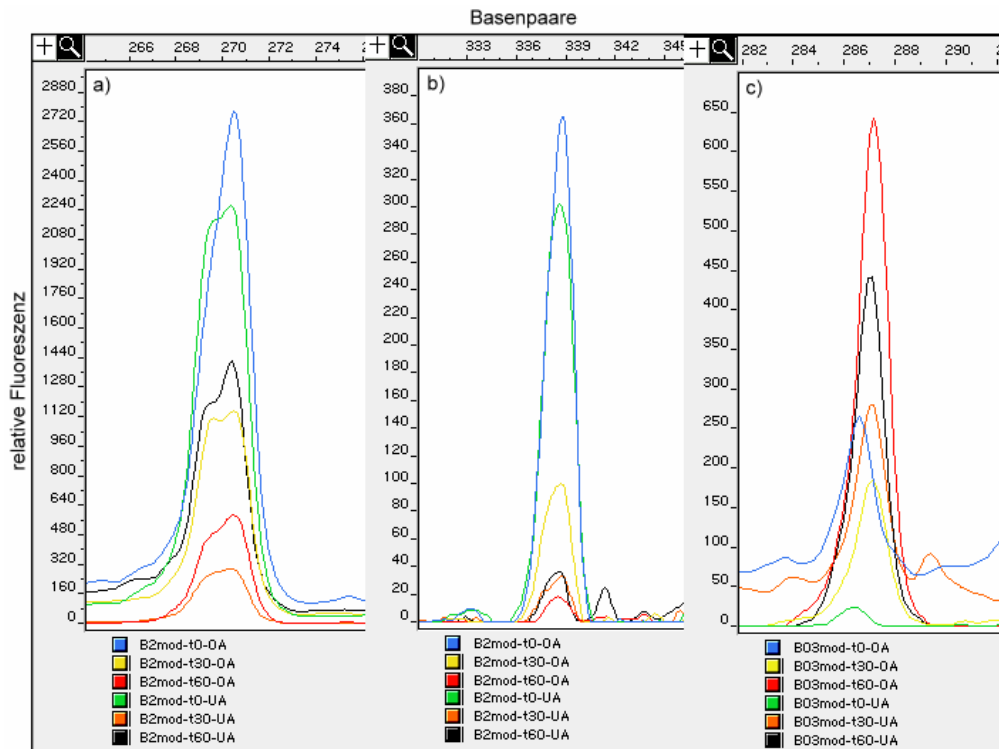


Abb. 3.4 Isolierte cDNA-Fragmente nach Auxinstimulation.

a) Peak B02-270 bp b) Peak B02-339 bp c) Peak B03-287 bp (0, 30, 60 min, 0 = apikal, U = basal).

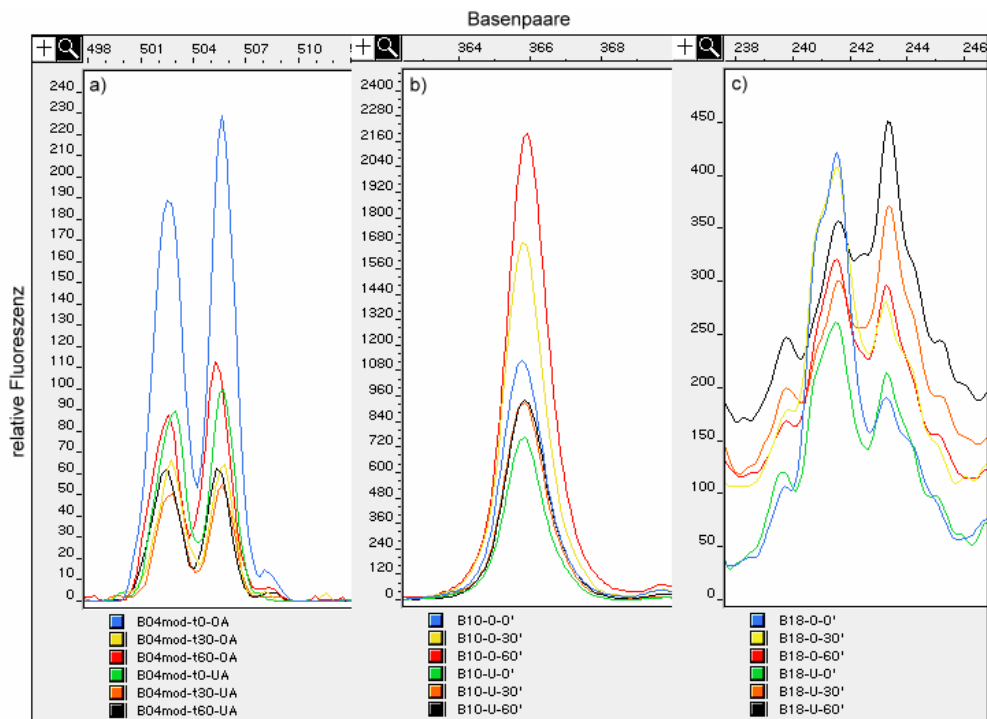


Abb. 3.5 Isolierte cDNA-Fragmente nach Auxinstimulation.

a) Peak B04-505 bp b) Peak B10-366 bp c) Peak B18-241 bp (0, 30, 60 min, 0 = apikal, U = basal).

3.3 Homologiesuche mit den Teilsequenzen

Die Sequenzen der isolierten cDNA-Fragmente wurden in Genbanken mit Hilfe computergestützter Programme (NCBI Blast) auf Homologien mit bereits bekannten Genen untersucht. Als Ergebnis wurde die prozentuale Übereinstimmung mit den verglichenen Sequenzen auf Nukleotid- und Aminosäure-Ebene angegeben, wobei die Prozentzahl nicht alle positiven Übereinstimmungen innerhalb der gesamten Sequenz wiedergibt, sondern nur aus der Teilsequenz mit der höchsten Homologie errechnet wird. Hierbei konnte von den gravistimulierten Fragmenten bei B12-363 bp eine 87%ige Homologie auf Nukleotidebene zu einer beta-6-Xylosyltransferase aus *Pinus taeda* sowie eine 84%ige zu *Vitis vinifera* festgestellt werden, während auf Aminosäureebene eine 92%ige Homologie mit einer beta-6-Xylosyltransferase aus *Gossypium raimondii* (*Pinus taeda* 90 %, *Vitis vinifera* 86 %) zu sehen war. Die Sequenz von B16-384 bp zeigte eine Homologie von 88 % auf Nukleotidebene mit Histon H2B aus *Lycopersicon esculentum* (*Capsicum annuum* 85 %, *Arabidopsis thaliana* 80 %). Auf Aminosäureebene war die Homologie zu Histon H2B aus *Oryza sativa* mit 92 % noch höher (*Arabidopsis thaliana* 92 %, *Chlamydomonas reinhardtii* 89 %). Das Fragment D02-492 bp konnte mit 98 % Übereinstimmungen auf Nukleotidebene als Cytochrom c *cyt1* aus *Helianthus annuus* L. identifiziert werden (*Chicorium intybus* 88 %, *Nicotinia tabacum* 85 %). Auf Aminosäureebene hatte D02-492 bp die höchste Homologie zu Cytochrom c aus *Guizotia abyssinica* (Niger seed) von 86 % Übereinstimmungen (*Allium porrum* 86 %, *Nigella damascena* 85 %). Das Fragment D19-405 bp zeigte auf Nukleotidebene die höchste Homologie von 87 % zu einer Phloem-Proteinkinase mit einer ‚Calmodulin-ähnlichen-Domäne‘ *PCPK1* aus *Cucurbita maxima* und zu einer Ca²⁺-abhängigen Proteinkinase *Os CDPK7* aus *Oryza sativa* mit 81 % Übereinstimmung. Auf AS-Ebene waren die Übereinstimmungen zu *Oryza sativa* mit 97 % (*Zea mays* 94 %) und zu *Cucurbita maxima* mit 91 % noch größer. Von den als Auxin-Antwort herunterregulierten Fragmenten zeigte B02-339 bp die höchste Homologie mit einer cytosolischen Aldolase aus *Cicer arietinum* L. Epikotylen mit 90 % Übereinstimmung auf Nukleotidebene sowie mit einer Fruktose-1,6-bisphosphat Aldolase aus *Lycopersicon esculentum* 96 % (*Arabidopsis thaliana* 88 %). Auf Proteinebene war allerdings keine Homologie zu einer bekannten Sequenz zu finden.

Der Peak B04-505 bp konnte auf Nukleotidebene als ein Translationsfaktor aus *Pinus pinaster* mit 91 % (*Pimpinella brachycarpa* 87 %) identifiziert werden. Auf Aminosäureebene zeigte B04-505 bp eine Homologie zu dem Translations-Initiations-Faktor *eIF 1* bzw. *SUI 1* von 84 % aus *Salix bacco* (*Coffea arabica*, *Oryza sativa*, *Pinus pinaster* 85 %). Bei der Sequenz von

B18-241 bp konnte auf Nukleotidebene eine Homologie mit 100 % Übereinstimmung zu einer Glutathion-S-Transferase aus *Danio rerio* festgestellt werden, die Aminosäuresequenz zeigte allerdings eine Homologie zu einer Histondeacetylase *HDA110 Isoform 1-4* aus *Zea mays* mit 49 % Übereinstimmung (*Arabidopsis thaliana* 53 %, *Oryza sativa* 48 %). Die anderen Auxin-stimulierten Fragmente zeigten keine offensichtliche Homologie zu bekannten DNA-Sequenzen in den durchsuchten Genbanken, was wahrscheinlich darauf zurückzuführen ist, dass die Teilsequenzen der isolierten cDNA-Fragmente hauptsächlich aus der 3'-untranslatierten Region der entsprechenden Gene bestehen.

3.4 Vervollständigung der partiellen cDNAs

Da die isolierten Fragmente nur einen kleinen Bereich der 3'-translatierten Gensequenz abdeckten, wurde mittels RACE-PCR (rapid amplification of cDNA ends) versucht, die vollständige codierende Gensequenz zu amplifizieren. Hierbei konnte durch die Ligation einer bekannten Oligosequenz an das 5'-Kopfende (5'-Cap-Struktur) der mRNA (GeneRacer™ Kit) eine Primeranbindung erfolgen, die zusammen mit einem Gen-spezifischen Primer die Amplifikation der unbekannt Sequenz erlaubte. Mit Hilfe dieser Methode konnte das partielle cDNA-Fragment B10-666 bp (GTP-bindendes Protein Ran), welches in der Arbeit von Ralf Theisen (2005) als gravitrop hochreguliertes Gen identifiziert wurde, vollständig sequenziert werden. Die RACE-PCR ein 861 bp großes Fragment mit einer codierenden Sequenz von 71 bp bis 735 bp und insgesamt 222 Aminosäuren. Weiterhin konnte die Cytochrom c-Sequenz (D02-492 bp) vollständig identifiziert werden. Hier konnten weitere 200 bp amplifiziert werden, so dass ein 684 bp großes Fragment entstand. Dabei startete die codierende Sequenz bei 119 bp und endete bei 447 bp, umfasste also 109 Aminosäuren. Ebenso konnte die fehlende 5'-Region des Translations-Initiations-Faktors isoliert werden. Dies ergab eine Verlängerung des cDNA-Fragments B04-505 bp um ca. 100 bp und lieferte eine 606 bp lange Sequenz, mit einer codierenden Sequenz von 88 bp bis 432 bp und insgesamt 115 Aminosäuren. Obwohl mit diesem System der zweite, nicht genspezifische Primer an der 5'-Cap-Struktur binden sollte, konnte die komplette Sequenz der Histondeacetylase (B18-241 bp) nicht identifiziert werden. Stattdessen wurde ein 180 bp großes Fragment amplifiziert, welches aber kein Startcodon enthielt.

Bei den vollständig sequenzierten Genen handelte es sich um sehr kleine Gene mit nur wenigen hundert Basenpaaren. Die unbekannte 5'-Region der weitaus größeren Gene wie der Histondeacetylase (B18-241 bp) und der Calcium-abhängigen Proteinkinase (D19-405 bp)

sowie der bisher unbekanntenen cDNA-Fragmente B02-339 bp, B03-287 bp, B09-348 bp und B10-365 bp konnte mit dieser Methode nicht isoliert werden. Bei den unbekanntenen Sequenzen handelte es sich somit wahrscheinlich ebenfalls um größere Gensequenzen. Obwohl die Elongationszeit bis zu 4 min ausgedehnt wurde, um die Amplifikation einer bis zu 4 kb langen Sequenz zu ermöglichen, blieb dieses System bei den genannten Sequenzen erfolglos.

Daher wurde für die übrigen Sequenzen das 5'RACE System (Version 2.0) angewendet. Hierbei wurde zunächst mit Hilfe eines Gen-spezifischen Primers (GSP1) eine spezifische cDNA hergestellt. Daraufhin ermöglichte die Anpolymerisierung eines repetitiven Poly-C-Schwanzes an das 3'Ende der Fragment-spezifischen cDNA die Amplifikation der unbekanntenen 5'Region zwischen einem komplementären homopolymeren Primer (+ Adaptersequenz) und einem zweiten Gen-spezifischen Primers (GSP2). Mit dieser spezifischeren Methode konnten weitere Teilsequenzen von B18-241 bp sequenziert werden. In einem ersten Schritt wurden 822 bp mit den Primern B18-GSP1-3 vervielfältigt und in einem zweiten Schritt weitere 700 bp mit den Primern HIS-1-3 amplifiziert. Weiterhin konnten 615 bp des D19-405 bp-Fragments (Calcium-abhängigen Proteinkinase) in Richtung 5'-Ende amplifiziert werden. Auch eine 240 bp große Teilsequenz des unbekanntenen Fragments B02-270 bp konnte mit Hilfe der RACE-PCR (Version 2.0) sequenziert werden. In den jeweils amplifizierten Teilstücken der 5'Region von B18-241 bp, D19-405 bp und B02-270 war allerdings kein Startcodon enthalten

3.5 Homologiesuche mit den neu identifizierten Sequenzen

Die isolierten Sequenzen wurden erneut in Genbanken mit bekannten Sequenzen verglichen. Hierbei konnte die vollständige Sequenz des Fragments B10-666 bp die Homologie zu dem GTP-bindenden Protein *Ran* mit 98 % Übereinstimmung zu *Arabidopsis thaliana* (*Cicer arietinum*, *Nicotinia tabacum* 97 %) bestätigen (Teilsequenz: *Lotus corniculatus* var. *japonicus* 98 %; Theisen, 2005). Mit der vollständigen Sequenz von D02-492 bp konnte die Homologie mit 99 % Übereinstimmung auf Proteinebene zu Cytochrom c aus der Wurzel von *Helianthus annuus* gesteigert werden. Durch die Identifikation der kompletten cDNA-Sequenz von B04-505 bp konnte die höchste Homologie mit 80 % Identität auf dem Aminosäure-Level zu dem Translations-Initiations-Faktor *eIF1* aus *Arabidopsis thaliana* (*Oryza sativa* und *Porteresia coarctata* 79 %) gezeigt werden.

Die jetzt insgesamt 1020 bp große Sequenz des D19-405 bp-Fragments erbrachte auf Proteinebene einen leicht niedrigeren Homologiegrad mit 92 % zu der Phloem-Proteinkinase *PCPK1* aus *Cucurbita maxima* (Calcium-abhängige Proteinkinase *PK3 capsicum annuum* 91 %). Der Vergleich mit den homologen Sequenzen zeigte, dass es sich wahrscheinlich um ein doppelt so großes Fragment handelt. Durch die Identifizierung von insgesamt 87 Aminosäuren der bisher unbekannt Sequenz des B02-270 bp-Fragments konnte eine Homologie mit 97 % zu einem Histon H3 aus *Oryza sativa* sowie *Arabidopsis thaliana*, *Vitis vinifera* u.a. festgestellt werden. Da es sich hierbei um ein stark konserviertes Gen handelt, kann man anhand der homologen Sequenzen sehen, dass noch etwa 50 Aminosäuren bis zur vollständigen Sequenz fehlen. Die Sequenzierung eines weiten Bereichs der 5' translatierten Region des Fragments B18-241 bp erbrachte eine deutliche Steigerung des Homologiegrades mit 72 % Übereinstimmungen zu einer Histondeacetylase aus *Arabidopsis thaliana*. In der Tabelle 3.2 sind die Funktionen der isolierten Genfragmente anhand der gefundenen Homologien auf Proteinebene aufgelistet.

Tabelle 3.2 Homologien

	Fragment	Funktion
Gravistimulation	B10-666 bp	GTP-Protein Ran
	B12-363 bp	beta-6-Xylosyltransferase
	B16-378 bp	Histon H2B
	D02-492 bp	Cytochrom c
	D19-405 bp	Calcium-abhängige Protein Kinase
Auxinstimulation	B02-270 bp	Histon H3
	B02-339 bp	Fruktose-1,6-bisphosphat Aldolase
	B03-287 bp	unbekannt
	B04-505 bp	Translations-Initiations-Faktor eIF1
	B09-348 bp	unbekannt
	B10-366 bp	unbekannt
	B18-241 bp	Histondeacetylase

3.6 Verifizierung der differentiellen Expression mit genspezifischen Primern

Für die Verifizierung der differentiellen Expression der identifizierten Gene wurde eine PCR mit Gen-spezifischen Primern durchgeführt. Dadurch konnten Artefakte ausgeschlossen werden, die aus PCR-Fragmenten gleicher Größe, aber unterschiedlicher Identität hervorgegangen waren. Mit Hilfe der spezifischen Primer wurden andere Genfragmente gleicher Größe nicht mehr amplifiziert. Auf diesem Wege konnte also überprüft werden, ob die identifizierten Gene nach der betreffenden Stimulation wirklich differentiell reguliert wurden. Obwohl für alle isolierten und sequenzierten cDNA-Fragmente spezifische Primer hergestellt wurden, lieferte eine Amplifikation nur für Ran, Cytochrom c und eIF1 ein spezifisches PCR-Produkt. Daher konnte die Verifizierung nur an den vollständig sequenzierten Genen durchgeführt werden. Die Primer-Bindungsstellen wurden mit einem Abstand von 250 bp bis 400 bp innerhalb von Start- und Stopcodon gewählt. Die Auftrennung der spezifischen PCR-Produkte zeigte, dass die Zyklenzahl während des PCR-Programms aufgrund der hohen Sensitivität der CE auf 18 Zyklen gekürzt werden musste, da sonst eine Sättigung erreicht wurde und keine Unterschiede in der Expressionsrate zwischen den einzelnen Proben detektiert werden konnten.

Die Amplifikation der gravistimulierten cDNA mit spezifischen Ran-Primern (Abb. 3.6) ergab ein 349 bp großes PCR-Produkt. Durch Auftrennung mittels CE konnte gezeigt werden, dass die Expression der Ran-mRNA nach Gravistimulation sowohl in den apikalen als auch in den basalen Proben hochreguliert wird.

Dabei war apikal ein 3-facher Anstieg und basal ein 4-facher Anstieg in der Expressionsrate zu messen, während der mRNA-Gehalt der unstimulierten Proben in den apikalen Hypokotylsegmenten um das 3-fache höher war als in den basalen Proben. Somit konnte die gravitrope Regulation der Ran-mRNA im Gesamthypokotyl (Theisen, 2005) mit spezifischen Primern bestätigt werden.

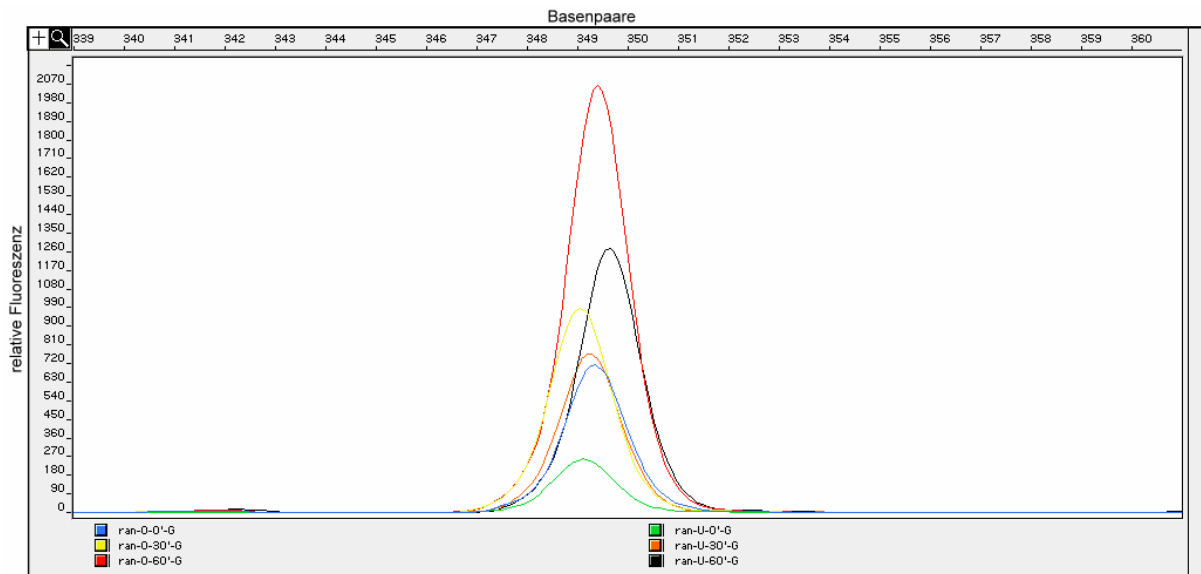


Abb. 3.6 Verifizierung der differentiellen Ran-Expression (Peak B10-666 bp) mit Ran-spezifischen Primern. Gravistimulation 0, 30, 60 min, 0 = apikal, U = basal.

Ebenso konnte die gravitrop hochregulierte Expression von Cytochrom c in den apikalen Hypokotylabschnitten verifiziert werden (Abb. 3.7). Hier zeigte die Amplifikation der gravistimulierten cDNA mit spezifischen Primern apikal einen 6-fachen Anstieg im Vergleich zur Kontrolle. Zudem zeigte sich auch im basalen Hypokotylabschnitt eine 3-fach erhöhte Cytochrom c-Expression. Diese Tendenz konnte auch schon in der Randomprimer-PCR beobachtet werden, dort war der Anstieg allerdings minimal und lag weit unter dem Faktor 2 (Abb. 3.3 b). Ein Vergleich der apikalen mit den basalen Proben zeigte weiterhin, dass der mRNA-Gehalt in der 0-Kontrolle und nach 30 min Stimulation noch gleich hoch war und erst nach 60 min differierte.

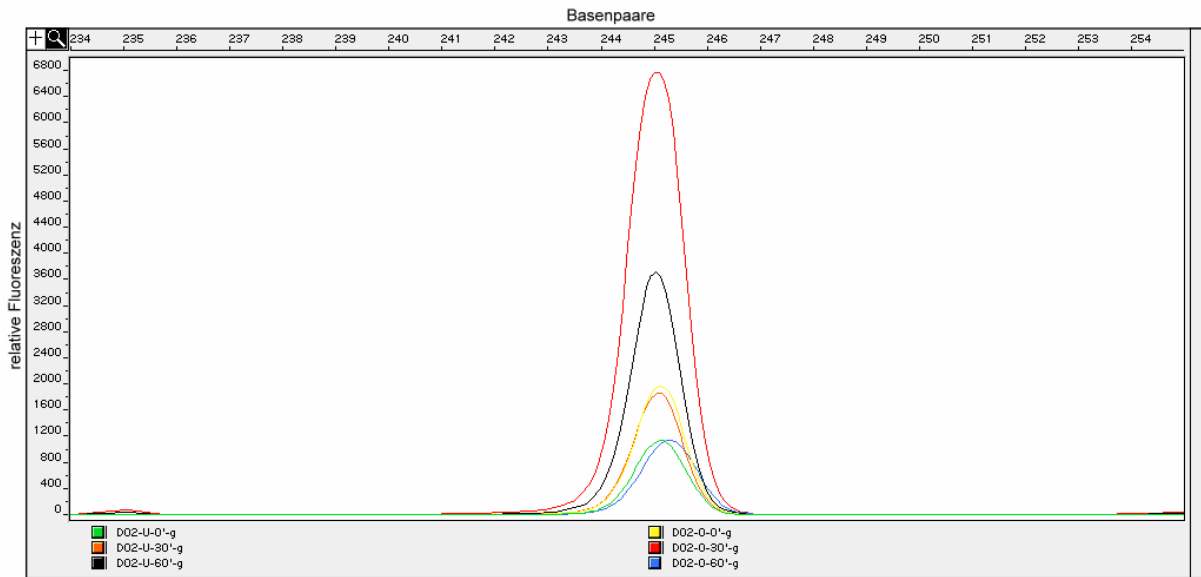


Abb. 3.7 Verifizierung der differentiellen Expression von Cytochrom c (Peak D02-492 bp) mit spezifischen Primern. Gravistimulation 0, 30, 60 min, 0 = apikal, U = basal.

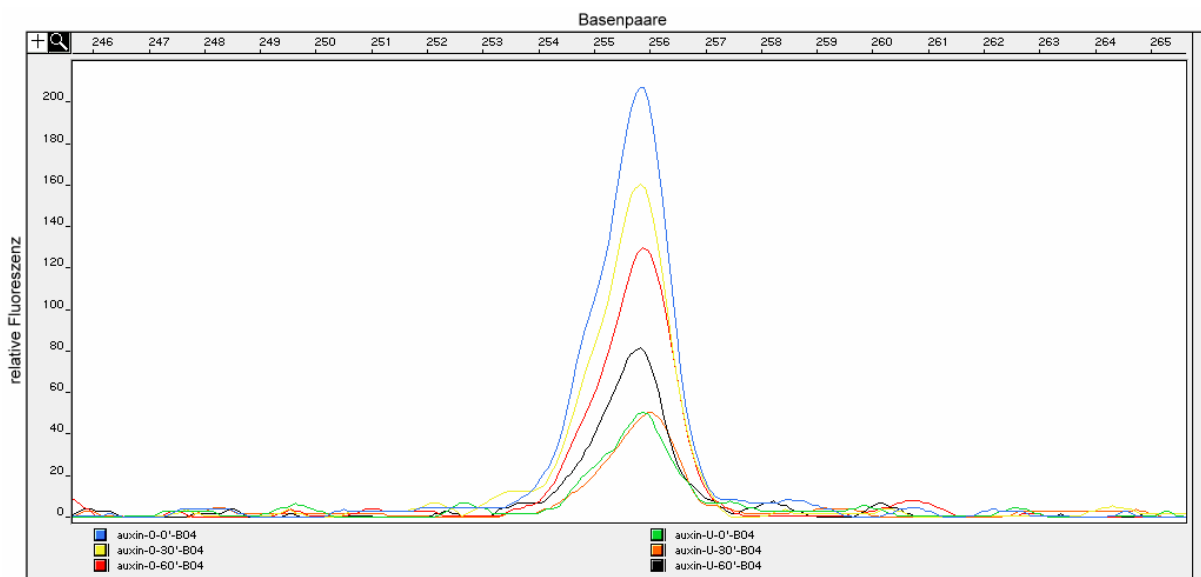


Abb. 3.8 Verifizierung der differentiellen Expression von eIF1 (Peak B04-505 bp) mit spezifischen Primern. Auxinstimulation 0, 30, 60 min, 0 = apikal, U = basal.

In Abbildung 3.8 ist die Expression von eIF1 durch Amplifikation mit spezifischen Primern zu sehen. In den apikalen Protoplasten wurde die Expression im Vergleich zur Kontrolle nach Auxinstimulation um ein Drittel herunterreguliert. Im Vergleich zu der ‚random‘-PCR war die Herunterregulation der eIF1-Expression nach spezifischer Amplifikation allerdings schwächer (Abb. 3.5 a). Da die Auftrennung der spezifischen PCR-Produkte auf der

Kapillarelektrophorese aber äußerst sensitiv ist, zeigen bei einer spezifischen PCR-Reaktion auch kleinere Expressionsunterschiede als Faktor 2 eine differentielle Regulation an. Gleichzeitig zeigten die basalen Protoplasten nach 60 min eine leichte Hochregulation. In der Randomprimer-PCR konnte man in den basalen Protoplasten allerdings keine differentielle Regulation erkennen (Abb. 3.5 a).

Bei dem Vergleich der Ergebnisse mit Randomprimern und Gen-spezifischen Primern konnten kleine Unterschiede auf Transkriptionsebene beobachtet werden, die vermutlich aufgrund der spezifischeren und stringenteren Bedingungen hervorgerufen wurden. Unterschiedliche Expressionsverläufe zeigten sich aber nur in den Bereichen, die mit Randomprimern als nicht differentiell eingestuft worden waren (basal D02-492 bp und B04-505 bp). Somit konnte die Expressionsänderung von Ran, Cytochrom c und eIF1 bestätigt werden, was zeigt, dass das Screening mittels Randomprimer geeignet ist, um differentielle Expressionsraten zu identifizieren. Da sich die Expression der nicht verifizierten Genfragmente mindestens um den Faktor 2 im Vergleich zur Kontrolle unterscheidet, kann man davon ausgehen, dass die Expression tatsächlich differentiell ist. Zudem konnte die differentielle Expression in mindestens zwei verschiedenen Wiederholungen des jeweiligen Stimulationsexperiments bestätigt werden.

3.7 Vergleich der Genexpression nach Auxin- und Gravistimulation mit spezifischen Primern

Um die Abhängigkeit von Auxin in der gravitropen Genexpression in *Helianthus annuus* zu untersuchen, wurde mit Hilfe der spezifischen Primer die Expression der einzelnen Gene sowohl in gravi- als auch in Auxin-stimulierter cDNA miteinander verglichen.

Dabei zeigte die Amplifikation der Ran-cDNA in Auxin-stimulierten Protoplasten eine leichte Herunterregulation nach 30 min in den apikalen Proben sowie eine leichte Hochregulation in den basalen Protoplasten nach 60 min (Abb. 3.9). Demnach ist die Expression von Ran im apikalen Bereich nach Auxin- und Gravistimulation in dem untersuchten Zeitrahmen negativ miteinander korreliert. Während die Ran-Expression nach Gravistimulation stark angestiegen war, hatte die Auxininduktion kaum Einfluss auf die Expression. Basal war die Ran-Expression zwar sowohl nach Auxinstimulation als auch nach Gravistimulation hochreguliert, aber auch hier hatte Auxin nur eine geringe Wirkung auf die Expression. Die weitgehende

Unabhängigkeit der Ran-Expression von Auxin zeigt, dass Ran während der gravitropen Antwort wahrscheinlich nicht durch Auxin induziert wird.

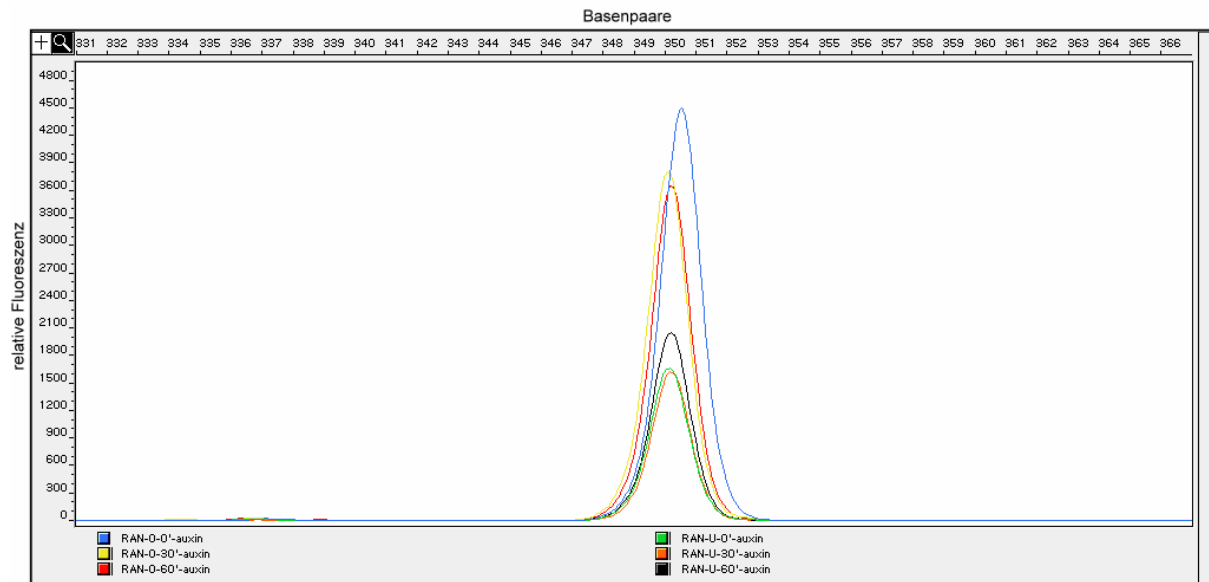


Abb. 3.9 Expression der Ran-mRNA (B10-666 bp) in Auxin-stimulierter cDNA. 0, 30, 60 min, O = apikal, U = basal.

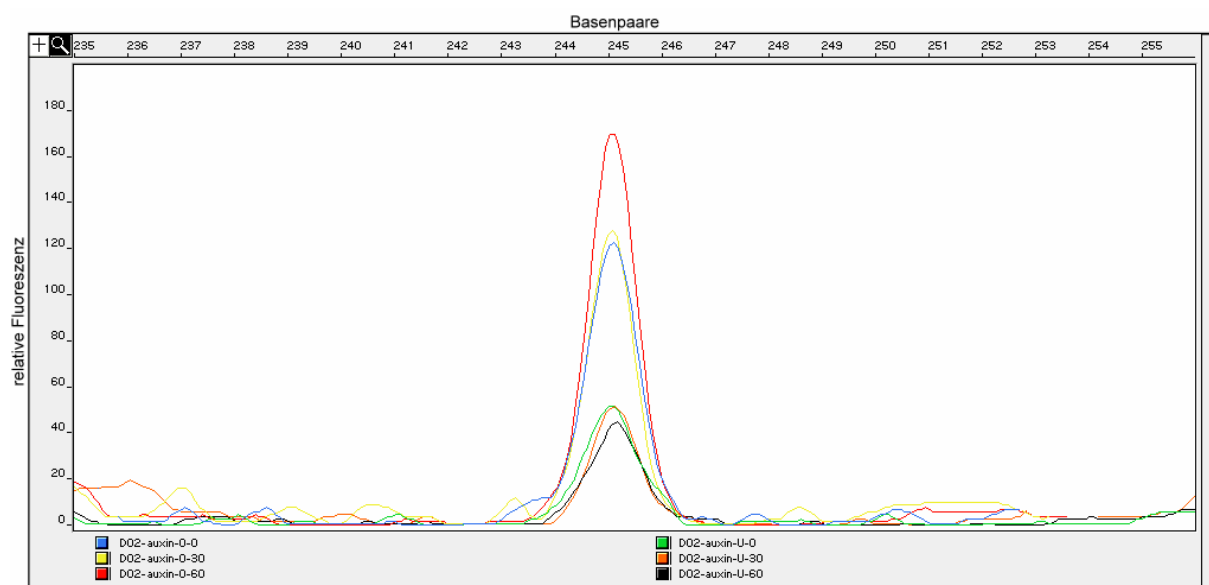


Abb. 3.10 Expression der Cytochrom c-mRNA (D02-492 bp) in Auxin-stimulierter cDNA. 0, 30, 60 min, O = apikal, U = basal.

Während die Expression von Cytochrom c gravitrop hochreguliert wurde, konnte in den Auxin-stimulierten Protoplasten nach 60 min apikal ebenfalls ein leichter Anstieg in der Expressionsrate festgestellt werden (Abb. 3.10). In den basalen Protoplasten war dagegen keine differentielle Regulation zu sehen. Aufgrund der späten Induzierbarkeit der Cytochrom c-mRNA (60 min), ist die gravitrope Expression wahrscheinlich nicht von Auxin abhängig.

Die PCR mit eIF1-spezifischen Primern zeigte apikal eine 4-fache und basal eine 2,5-fache Hochregulation der eIF1- Expressionsrate in den gravistimulierten Hypokotylen im Vergleich zu den unstimulierten Kontrollen (Abb. 3.11). In den Auxin-behandelten Protoplasten war dagegen apikal eine herunterregulierte Expression im Vergleich zu den unstimulierten Proben zu sehen, während die Expression basal ebenfalls leicht hochreguliert war. Folglich ist auch die eIF1- Expression nach Gravistimulation und Auxinstimulation im apikalen Bereich negativ zueinander korreliert, so dass Auxin dort während der Gravistimulation keine Rolle für die Expression von eIF1 zu spielen scheint.

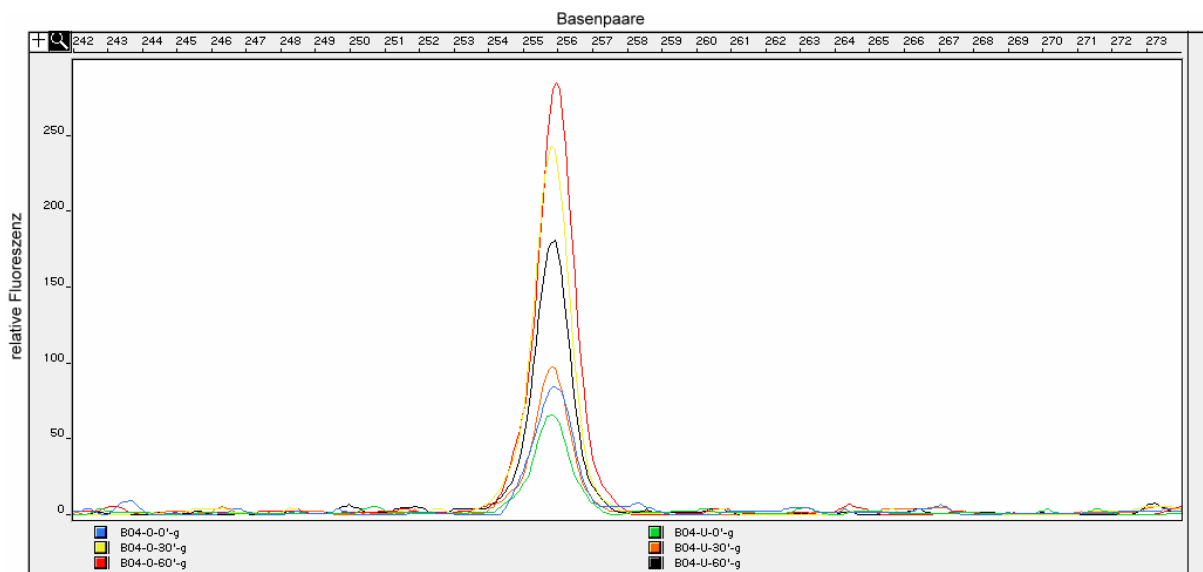


Abb. 3.11 Expression der eIF1-mRNA (B04-505 bp) in gravistimulierter cDNA. 0, 30, 60 min, O = apikal, U = basal.

3.8 Expressionsanalysen während simulierter und realer Mikrogravitation

3.8.1 Klinorotation

Im schnelldrehenden Klinostaten wurde die Expressionsrate in apikalen und basalen Protoplasten während simulierter Mikrogravitation gemessen. Hier wird eine künstliche Mikrogravitation durch die Rotation der Zellen um eine Achse waagrecht zur Richtung des Schwerkraftvektors erzeugt. Da zum Zeitpunkt des Experiments die Sequenz des Cytochrom c-Fragments noch nicht identifiziert war, wurde hier nur die Expression der beiden Gene Ran und eIF1 untersucht. Zudem war ein direkter Vergleich des mRNA-Gehaltes zwischen apikalen und basalen Protoplasten in diesem Versuch nicht möglich, da die Ausbeute bei der Protoplastenisolation der basalen Hypokotylabschnitte nicht sehr hoch war. Hier konnten im Gegensatz zu 1000000 apikalen Protoplasten, nur aus jeweils 400000 basalen Protoplasten die mRNA gewonnen werden.

Die Stimulation durch simulierte Schwerelosigkeit zeigte sowohl in den apikalen als auch in den basalen Protoplasten eine schnelle Akkumulation der Ran-mRNA und der eIF1-mRNA. Dabei war die Ran-Expression in den basalen Protoplasten nach 200 s um das 3-fache und nach 400 s fast um das 6-fache angestiegen (Abb. 3.12 a). In den apikalen Protoplasten konnte man einen zweifachen Anstieg zwischen 200 und 400 s beobachten (Abb. 3.12 b; 0 Kontrolle ausgefallen).

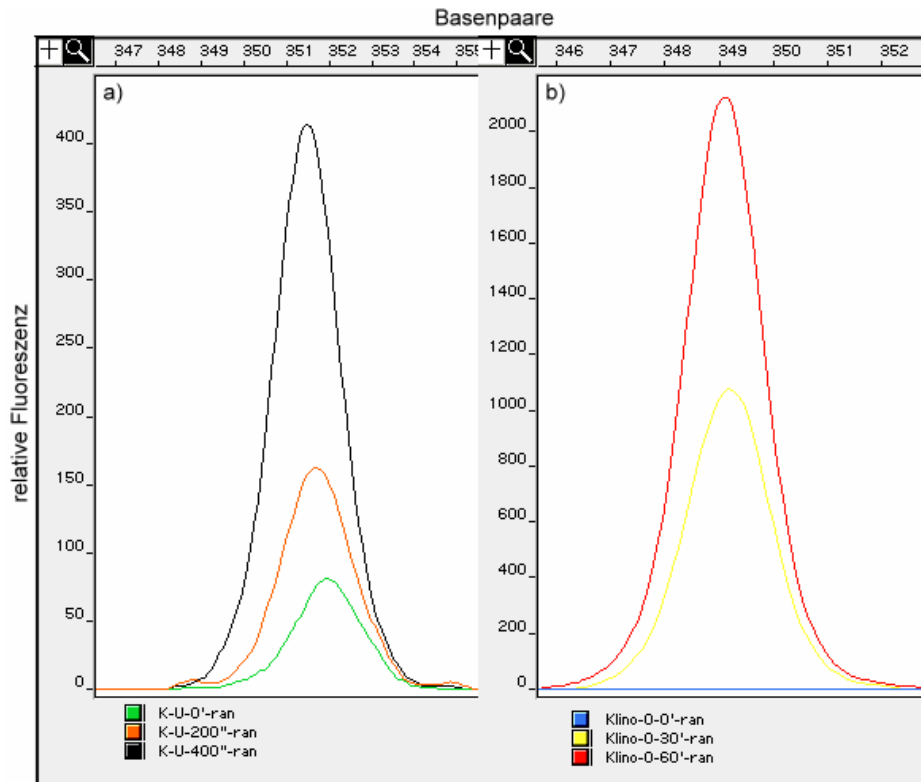


Abb. 3.12 Ran-Expression nach 0, 200 und 400 s simulierter Schwerelosigkeit im schnelldrehenden Klinostaten. a) basal (400000 Protoplasten) b) apikal (1000000 Protoplasten).

Die Expressionsrate von eIF1 stieg in den basalen Protoplasten nach 400 s im schnell drehenden Klinostaten um mehr als das 4-fache an (Abb. 3.13 a). Da die Kontrolle in den apikalen Protoplasten ausgefallen war, konnte nur ein knapp zweifacher Anstieg der eIF1-mRNA zwischen 200 s und 400 s ausgewertet werden (Abb. 3.13 b).

Da die Expressionssteigerung in den basalen Protoplasten sowohl bei Ran als auch bei eIF1 eindeutig war und auch der mRNA-Anstieg in den apikalen Protoplasten zwischen 200 und 400 s eine Verdopplung zeigte, wurde auf eine Wiederholung des Experiments verzichtet. Die Ergebnisse zeigten, dass der Expressionslevel durch künstliche Mikrogravitation beeinflusst wurde, was daraufhin unter Mikrogravitationsbedingungen in der TEXUS40 Rakete überprüft werden sollte.

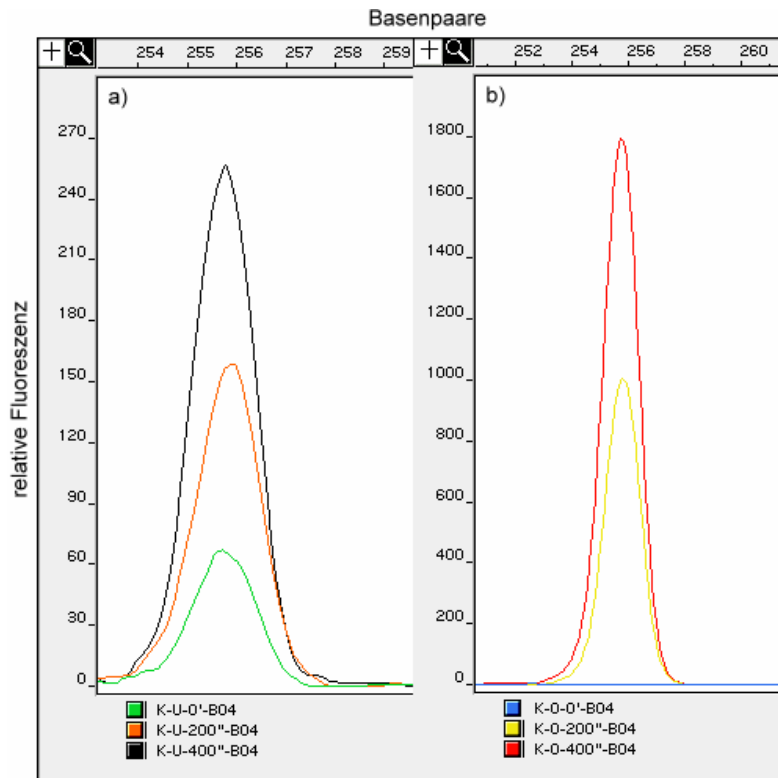


Abb. 3.13 eIF1-Expression nach 0, 200 und 400 s simulierter Schwerelosigkeit im schnellrotierenden Klinostaten. a) basal (400000 Protoplasten) b) apikal (1000000 Protoplasten).

3.8.2 TEXUS40 Flug-Experiment

Bei dem TEXUS40 Experiment handelt es sich um einen ungefähr 30 minütigen Raketenflug, der eine parabelförmige Kurve beschreibt (Abb. 3.14). Nach dem Start befindet sich die Rakete aufgrund der Beschleunigung zunächst in einer Hypergravitationsphase. Nach Ausbrennen des Raketenantriebs wird dieser abgeworfen, so dass die Rakete an Schub verliert und sich ab diesem Zeitpunkt im freien Fall befindet. Dies ist der Start der Mikrogravitationsphase und findet in einer Höhe von ca. 100 km statt. Die Rakete erreicht daraufhin noch eine Höhe von ca. 250 km und vollendet dann die Parabel. Insgesamt herrschen ungefähr 6 min lang Mikrogravitationsbedingungen bis ein Fallschirm den freien Fall wieder abstoppt.

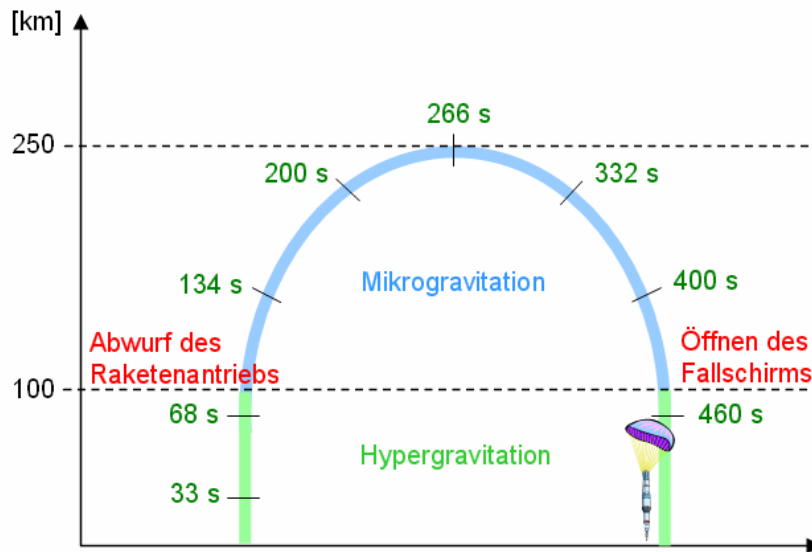


Abb. 3.14 Parabelflug der TEXUS40 Rakete.

Mit Hilfe dieses Experiments konnte die Expression der Ran-mRNA unter realen μ g-Bedingungen untersucht werden. Da in der TEXUS40-Rakete nur für 16 Proben Platz war, wurde für das Experiment eine enge Zeitreihe mit jeweils nur einer Wiederholung gewählt. Neben einer Bodenkontrolle (1g) wurde die mRNA-Expression in apikalen und basalen Protoplasten an acht verschiedenen Zeitpunkten während des Fluges gemessen, indem die Stimulation der Protoplastensuspension mit Hilfe eines Fixiermittels abgestoppt wurde (Abb. 3.15).

Davon lagen 5 Zeitpunkte (3 –7) in der μ g-Phase, die bei 75 s begann und bei ca. 432 s endete. Die Ran-Expression wurde ebenfalls unter den herrschenden hyperg-Bedingungen während der Startphase (1 und 2) und nach der μ g-Phase (8) untersucht.

Die Analyse der amplifizierten Ran-cDNA in den apikalen Protoplasten zeigte einen deutlichen Anstieg der Ran-Expression während des gesamten Fluges. Unter den hyperg-Bedingungen in der Startphase nach 33 und 68 s bei 8 g (1 – blau, 2 -grün) und nach 134 s (3 – gelb, 75 s hyperg / 59 s μ g) konnte kein Effekt auf die Ran-Expression im Vergleich zur Bodenkontrolle gemessen werden.

Die erste Induktion der Ran-Expression konnte nach 200 s beobachtet werden, was einem Zeitraum von 75 s hyperg und 125 s μ g entsprach (4 – orange). Nach einem weiteren leichten Anstieg bei 332 s (6 – pink), zeigte sich der stärkste Anstieg in der Ran-Expression erst während der hyperg-Phase nach 460 s, 28 s nach der μ g-Phase (8 – schwarz). Diese mRNA-

Akkumulation war sehr wahrscheinlich noch auf die μg -Stimulation zurückzuführen, da auch nach 75 s hyperg und weiteren 59 s μg während der Startphase (Zeitpunkt 1, 2 und 3) keine Expressionsänderung zu sehen war. Demnach war nach nur 28 Sekunden hyperg kein Effekt auf die Expression zu erwarten.

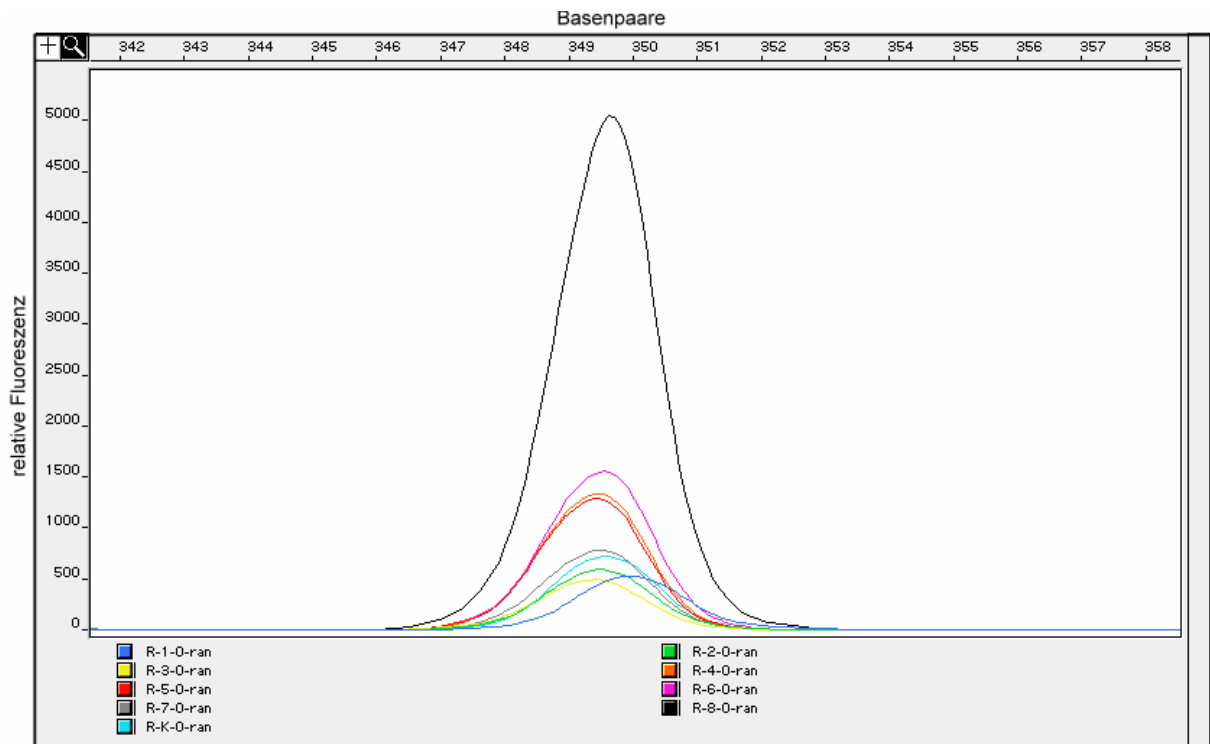


Abb. 3.15 Ran-Expression in apikalen Protoplasten während des TEXUS40-Fluges. 1 = 33 s hyperg, 2 = 68 s hyperg, 3 = 134 s μg , 4 = 200 s μg , 5 = 266 s μg , 6 = 332 s μg , 7 = 400 s μg , 8 = 460 s hyperg und Bodenkontrolle K = 1 g (μg -Bedingung: 75 s bis 432 s).

Bei dem steilen Abfall der Expression, der zum Zeitpunkt 7 nach 400 s zu sehen war, handelt es sich aufgrund des ansonsten kontinuierlichen Expressionsanstiegs um einen Ausfall der Probe.

Die Analyse der basalen Protoplasten zeigte einen ähnlichen Verlauf der Ran-Expression (Abb. 3.16). Leider konnten hier die Zeitpunkte 2 und 8 (grün, schwarz) sowie die Bodenkontrolle (türkis) aufgrund von Probenausfällen nicht ausgewertet werden.

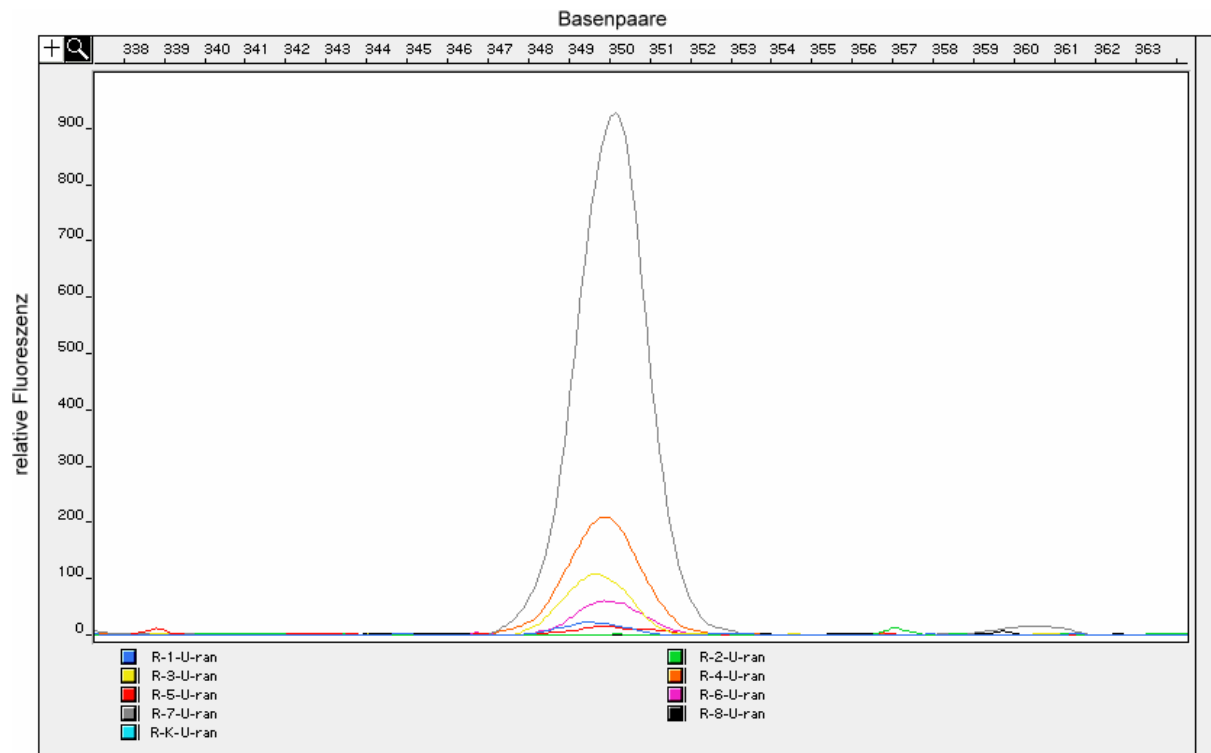


Abb. 3.16 Ran-Expression in basalen Protoplasten während des TEXUS40-Fluges. 1 = 33 s hyperg, 2 = 68 s hyperg, 3 = 134 s μ g, 4 = 200 s μ g, 5 = 266 s μ g, 6 = 332 s μ g, 7 = 400 s μ g, 8 = 460 s hyperg und Bodenkontrolle K = 1 g (μ g-Bedingung: 75 s bis 432 s).

In den basalen Protoplasten konnte man einen ersten Anstieg nach 134 s (3 – gelb) erkennen. Dabei handelt es sich um den ersten Zeitpunkt, der unter Mikrogravitationsbedingungen gemessen wurde. Daraufhin folgte ein weiterer Expressionsanstieg nach 200 s (4 – gelb). Geht man wie in den apikalen Protoplasten von einer kontinuierlichen Expressionssteigerung aus, handelt es sich bei den Zeitpunkten 5 und 6 (blau, rot, pink) ebenfalls um Ausfälle. Weiterhin ist der darauf folgende starke Anstieg der Ran-Expression nach 400 s (7 – grau) vergleichbar mit dem Expressionsverlauf in den apikalen Protoplasten. Dieser Anstieg unter μ g-Bedingungen demonstriert, dass die hohe Expressionsrate nach 460 s (8 – schwarz, Abb. 3.15) in den apikalen Protoplasten nicht auf die hyper-Gravitationsphase während der Landung zurückzuführen ist. Insgesamt war der Ran-mRNA-Gehalt in den basalen Protoplasten um ein Vielfaches niedriger als in den apikalen Protoplasten, allerdings stieg die Expression in beiden Hypokotylabschnitten während des Fluges um das 10-fache an.

3.9 Vergleich von gravistimulierten Hypokotylen mit gravistimulierten Protoplasten

Mit dem Klinostat- und dem TEXUS40-Flug-Experiment konnte gezeigt werden, dass die Sonnenblumen-Hypokotylprotoplasten in der Lage sind auf Schwerelosigkeit zu reagieren. Zudem war ein Vergleich zwischen gravistimulierten Hypokotylen durch Kippen und gravistimulierten Protoplasten durch simulierte und reale Schwerelosigkeit möglich. Der Anstieg der Ran-mRNA-Expression während realer Mikrogravitation (Abb. 3.15, 3.16) bestätigte die Ergebnisse aus dem Klinostaten (Abb. 3.12 a, b) und zeigte, dass die Ran-Expression nicht nur infolge einer veränderten Orientierung zum Schwerkraftvektor ansteigt (Abb. 3.6), sondern auch bei einem fehlenden Gravitationsvektor. Auch der Anstieg der eIF1-Expression durch Kippen der Hypokotyle (Abb. 3.8) konnte in den gravistimulierten Protoplasten im Klinostaten bestätigt werden (Abb. 3.13 a, b).

Hiermit konnte gezeigt werden, dass sowohl Protoplasten als auch intakte Hypokotyle mit einem Anstieg der Ran- bzw. eIF1-mRNA reagieren. Diese positive Korrelation zwischen Hypokotylen und Hypokotylprotoplasten bedeutet gleichzeitig, dass Veränderungen auf Transkriptionsebene von Protoplasten auf ganze Hypokotyle übertragbar sind.

3.10 Vergleich von apikaler und basaler Genexpression

Das Screening mit Hilfe der Randomprimer-PCR zeigt, dass die differentiellen Peaks sowohl in Auxin-stimulierter als auch in gravistimulierter cDNA hauptsächlich in den apikalen Hypokotylsegmenten detektiert werden konnten, während die differentiellen Peaks in den basalen Proben gleichzeitig auch apikal zu sehen waren (Tab. 3.1).

Daneben ist bei dem Vergleich der spezifischen PCR-Produkte zu sehen, dass die relative Änderung der Expressionsrate im apikalen Bereich bis zu Faktor 2 größer ist als im basalen Bereich wie z.B. die gravistimulierte Expression von Cytochrom c und eIF1 zeigt (Abb. 3.7, 3.11). Die spezifische Expressionsänderung von Ran nach Gravistimulation (Abb. 3.6) zeigt dagegen im basalen Hypokotylabschnitt (4-fach) einen stärkeren Anstieg als im apikalen Bereich (3-fach). Allerdings war hier die absolute Menge der mRNA-Expression in den unbehandelten Kontrollen der apikalen Hypokotyle um ein 3-faches höher als in den basalen Hypokotylen (Abb. 3.6), während bei Cytochrom c und eIF1 der mRNA-Gehalt in den apikalen und basalen Kontrollen gleich hoch war (Abb. 3.7, 3.11).

Nach Auxinstimulation der Protoplasten ist bei Cytochrom c ausschließlich in den apikalen Proben eine Expressionsänderung zu erkennen (Abb. 3.10), während bei eIF1 und Ran apikal

eine leicht stärkere und gleichzeitig gegenläufige Expressionsänderung zu den basalen Proben zu beobachten ist (Abb. 3.8, 3.9). In den Protoplasten ist die mRNA-Menge der unbehandelten Proben sowohl bei Ran als auch Cytochrom c und eIF1 im apikalen Hypokotylbereich mindestens doppelt so hoch wie im basalen Hypokotylbereich.

4 Diskussion

Eine differentielle Genaktivität stellt eine Antwort auf Umweltreize oder Veränderungen in der Entwicklung der Zelle dar und spielt eine große Rolle für die unterschiedlichsten physiologischen Zustände eines Organismus. Veränderungen auf Transkriptionsebene ermöglichen somit einen näheren Einblick in die Verknüpfung von Graviperzeption und den von Auxin-abhängigen oder auch -unabhängigen Signaltransduktionswegen. In dieser Arbeit sollten auf der Basis der Genexpressionsstudien aus Auxin- und gravistimulierten Pflanzenmaterial die Abhängigkeit gravitrop regulierter Gene von Auxin sowie die Rolle Auxin-induzierter Gene während der Gravistimulation untersucht werden.

Für die Untersuchungen wurden sowohl Protoplasten von Sonnenblumenhypokotylen als auch intakte Hypokotyle herangezogen. Da sich die Hypokotyle durch eine schnelle negativ gravitrope Krümmung nach einer Gravistimulation auszeichnen, die besonders stark im oberen Hypokotylbereich ausgeprägt ist, wurde in den jeweiligen Experimenten zwischen einem apikalen und einem basalen Abschnitt unterschieden. Hierdurch sollte eine detailliertere Bestimmung des gravi- und Auxin-sensitiven Gewebes ermöglicht werden.

Das Screening nach differentiell exprimierten Genen erfolgte mit Hilfe der sehr sensitiven Methode der DD-RT-PCR in Kombination mit der Analyse an einer Kapillarelektrophorese. Hierdurch gelang die Identifizierung von insgesamt acht verschiedenen Genen.

Die einzelnen Gene werden im Folgenden basierend auf ihrer Funktion in der gravitropen und Auxin-induzierten Signaltransduktion anhand der durchgeführten Expressionsstudien sowie anhand von Literaturdaten näher charakterisiert.

Daraufhin wird der Protoplast als Modellsystem vorgestellt sowie die Vergleichbarkeit von Protoplasten mit intakten Hypokotylen anhand der Ergebnisse diskutiert. Im Anschluss daran erfolgt ein Vergleich zwischen apikaler und basaler Genexpression in Hinblick auf die Sensitivität der Hypokotylabschnitte. Des Weiteren wird eine Betrachtung der Korrelation zwischen gravistimulierter und Auxin-stimulierter Genexpression vorgenommen sowie der Protoplast als Gravisensor und die Rolle der Integrine in der gravitropen Signalperzeption diskutiert. Schließlich werden die identifizierten Gene anhand eines Modells in die gravitrope Signaltransduktion eingeordnet.

4.1 Charakterisierung der identifizierten Gene

Die in dieser Arbeit durch Gravistimulation induzierten Gene, umfassten die GTPase Ran, eine Calcium-abhängige Proteinkinase mit einer Calmodulin-ähnlichen Domäne (CDPK), ein Histon H2B und Cytochrom c. Davon wurden Cytochrom c und Ran vollständig sequenziert und mit spezifischen Primern verifiziert.

Im Gegensatz dazu waren die nach Auxinbehandlung identifizierten Gene wie der Translations-Initiations-Faktor eIF1, die Histondeacetylase (HDAC), das Histon H3 sowie die Fruktose-1,6-bisphosphat Aldolase (FBPA) alle durch diese Stimulation supprimiert. Die beta-6-Xylosyltransferase wurde dagegen sowohl durch Auxinstimulation als auch durch Gravistimulation hochreguliert. Weitere durch Auxin hochregulierte Gene konnten nicht isoliert werden oder zeigten aufgrund des hohen Anteils der 3'-untranslatierten Region keine Homologie mit bekannten DNA-Sequenzen in den durchsuchten Genbanken. Hier konnte eIF1 vollständig sequenziert und mit spezifischen Primern verifiziert werden.

Die identifizierten Gene kodieren vorwiegend für bekannte Signaltransduktionskomponenten und Transkriptionsregulatoren. Die Calcium-abhängige Proteinkinase ist beispielsweise nach Aktivierung durch freigesetztes Calcium über die Phosphorylierung zahlreicher Proteine in sämtliche Signaltransduktionswege involviert. Während die Aldolase und das Cytochrom c durch Förderung der Glycolyse sowie der mitochondrialen ATP-Produktion allgemein in den Energiestoffwechsel der Zelle eingreifen, ist die Xylosyltransferase wahrscheinlich direkt am Aufbau der Zellwand während der Zellstreckung beteiligt. Die beiden Histone, die Histondeacetylase und der Translations-Initiations-Faktor können wiederum zu einer Gruppe von Genexpressions-Regulatoren zusammengefasst werden. Während Histone und Histondeacetylasen eine wichtige Rolle in der Transkription spielen, greift der Translations-Initiations-Faktor auf der Ebene der Translation regulatorisch in die Genexpression ein. Dabei stellt die Regulation der Genexpression die Grundlage vieler biologischer Prozesse in einer Zelle oder einem Organismus dar und steht meistens am Ende von Signalübertragungsketten. Die GTPase Ran übernimmt schließlich, neben ihrer Beteiligung an der Spindelbildung und am Aufbau der Kernhülle, durch die Kontrolle des Transports von Proteinen in und aus dem Kern eine wichtige regulative Rolle in der Signaltransduktion.

4.1.1 Calcium-abhängige Proteinkinase

Während ein Anstieg an Calcium-bindenden Proteinen wie Calmodulin und Calreticulin nach Gravistimulation schon früher identifiziert wurde (Sinclair und Trewavas, 1997; Heilmann et al., 2001), konnte in dieser Arbeit der gravitrop induzierte Anstieg einer Proteinkinase mit einer Calmodulin-ähnlichen Domäne festgestellt werden (Abb. 3.3 c). Dabei handelt es sich um Calcium-abhängige Proteinkinasen (CDPKs), die direkt durch cytosolisches Ca^{2+} aktiviert werden und in der umweltbedingten und hormonell induzierten Signaltransduktion vermutlich eine Rolle spielen (Harmon et al., 1987; Zhao et al., 1994). Diese Ca^{2+} -abhängigen, aber Calmodulin-unabhängigen Proteinkinasen gibt es nur in Pflanzen und einigen Protozoen. Dabei ist die erhaltene Calmodulin-Unabhängigkeit der CDPKs in Pflanzen auf die hohe Affinität der internen Ca^{2+} -Bindungsstellen zurückzuführen (Roberts und Harmon, 1992). Sie bestehen aus insgesamt vier Domänen: einer regulativen Calmodulin-ähnlichen Domäne, einer Junction- oder autoinhibitorischen Domäne, einer Kinase-Domäne und einer variablen Domäne, die vermutlich für die subzelluläre Lokalisierung und/oder die Substratspezifität verantwortlich ist (Harmon et al., 2000; Hrabak, 2000). Dabei kann eine Phosphorylierung sowohl eine Erhöhung als auch eine Senkung der enzymatischen Aktivität bedeuten, oder auch die Interaktion der Zielproteine mit anderen regulativen Proteinen verändern.

Da Auxin-induzierte Signalkaskaden von Veränderungen in der cytosolischen Calciumkonzentration begleitet sind, ist eine Involvierung von CDPKs in ihrer Funktion als Calcium-Sensor anzunehmen. Obwohl in dieser Arbeit die Expression von CDPK nach Auxinstimulation nicht untersucht wurde, ist eine Induktion sowohl der Aktivität von CDPKs als auch des mRNA-Levels nach verschiedenen Hormongaben wie Cytokinin, Abscisinsäure, Gibberellin und auch Auxin bereits nachgewiesen worden (Botella et al., 1996; Yoon et al., 1999). Eine erhöhte Expression von CPPKs wurde auch nach Auxin-induzierter somatischer Embryogenese in Alfalfa (*Medicago sativa*) beschrieben (Davletova et al., 2000). Auch nach unterschiedlichen Stressbedingungen wie mechanischer Belastung, Verwundung und Salzbehandlung konnte eine mRNA-Akkumulation von CDPKs festgestellt werden, was auf eine regulative Funktion in Stress-induzierten Signalkaskaden hinweist (Urao et al., 1994).

Daneben konnte in vielen Pflanzen die durch Auxin aktivierbare PM/H^+ -ATPase als potentiell Substrat für CDPKs demonstriert werden (Camoni et al., 1998; Lino et al., 1998; De Nisi et al., 1999). Auch in den Wurzeln von Mais wurde eine Phosphorylierung der C-terminalen autoregulativen Domäne der Protonenpumpe durch eine CDPK beschrieben,

wobei die Phosphorylierung wichtig für eine 14-3-3-Protein vermittelte Aktivierung war (Morsomme und Boutry, 2000). Wie die durch AtCPK1 induzierte Cl⁻-Aufnahme in die Wurzelvakuole von *Beta vulgaris* zeigte (Pei et al., 1996), spielen CDPKs ebenfalls eine Rolle in der Regulation der Vakuolen-ständigen H⁺-ATPase. Aufgrund der Aktivierung der H⁺-ATPasen scheint die gravitrop hochregulierte CDPK demnach wichtig für die gravitrop-sowie Auxin-induzierte Zellstreckung zu sein.

Als ein weiteres Substrat konnte die Plasmamembran-assoziierte NADPH-Oxidase nachgewiesen werden, indem die transgene Expression einer CDPK in Tomatenprotoplasten die Aktivität der NADPH-Oxidase steigern konnte (Xing et al., 2001). Auch die NADPH-Oxidase ist vermehrt in gravistimulierten Krümmungsorganen sowie in Auxin-behandelten Geweben zu beobachten. Dabei repräsentiert die NADPH-Oxidase ein Schlüsselenzym in der Vermittlung von oxidativem Stress durch die Bildung von Sauerstoffradikalen (Morré und Brightman, 1997) und wird sowohl durch interzelluläres Calcium als auch über den Phospholipase (PL)-Signalweg reguliert (Lee et al., 2003). Die gravitrop stimulierbare PLA2 fördert wiederum die Produktion von Lysophosphatidylcholin, welches Proteinkinasen der Plasmamembran aktiviert und daher möglicherweise als *second messenger* in die Auxin-induzierte Phosphorylierung von Membranproteinen involviert ist.

Neben der Lokalisierung an Membranen wurden CDPKs auch mit dem Cytoskelett assoziiert (Putman-Evans et al., 1989), was ihnen eine regulative Rolle und in der Cytoskelett-Dynamik zukommen lässt. So konnten Putman-Evans et al. (1989) in Pflanzenzellen eine Calcium-abhängige Proteinkinase zusammen mit F-Aktin des Cytoskeletts lokalisieren. Obwohl kein direkter Kontakt von CDPKs mit Aktin nachgewiesen werden konnte, wurde vermutet, dass die CDPK mit einem Aktin-bindenden Protein assoziiert und auf diese Weise in die Regulation des Cytoskeletts involviert ist. Auch in *Phaseolus vulgaris* L. Suspensionskulturen konnte eine Verbindung von CDPKs mit dem Cytoskelett hergestellt werden. Hier konnte gezeigt werden, dass die Phosphorylierung eines Aktin-depolymerisierenden Faktors (ADF) durch eine CDPK geschieht, was eine Auflösung der Aktinfilamente zur Folge hatte (Allwood et al., 2001). Dabei sind die Aktin-Filamente, vergleichbar mit den Mikrotubuli, durch einen dynamischen Auf- und Abbau-Prozess gekennzeichnet. Sie haben die Fähigkeit in G-Aktin Monomere zu zerfallen und gleichzeitig wiederum filamentäres F-Aktin zu bilden, was durch Aktin-bindende Proteine moduliert und im Gleichgewicht gehalten wird (Ayscough, 1998).

Durch die Interaktion der sedimentierenden Amyloplasten mit dem Cytoskelett spielt das Cytoskelett in der Wahrnehmung des Schwerkraftreizes eine bedeutende Rolle (Blancaflor

und Masson, 2003). Auch in *Chara*-Rhizoiden und -Protonemata konnte mittels Aktin-Hemmstoffen gezeigt werden, dass das gravitrope Spitzenwachstum stark von der Verteilung und Dynamik der Mikrotubuli und Aktinfilamente abhängig ist (Braun und Wasteneys, 1998). Hier konnte auch das Aktin-bindende Protein ADF im Zentrum des Spitzenkörpers von *Chara*-Rhizoiden (Wachstumszentrum an der Zellspitze) lokalisiert werden, was die bedeutende Rolle von Aktin in der Schwerkraftwahrnehmung sowie im schwerkraftorientierten, polarisiertem Wachstum der *Chara*-Rhizoide bestärkt (Braun et al., 2004).

Die gravitrop stimulierte Hochregulation der CDPK-Transkripte lässt somit vermuten, dass die identifizierte CDPK in Verbindung mit dem Aktin-Gerüst (durch die Phosphorylierung Aktin-bindender Proteine) in die gravitrope Reaktion involviert ist. Da die Aktine ebenfalls bei der Auxin-abhängigen Zellstreckung eine Rolle spielen (Waller et al., 2002), ist es möglich, dass CDPKs auch nach Auxinstimulation hochreguliert werden. Auch die Aktivierung der PM/H⁺-ATPase sowie der NADPH-Oxidase, die sowohl in die gravitrope als auch in die Auxin-induzierte Antwort involviert sind, deuten daraufhin, dass die Expression der CDPK während der gravitropen Antwort durch Auxin induziert wird.

4.1.2 Fruktose-1,6-bisphosphat-Aldolase

Die Expression einer cytosolischen Fruktose-1,6-bisphosphat-Aldolase (FBPA) wurde in dieser Arbeit in Abhängigkeit von Auxin differentiell herunterreguliert (Abb. 3.4 b). Dabei gibt es im pflanzlichen Organismus zwei Isozymformen von Aldolasen, die sich in ihrer zellulären Lokalisierung, Chloroplast und Cytosol, unterscheiden und somit entweder im Calvinzyklus oder in der Glycolyse aktiv sind. In den Chloroplasten spielt die FBPA eine Rolle bei der Regeneration des CO₂-Akzeptors Ribulose-1,5-bisphosphat. Die cytosolische FBPA katalysiert die reversible Spaltung des Glukoserings von Fruktose-1,6-bisphosphat in Dihydroxyacetonphosphat und Glycerinaldehyd-3-phosphat während der Glycolyse. Dabei kann sich ein Anstieg oder eine Aktivierung der FBPA durch eine Förderung der Glycolyse und der damit verbundenen ATP-Synthese positiv auf das Pflanzenwachstum auswirken. Die FBPA ist zudem physikalisch mit der Vakuolen-ständigen H⁺-ATPase (V-ATPase) assoziiert und kann diese durch direkte Interaktion aktivieren. Die V-ATPasen gehören zu einer Familie aus hoch konservierten Protonenpumpen, die die Hydrolyse von cytosolischem ATP mit dem Protonentransport aus dem Cytosol koppeln. Durch die physikalische Interaktion von Aldolase und V-ATPase ist der ATP-generierende glycolytische Signalweg direkt mit der ATP-hydrolysierenden Protonenpumpe verbunden. So kann die Interaktion zwischen der

Aldolase und der V-ATPase in Gegenwart von Glucose stark erhöht werden, indem die Aldolase als Glucose-Sensor die V-ATPase reguliert (Lu et al., 2004).

In diesem Zusammenhang beschreibt Konishi (2004) eine Expressionssteigerung einer FBPA in Abhängigkeit einer Calcium-abhängigen Proteinkinase (CDPK) in der Wurzel von Reis. Hier konnte nach einer Gibberellinsäure (GA)-Behandlung ein Anstieg in der FBPA-Expression festgestellt werden. In CDPK-*Antisense* Pflanzen war dagegen nach einer GA-Behandlung kein Anstieg an FBPA zu verzeichnen. Folglich scheint die FBPA durch CDPK moduliert zu werden, indem diese die V-ATPase aktiviert. Dabei kann man einen GA-induzierten Anstieg von FBPA hauptsächlich in der Apikalregion der Wurzel beobachten. Die FBPA ist dort in das Wachstum und die Gewebedifferenzierung mit einbezogen, indem sie die Energieproduktion fördert. Gleichzeitig baut die V-ATPase im Tonoplasten einen Protonengradienten auf, der die Aufnahme gelöster Stoffe in die Vakuole fördert. Die daraus resultierende Turgorsteigerung in den Wurzelzellen vermittelt somit den Anstieg in der Zellgröße und gleichzeitig die Produktion neuen Zellwand- und neuen Plasmamembran-Materials (Dolan und Davies, 2004).

Somit aktiviert die in dieser Arbeit identifizierte gravitrop hochregulierte CDPK während der gravitropen Krümmungsreaktion möglicherweise die für eine Zellexpansion wichtige V-ATPase. In dieser Hinsicht wäre eine gravitrop gesteigerte Expression der FBPA ebenfalls zu erwarten.

Die Auxinstimulations-Versuche in dieser Arbeit konnten allerdings eine Herunterregulierung der FBPA-Expression in apikalen und basalen Hypokotylprotoplasten zeigen. Dies könnte bedeuten, dass die Auxin-vermittelte Zellstreckung unabhängig von dem Aldolase-geförderten Umsatz in der Glykolyse ist. Deshalb ist es möglich, dass Auxin auf der einen Seite die Zellstreckung im Spross über die Aktivierung der Plasmamembran H^+ -ATPase fördert, während Gibberellin auf der anderen Seite die Zellstreckung zumindest in der Wurzel über den glykolytischen FBPA-Weg bewirkt. Beides wird aber möglicherweise durch eine CDPK-vermittelte Aktivierung der Protonenpumpen reguliert.

Die Expressions-Abnahme der FBPA nach Auxinapplikation bedeutet gleichzeitig, dass die Glycolyserate ebenfalls heruntergefahren wird, was möglicherweise auf einen niedrigeren Gehalt an Glucose zurückzuführen ist. Ein ähnliches Phänomen konnte in Zellen von *Nicotiana tabacum* beobachtet werden, die auf einem Hormon-freien Medium kultiviert wurden. Nach Zugabe von Auxin konnte hier eine sinkende Rate der Stärkesynthese festgestellt werden (Miyazawa et al., 1999). Ebenso wurde in Zellwanduntersuchungen von

etiolierten Haferkeimlingen gezeigt, dass nach Auxinbehandlung von 1 cm großen Koleoptilstücken, die vorher ebenfalls auf Glucose- und Auxin-freiem Medium gehalten wurden, das Zellwandgewicht abnahm, was aus einem sinkenden Gehalt an nicht Cellulose-Glucose resultierte (Loescher und Nevins, 1972).

4.1.3 Cytochrom c

In dieser Arbeit konnten ebenfalls Expressionsveränderungen von Cytochrom c identifiziert werden. Dabei zeigte sich sowohl eine gravitstimulierte (Abb. 3.3 b, 3.7) als auch eine Auxin-stimulierte Hochregulation (Abb. 3.10), obwohl die Expression nach Auxingabe erst nach 60 min leicht anstieg. Cytochrom c fungiert in den Mitochondrien als letztes Elektronentransportprotein in der Atmungskette. Es ist ein lösliches Protein, welches nur locker an die Außenseite der inneren Mitochondrienmembran assoziiert ist. Während der Atmungskette übernimmt Cytochrom c ein Elektron von Cytochrom b, was in der Rückführung von Fe^{II} in Fe^{III} resultiert. Der letzte Schritt besteht schließlich aus der Redoxreaktion zwischen dem reduzierten Cytochrom c und der Cytochrom-c-Oxidase (auch: Cytochrom a + a3). Das reduzierte Cytochrom a gibt dann die Elektronen an Sauerstoff ab, der sich dann umgehend mit freien Protonen zu Wasser verbindet.

Richter et al. (2003) konnten zeigen, dass die Cytochrom-c-Oxidase Reaktion durch die Kontrolle über die Bildung von Sauerstoffradikalen Auswirkungen auf den Gravitropismus hat. Sie berichteten von einer sowohl durch Starklicht, Salzstress und Schwermetall induzierten reversen Gravitaxis bei *Euglena gracilis*, die auf Sauerstoffradikale, welche unvermeidlich als Zwischenprodukt in der Cytochrom-c-Oxidase Reaktion entstehen, zurückzuführen war. Dabei war Wasserstoffperoxid auch in Abwesenheit von abiotischem Stress in der Lage eine Änderung der Gravitaxis hervorzurufen. Die Gravitaxis-Änderung wiederum konnte durch einen Cytochrom c-Oxidase-Hemmer verhindert werden, was zeigt, dass sie verantwortlich für die H_2O_2 -Bildung war.

In Joo et al. (2001) ist beschrieben, dass die gravitrope Krümmungsreaktion abhängig von der Bildung von Sauerstoffradikalen (ROS) ist und diese wiederum abhängig von der lateralen Verteilung von Auxin ist. Möglicherweise ist also die Cytochrom c-Oxidase-Reaktion in der schon in Joo et al (2001) dargelegten, gravitrop induzierten ROS-Produktion involviert. Dies würde bedeuten, dass Cytochrom c möglicherweise direkt an der Krümmungsreaktion beteiligt ist.

Auf der anderen Seite kann Cytochrom c selber als Radikalfänger dienen, indem es aus den Mitochondrien entlassen wird, und im Cytosol über den Weg der Atmungskette Elektronen von Superoxidanionen auf molekularen Sauerstoff übertragen kann (Atlante et al., 2000).

Aufgrund der Hämgruppen (Porphyrinringe), die die Cytochrome als Kofaktoren tragen, kann man die Cytochrome a, b und c nach ihren charakteristischen Lichtabsorptionsspektren unterscheiden. Da oxygeniertes Hämoglobin ein anderes Absorptionsspektrum als freies Hämoglobin hat, liefern die mitochondrialen Absorptionsspektren Informationen über den Redox-Status der Cytochrome.

In diesem Zusammenhang konnten bereits gravitrop induzierte Veränderungen von Cytochromen beobachtet werden. In Schmidt und Galland (2000) wurde nach Gravistimulation in Form von Kippen sowie Parabelflügen eine gravitrop induzierte Absorptionsänderung in Sporangiothoren von *Phycomyces* mit Hilfe eines rapid-scan Spektrophotometers gemessen. Aus dieser Absorptionsänderung konnten sie durch die Reduktion von oxidiertem Cytochrom einen Redoxwechsel ableiten. Diese Absorptionsänderungen wurden in der Wachstumszone 2 - 3 mm unterhalb des Sporangiums gemessen. Dabei induzierte eine μg - Stimulation einen Anstieg in der Absorptionsänderung, während hyperg -Bedingungen in der Zentrifuge sowie in der Parabel einen Rückgang der Absorptionsänderung herbeiführten (Schmidt und Galland, 2004). Dies zeigt deutlich, dass die Elektronentransportproteine sowohl durch Kippen als auch durch Mikrogravitations-Bedingungen direkt beeinflusst werden. Daraus kann man folgern, dass während einer Gravistimulation ein erhöhter Energiestoffwechsel in Form von mitochondrialer ATP-Produktion benötigt wird.

Aus Untersuchungen in tierischen Zellen ist auch bekannt, dass Cytochrom c während der Apoptose anstelle des gravitrop induzierbaren *second messengers* $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ mit einem $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ -Rezeptor wechselwirken kann. Hier konnte beobachtet werden, dass aufgrund eines hohen mitochondrialen Ca^{2+} -Gehaltes Cytochrom c aus den Mitochondrien entlassen wird und zum Endoplasmatischen Reticulum wandert. Dort bindet es an einen $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ -Rezeptor, woraufhin eine irreversible Calcium-Freisetzung aus dem Endoplasmatischen Reticulum ausgelöst wurde. Im Gegensatz zu einem $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ -vermittelten Ca^{2+} -Ausstrom, der durch den Gehalt an cytosolischen Calcium reguliert wird, indem die Freisetzung bis zu einem gewissen Level an freien Ca^{2+} ansteigt (ca. 5 μM) und dann gehemmt wird,

funktioniert dieses Gleichgewicht bei einer Cytochrom c-Bindung demnach nicht (Boehning et al., 2003).

Da die irreversible Ca-Freisetzung durch Cytochrom c allerdings eine Apoptose einleitet, ist nicht anzunehmen, dass der bekannte Anstieg an Ins(1,4,5)P₃ im Gravitropismus (Perera, 1999; Müller, 2000) mit Cytochrom c um die Ins(1,4,5)P₃-Rezeptor-Bindungsstellen konkurriert.

Im Allgemeinen ist die Transkription von Cytochrom c durch unterschiedliche Gewebetypen, Entwicklungsstufen sowie Umweltbedingungen, die einen wechselnden Bedarf an mitochondrialer ATP-Produktion im Zellstoffwechsel widerspiegeln, beeinflusst. Dabei zeigen Untersuchungen in *Helianthus annuus* L., dass die höchste Transkriptionsrate von Cytochrom c im Apikalmeristem und in den Gefäßbündeln der Wurzel sowie in den Blüten, also Geweben mit einer aktiveren mitochondrialen Biogenese, zu finden ist (Ribichich et al, 2001). Aufgrund des gesteigerten Streckungswachstums im apikalen Gewebe während der gravitropen Krümmung ist dort ein erhöhter Energiebedarf erforderlich. Dies korreliert mit den Ergebnissen in dieser Arbeit, da der gravitrope Anstieg der Expression im apikalen Gewebe deutlich höher war als basal (Abb. 3.7), und auch nach Auxin-Induktion nur apikal nach 60 min ein Anstieg in der Expressionsrate zu beobachten war (3.10).

Dabei hat die Auxin-stimulierte Expression von Cytochrom c nach 60 min vermutlich noch nicht ihr Maximum erreicht. Dennoch erfolgt der gravitrop regulierte Anstieg in der Expression schon früher, wodurch Auxin vermutlich keine Rolle, bzw. erst eine nachgeschaltete Rolle, in der gravitropen Cytochrom c-Expression spielt.

4.1.4 beta-6-Xylosyltransferase

Weiterhin konnte in dieser Arbeit eine beta-6-Xylosyltransferase identifiziert werden, die sowohl durch Gravistimulation als auch durch Auxinstimulation induzierbar war (Abb. 3.2 a, b). Da aber nur 364 Basenpaare sequenziert werden konnten, die nur einen kleinen Teil der codierenden 3'-Sequenz abdecken, ist es aufgrund der hohen Homologie unter den Sequenzen innerhalb einer Glycosyltransferase-Familie nicht auszuschließen, dass es sich auch um eine andere Glycosyltransferase handeln könnte (Ross et al., 2001). Dabei spielen pflanzliche Glycosyltransferasen in verschiedenen physiologischen Prozessen wie der Glycolipid- und der Polysaccharid-Synthese sowie in der Zellwandsynthese eine entscheidende Rolle.

Glycosyltransferasen sind beispielsweise an Biotransformationen von kleinen lipophilen Molekülen wie auch Auxin beteiligt, indem einzelne oder mehrere Glycosylierungen stattfinden können. Dabei kann eine Glycosylierung eine Inaktivierung von Auxin bewirken, indem das Hormon durch die Konjugation nicht mehr von einem Rezeptor erkannt wird. Daneben bestimmt die Glycosylierung auch die zelluläre Lokalisierung, indem sie Zugang zu Membran-gebundenen Transportern verschafft, was beispielsweise zu einer Akkumulation von Pflanzenhormonen in der Vakuole führt.

Zu den Hormon-Glycosyltransferasen zählt zum einen die Auxin-induzierbare Glycosyltransferase Zeatin-O-Xylosyltransferase, die das Cytokinin Zeatin in O-Xylosylzeatin umwandelt und somit ebenfalls inaktiviert. In Martin et al. (2001) konnte die Aktivität dieser Zeatin-O-Xylosyltransferase aus *Phaseolus vulgaris* in Tabak-Kallus durch Auxin stimuliert werden, was zu einer Reduktion von Zeatin führte, einer gehemmten Wurzelzellstreckung und einem generell reduzierten Wachstum und schließlich in Seneszenz resultierte. Da in dieser Arbeit die Glycosyltransferase sowohl während der gravitropen Krümmung als auch nach Auxinstimulation induziert wurde, ist aber nicht davon auszugehen, dass es sich hierbei um eine Zeatin-O-Xylosyltransferase handelt, welche eine Hemmung der Krümmung verursachen würde.

Zum anderen konnte in Jackson et al. (2001) eine UDP-Glycosyltransferase identifiziert werden, die eine hohe Aktivität gegenüber IAA zeigte. Durch Überexprimierung der Hormon-Glycosyltransferase in *Arabidopsis* wurde ein Phänotyp beobachtet, der einem Mangel an Auxin glich und in einem defekten Gravitropismus resultierte. Nach Gabe eines Auxinanalogs, welches nicht durch UGT84B1 glycosyliert wird, konnte der Verlust des Gravitropismus in den transgenen Wurzeln wieder aufgehoben werden. Während IAA-Glucose-Ester in den transgenen Pflanzen akkumulierten, erhöhte sich aber auch der Gehalt an freiem IAA, was auf eine natürliche Regulation der freien Hormonkonzentration hinweist (Jackson et al., 2002). Möglicherweise ist dieser Regelmechanismus wichtig in der Auxin-induzierten Signaltransduktion, so dass Auxin während der gravitropen Krümmungsreaktion parallel zur Auxinquerverteilung nach Initiierung einer Signalkaskade sofort wieder in einen inaktiven Zustand überführt wird.

Beta-6-Xylosyltransferasen (auch alpha-Xylosyltransferasen) sind wiederum in die Synthese von Xyloglucan in Dikotylen und Nicht-Graminaceen involviert, welche dort ca. 20 % der gesamten Matrix-Polysaccharide in der primären Zellwand ausmachen. Als ein Polysaccharid, das Wasserstoff an Zellulose-Mikrofibrillen bindet, stellt es somit die Hauptstruktur-

Komponente der Zellwand dar, und dient als Verbindung zwischen Zellulose und anderen Matrixpolysacchariden (Hayashi und Matsuda, 1981). Da Glycosyltransferasen hochspezifisch sind, sind wahrscheinlich mindestens zwei oder drei verschiedene Xylosyltransferasen an der Xyloglucan-Biosynthese beteiligt (Faik et al., 2002).

Die in dieser Arbeit identifizierte Xylosyltransferase ist somit sehr wahrscheinlich am Aufbau der Zellwand beteiligt. Da die Induktion sowohl nach Gravistimulation als auch nach Auxinstimulation beobachtet werden konnte, ist die erhöhte Expressionsrate der Xylosyltransferase vermutlich auf die durch Auxin induzierte Krümmung und das damit verbundene Zellwachstum auf der unteren Flanke des Hypokotyls zurückzuführen. Möglicherweise bewirkt die Auxininduktion in den Protoplasten den Beginn der Zellwandregeneration. Auch nach einer Auxinbehandlung von Epikotylen aus *Pisum sativum* konnte ein gesteigerter Xyloglucan- und Zellulosegehalt festgestellt werden (Tominaga et al., 1985).

Die Bedeutung eines regulierten Um- und Aufbaus der Zellwand im Gravitropismus wurde auch schon in Kimbrough et al. (2004) gezeigt. Hier wurde eine gravistimulierbare Xyloglucan-Endotransglycosylase (Meri5B) erwähnt, die in die Zellwandauflockerung involviert ist. Zudem konnte während der gravitropen Krümmung eine durch Gibberellin differentiell induzierte Xyloglucan-Endotransglycosylase in der Stärkescheide von Reis entdeckt werden (Cui et al., 2005). Dabei korrelierte die gesteigerte Expression indirekt mit der asymmetrischen Verteilung von Auxin, die wiederum eine asymmetrische Expression eines in die GA-Synthese involvierten Gens induzierte, wodurch schließlich ein Gibberellingradient ausgelöst wurde.

4.1.5 Histone

In dieser Arbeit konnte eine hochregulierte Expression von Histon H2B infolge der Gravistimulation gezeigt werden (Abb. 3.3 a), während für H3 eine Herunterregulation durch Auxinstimulation festgestellt werden konnte (Abb. 3.4 a).

Aufgrund ihrer Funktion in der Organisation der Chromosomenstruktur wirken die Histone bei nahezu allen chromosomalen Prozessen wie der Genexpression, der Chromosomenkondensation, der Rekombination und der Replikation mit. Mit Hilfe der Histone wird die genomische DNA in Nukleosomen verpackt, wodurch die DNA sehr stark komprimiert werden kann. Insgesamt gibt es fünf Typen von Histonen - H1, H2A, H2B, H3 und H4. Dabei bilden je zwei Moleküle von H2A, H2B, H3 und H4 den Nukleosomenkern,

um den sich die DNA in ca. zwei großen linksgängigen Windungen legen kann. Das fünfte zum Nucleosom gehörige Histon H1 dient als Brücke zwischen den einzelnen Nucleosomenkernen und kann durch eine übergeordnete Spiralisierung die DNA-Verpackung noch weiter verstärken (Luger et al., 1997). Da die Bindung der DNA an die Histone eine Transkription verhindert, muss für diesen Vorgang die DNA von den Histonen gelöst werden. Daher ragen aus der Nucleosomenstruktur die N-Termini der Histone heraus, die an verschiedenen Aminosäurepositionen modifiziert werden können und somit den Verpackungsgrad und damit die Zugänglichkeit der DNA regulieren. Zu den genannten Modifikationen zählen Acetylierung, Methylierung und Phosphorylierung (Tariq und Paszkowski, 2004; Peterson und Laniel, 2004).

Eine gravitrop hochregulierte Expression von Histon H2B konnte bereits in den Wurzelspitzen von *Arabidopsis*-Pflanzen festgestellt werden, die in dem gleichen Zeitrahmen von 60 min gravitrop stimuliert wurden (Kimbrough et al., 2004). Hier waren von den differentiell exprimierten Genen allein 15 % in die transkriptionale Regulation involviert. Dazu gehörten sowohl Aktivatoren als auch Repressoren der Transkription wie Transkriptionsfaktoren, RNA-Polymerasen und Histone. Während die Histone H1, die Histon-Variante H3.2 und H2B wie in dieser Arbeit (Abb. 3.3 a) eine gravitrop induzierte Hochregulation in ihrer Expression zeigten, waren neben den Histonen H3 und H2A auch die meisten der Gene, die an der Chromatin-Organisation und Modifikation beteiligt sind, herunterreguliert.

Obwohl eine Gravistimulation von Histon H3 in dieser Arbeit nicht untersucht wurde, ist aufgrund der Übereinstimmung bei Histon H2B zu erwarten, dass die Expression von Histon H3 wie in Kimbrough et al. (2004) ebenfalls durch Gravistimulation supprimiert wird. Allerdings konnte das in dieser Arbeit identifizierte Histon H3 nicht komplett sequenziert werden. Daher kann es sich durchaus auch um die gravitrop hochregulierte Variante Histon H3.2 handeln, da die differierenden Aminosäuren weiter in der 5'-Region zu finden sind. Histon-Varianten gibt es, außer für das hoch-konservierte Histon H4, für jeden Histon-Subtyp. Diese besitzen nur eine leicht veränderte Proteinsequenz und werden statt der normalen Histonproteine in den Histon-Kern-Komplex eingebaut (Brown, 2001). Die unterschiedliche Induzierbarkeit der einzelnen Histonsubtypen und Histonvarianten zeigt in jedem Fall, dass die Histone sehr spezifisch in die Regulation der Genexpression und damit auch in die gravitrope Signaltransduktion eingreifen und auch selber davon betroffen sind,

obwohl sie zum Beispiel in den Mikroarraystudien von Moseyko et al. (2002) als konstitutiv exprimierte, so genannte „house keeping“ Gene, eingesetzt werden.

Nach Auxinstimulation konnte in dieser Arbeit eine Supprimierung von Histon H3 sowohl apikal als auch basal festgestellt werden (Abb. 3.4 a). Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen stellte Iwabuchi et al. (1994) eine durch Auxin induzierbare Expression von Histon H3 in sich aktiv teilenden Zellen in der Wurzel aus Weizen fest. Diese Induktion ist mit der mitogenen Wirkung von Auxin zu erklären, wodurch Gene wie die Histone, die hauptsächlich während der G1/S-Phase des Zellzyklus exprimiert werden, möglicherweise durch Auxin reguliert werden. Histon H3 wird während der S-Phase im Zellzyklus sogar so spezifisch hochreguliert, dass es als Markergen für die Initiation der Zellteilung herangezogen wird (Dirks und Raap, 1995).

Die in dieser Arbeit verwendeten Hypokotylprotoplasten befanden sich allerdings trotz Auxinstimulation noch nicht in der Replikationsphase, da Protoplasten erst nach vollendeter Zellwandregeneration, frühestens nach 24-48 Stunden in die Zellteilungsphase gehen. Aus den Untersuchungen von Kalra und Bhatla (1999) an Protoplasten von Hypokotylsegmenten aus *Helianthus annuus* L. geht hervor, dass zwar eine IAA Konzentration von 10^{-5} M eine Zellteilung innerhalb von 24 h induzieren konnte, allerdings schon eine IAA Konzentration von $2 \cdot 10^{-6}$ M für eine Induktion zur Zellteilung ineffektiv blieb. Zudem konnte ab einer Zellsuspensionsdichte von $25 \cdot 10^4$ /ml (Platte) keine Zellteilung mehr induziert werden. Daher war in dieser Arbeit aufgrund der niedrigen IAA Konzentration von 10^{-7} M als auch durch die hohe Zelldichte von $2 \cdot 10^6$ /ml keine Auxin-induzierte Zellteilung und damit auch keine gesteigerte Histon H3-Expressionsrate zu erwarten.

Auch durch Kälte- und Trockenstress wird die Expression von H3 im wachsenden Gewebe wie der Sprossspitze herunterreguliert, während sich gleichzeitig der Gehalt an Abscisinsäure (ABA) erhöht (Horvath et al., 2002). Dabei agiert ABA als Antagonist zu Gibberellinsäure und induziert einen Zellzyklusinhibitor, der die Zellteilung unterdrückt und damit gleichzeitig die Expression von H3 hemmt. Möglicherweise wird also die Expression von H3 in den Auxin-behandelten Protoplasten auch durch einen Inhibitor gehemmt.

Weiterhin konnte eine Herunterregulation in der Expression von Histon H2B und Histon H3 auch in geerntetem Spargel *Asparagus officinalis* L. beobachten werden. Dies war entweder auf eine beendete Zellteilung oder auf erntebedingte Änderungen an löslichen Zuckern zu

zurückzuführen (Davies et al., 1996). In Zellsuspensionskulturen konnte die Expression von Histon H2B und H3 dementsprechend nach Zugabe von Zucker erhöht werden. Wie auch aufgrund der reduzierten Expression der Fruktose-1,6-bisphosphat Aldolase vermutet wurde (Kap. 4.2.2), ändern sich nach Auxingabe die Glucoseverhältnisse in der Protoplastensuspension, so dass dies möglicherweise auch hier Einfluss auf die Expressionsrate von Histon H3 hatte.

4.1.6 Histondeacetylase

Weiterhin konnte in dieser Arbeit die Herunterregulation einer Histondeacetylase (HDAC) nach Auxinbehandlung der Protoplasten festgestellt werden (Abb. 3.5 c). HDACs haben die Aufgabe, Chromatin wieder in den kondensierten Zustand zurückzubringen und spielen dabei eine wichtige Rolle in der transkriptionalen Repression (Kuo und Allis, 1998). In den Nukleosomen von straff spiralisiertem Chromatin, interagieren die positiv geladenen Lysinreste am N'-terminalen Ende der Kern-Histone mit der negativ geladenen DNA und anderen chromosomalen Proteinen und behindern so die Erreichbarkeit des Promotors für die Transkriptionsmaschinerie. Dabei werden die Histondeacetylasen von spezifischen Transkriptionsfaktoren an die jeweils zu regulierenden Gene gebracht.

Eine möglicherweise ebenfalls durch Auxin herunterregulierte Expression einer Histondeacetylase ist in Devoto et al. (2002) beschrieben. Hier konnte in Pflanzen eine Verbindung von HDAC mit einer E3 Ubiquitinligase hergestellt werden, die die Ubiquitinierung, und damit den proteolytischen Abbau von Zielproteinen steuert. In dieser Studie stellte die HDAC einen Repressor des Jasmonat-abhängigen Wurzelhaarwachstums dar und war gleichzeitig Zielprotein einer E3 Ubiquitin Ligase. Da der Jasmonatweg selber wiederum durch die Auxin-induzierbare PLA2 katalysiert wird, reguliert Auxin möglicherweise die Expression Jasmonat-abhängiger Gene durch die gezielte Ubiquitinierung einer HDAC.

Auch Gao et al. (2004) konnten die Interaktion einer HDAC aus *Arabidopsis* mit einer konservierten VHIID-Domäne des Auxin-induzierbaren Transkriptions-Aktivators BnSCL1 beobachten. Weiterhin scheint auch die Histondeacetylase HDA6 in *Arabidopsis* als Repressor-Protein von Auxin-responsive Genen zu agieren (Murfett et al., 2001). Hier konnte eine Mutation in einer HDAC identifiziert werden, die in einer veränderten Expression der Auxin-induzierbaren Transgene resultierte.

Damit scheint die Histondeacetylase als Repressor in die Auxin-induzierbare Aktivierung bestimmter Transkripte involviert zu sein. Dies zeigt außerdem, dass sich wiederholende Sequenzen wie die „AuxRE repeats“ innerhalb des Promotors von Auxin-induzierbaren Genen geeignete Zielsequenzen für eine Geninaktivierung durch Histondeacetylasen darstellen (Matzke et al., 2000). Vergleicht man also die Histondeacetylasen mit den Aux/IAA-Proteinen, die ebenfalls als Repressoren von Auxin-induzierbaren Genen fungieren, induziert ein erhöhter Auxingehalt möglicherweise den Abbau von Histondeacetylasen, indem Auxin an den Auxinrezeptor TIR1 bindet und so den SCF^{TIR1} E3 Ubiquitin-Ligase Komplex stimuliert (Tiwari et al., 2001; Napier, 2005).

Die Regulation der Transkription erfolgt allerdings nicht nur über den Abbau von HDACs, sondern auch über den gezielten Transport der HDACs in und aus dem Kern. Hier stellt sich eine Verbindung zu dem in dieser Arbeit identifizierten gravitrop hochregulierten Protein Ran dar, dessen Hauptfunktion in der Kontrolle des Transports von Proteinen in und aus dem Kern liegt (Kap. 4.2.8). Vermutlich werden alle HDACs, die in den Kern transportiert werden müssen, kovalent an das Ubiquitin-ähnliche Protein SUMO-1 gebunden, was im Gegensatz zu einer Ubiquitinierung keine Proteindegradation zur Folge hat, sondern unter anderem eine subzelluläre Kompartimentalisierung vermittelt. Diese SUMO-1 Modifikation ist von einem intakten NLS (nukleäres Lokalisations Signal) abhängig und wird durch das Ran-bindende Protein RanBP2 katalysiert, welches als SUMO E3 Ligase identifiziert werden konnte (Pichler et al., 2002). Auf der anderen Seite kann im Kern die Bindung eines 14-3-3-Proteins an die phosphorylierten Serinresten einer HDAC eine bestehende Interaktion mit einem Transkriptionsfaktor wieder unterbrechen und infolge zum Export der HDAC führen (McKinsey et al., 2000; Wang und Yang, 2001). Dabei wird der Export aus dem Kern durch eine Calcium/Calmodulin-abhängige Proteinkinase und somit in Abhängigkeit von der Calciumkonzentration signalisiert (Xing et al., 2000; Kirsh et al., 2002).

Da die HDAC in dieser Arbeit nicht in gravitrimulierter cDNA untersucht wurde, ist eine direkte Aussage über den Expressionsverlauf während der gravitropen Antwort nicht möglich. In ihrer Repressorfunktion wird sie aber vermutlich durch die Induktion von Auxin während der gravitropen Krümmungsreaktion abgebaut. Während die gravitrop hochregulierte GTPase Ran in Interaktion mit RanBP2 offensichtlich am Transport von HDACs in den Kern beteiligt ist, führt der gravitrope Anstieg der Ca²⁺-Konzentration im Kern womöglich dazu, dass die Histondeacetylase nach Phosphorylierung ihre Repressorfunktion verliert und aus dem Kern transportiert werden.

Neben dem Histonmetabolismus und der Gentranskription regulieren Histondeacetylasen weitere wichtige biologische Prozesse wie die Deacetylierung von Mikrotubuli (Matsuyama et al., 2002). Tubuline besitzen wie die Histone Schwanzdomänen, die außerhalb des Polymers liegen und Gegenstand einer ganzen Reihe kovalenter Modifikationen sind. Indem α -Tubulin als Substrat von einer HDAC identifiziert werden konnte, wurde gefolgert, dass die Histondeacetylase die dynamische Instabilität der Mikrotubuli durch die reversible Acetylierung von α -Tubulin kontrolliert. Da das Cytoskelett sowie der dynamische Auf- und Abbau der Mikrotubuli in die gravitrope Signalwahrnehmung bzw. -weiterleitung involviert ist (Volkmann et al., 1999; Braun et al., 2002), spielt die Deacetylierung der Mikrotubuli vielleicht ebenfalls eine wichtige Rolle in der gravitropen Antwort.

4.1.7 Translations-Initiations-Faktor eIF1

In dieser Arbeit konnte eine deutliche Hochregulation des Translations-Initiations-Faktors eIF1 nach Gravistimulation gezeigt werden (Abb. 3.11), während die Expression durch die Behandlung der Protoplasten mit Auxin basal leicht hochreguliert und gleichzeitig apikal herunterreguliert wurde (Abb. 3.5 a, 3.8). Veränderungen der Transkriptionsrate beispielsweise durch Histone oder Histondeacetylasen beeinflussen die Proteinsyntheserate erst mit einer gewissen Latenz. Unter bestimmten Umständen wie unter veränderten physiologischen Bedingungen oder Stressstimuli ist jedoch eine schnellere Steigerung der Proteinsynthese notwendig. An diesen Stellen greifen translationale Regulationsmechanismen an, indem die Initiations-, Elongations- und Terminationsraten in den Ribosomen kontrolliert werden (Bailey-Serres, 1999). Dabei steht die Translations-Initiation am Anfang eines biologischen Prozesses und erlaubt eine sofortige und schnelle Antwort durch selektive Veränderungen auf dem Proteinlevel (Holcik und Sonenberg, 2005). Auch nach einer Gravistimulation wird die Translation der meisten Transkripte unterdrückt, während gleichzeitig spezifische Transkripte selektiv in die Polysome rekrutiert werden (Bailey-Serres, 1999).

Bei der Initiation der Translation spielen die Faktoren eIF1 und eIF1A für das „Scanning“, bei dem der 48S-Initiationskomplex die mRNA abtastet, um das Initiator-AUG zu erreichen, eine wichtige Rolle (Lawson et al., 1989). Beide Faktoren fördern synergistisch die Bindung der 48S-Komplexe am Initiator-AUG, während der Translations-Initiations-Faktor eIF1 dafür verantwortlich ist, Fehlpaarbindungen am Initiationscodon zu erkennen und die Dissoziation anormaler Ribosom-mRNA-Komplexe zu katalysieren (Yoon und Donahue, 1992; Cui et al., 1998).

Zwar ist in der Literatur keine direkte Induktion von eIF1 durch Auxin beschrieben, in Reispflanzen konnte aber ein durch Auxin hochregulierter Translations-Initiations-Faktor eIF3a isoliert werden (Li et al., 2003). Ebenso stimuliert Auxin die Phosphorylierung des S6 ribosomalen Proteins in der 40S ribosomalen Untereinheit in Mais-Ribosomen, begleitet von der Rekrutierung spezifischer mRNAs wie dem S6 ribosomalen Protein und dem Translations-Initiations-Faktor eIF-iso4E in die Polysome (Beltran-Pena et al., 2002). Daher legt die Induktion spezifischer Translations-Initiations-Faktoren durch Auxin nahe, dass die Funktion von Auxin im Wachstum die Regulation des Translationslevels mit einschließt. Möglicherweise ist die Induzierbarkeit der einzelnen Initiationsfaktoren durch Auxin aber ebenso sehr spezifisch wie die selektive Stimulierbarkeit der einzelnen Histonsubtypen in Kimbrough et al. (2004), so dass die basale Expression von eIF1 eine leichte Hochregulation und die apikale Expression eine Herunterregulation zeigte.

In *Porteresia coarctata* konnte eine Erhöhung an eIF1-Transkripten durch diverse Stresstimulationen beobachtet werden wie z.B. nach einer hohen Salzapplikation (150 mM NaCl) sowie nach ABA- und Mannit-Behandlung (Latha et al., 2004). Hierbei war die Induktion wahrscheinlich auf ein Wasserdefizit infolge des Salzes zurückzuführen. eIF1 wurde bereits vorher von Neale et al. (2000) als Trockenstress-induzierbares Protein in *Sporobolus stapfianus* beschrieben. Daher wurde postuliert, dass der Expressionslevel von eIF1 als ein Indikator für Stress-Reaktions-Mechanismen herangezogen werden könnte. Da eine Gravistimulation im Sinne von Umorientierung wahrscheinlich auch Stress für die Pflanzen bedeutet, ist die gravitrope Hochregulation mit diesen Ergebnissen zu vergleichen.

Nach Sheikh et al. (1999) wird der Translationsfaktor eIF1 auch durch genotoxischen Stress sowie durch Stress des Endoplasmatischen Retikulums hochreguliert. Hier konnte eine eIF1 mRNA-Akkumulation festgestellt werden, die durch die Entleerung der Ca^{2+} -Vorräte des ERs ausgelöst wurde. Aufgrund der kurzfristig auftretenden Calciumwellen im Cytosol während der gravitropen Antwort, die auf die Aktivierung von mechanosensitiven Kanälen sowie das $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ -vermittelte Öffnen von Ca^{2+} -Kanälen auch im ER (Martinec et al., 2000) zurückzuführen sind, ist eine daraufhin gravitrop induzierte eIF1-Expression zu erklären.

Auch ROS (reactive oxygen species) können in höheren Konzentrationen sowohl genotoxischen Stress als auch ER-Stress auslösen, indem ER-Proteine angegriffen und

modifiziert werden. In diesem Zusammenhang konnte Rao (2000) die Aktivierung des Translations-Initiations-Faktors eIF4E zeigen, indem durch hohe Konzentrationen an H₂O₂ die Ca²⁺- und Ca²⁺/Calmodulin-abhängige Phosphorylierung des Translations-Initiations-Faktor eIF4E induziert wurde und somit zur Verstärkung der Translationsinitierung führte. Daher ist zu vermuten, dass eIF1 ebenfalls durch ROS induziert werden kann.

Wie bereits erwähnt (4.1.3), konnte Joo et al. (2001) während der gravitropen Antwort einen Anstieg von intrazellulärem ROS in der unteren Flanke der Wurzelendodermis in Mais beobachten. Hier stellen Sauerstoffradikale eine nachgeschaltete Komponente im Auxin-vermittelten Signaltransduktionsweg dar und sind notwendig für die Krümmungsreaktion (Joo et al., 2001). Die gravitrop induzierte Hochregulation von eIF1 könnte somit auch auf den gravitrop stimulierten Anstieg von ROS zurückzuführen sein.

Allerdings handelt sich bei der Auxin-vermittelten Bildung von ROS wahrscheinlich nicht um Stress-auslösende Konzentrationen, da Sauerstoffradikale nur in niedrigen Konzentrationen den Ablauf des Zellzyklus fördern (Reichheld et al., 1999) und beispielsweise auch die Differenzierung der sekundären Zellwand initiieren können (Potikha et al., 1999). Ebenso wäre die Auxin-abhängige Bildung von ROS widersprüchlich zu der negativen Korrelation zwischen der gravitropen und der Auxin-induzierten Expression von eIF1.

4.1.8 Ran

Schließlich konnte in dieser Arbeit die gravitrope Hochregulation von Ran festgestellt werden (Abb. 3.6). Nach Auxinbehandlung wurde die Expression von Ran dagegen nur minimal reguliert (Abb. 3.9). Hier zeigte sich basal eine leichte Hochregulierung, während apikal eine leichte Herunterregulierung zu erkennen war. Dies lässt vermuten, dass Auxin während der Gravistimulation keinen Effekt auf die Ran-Expression ausübt.

Bei Ran handelt es sich um eine kleine GTPase, die durch Ran-bindende Proteine reguliert wird. Dazu gehören der Guanidin Nukleotid Austausch Faktor RCC1, das GTPase-aktivierende Protein RanGAP, Nukleoporine und andere Ran-bindende Proteine, die spezifisch für RanGTP sind (Merkle et al., 1994). Zu den Funktionen der RanGTPase gehört neben der Kontrolle der mitotischen Spindelformation und des Aufbaus der Kernhülle, die Regulation des nukleo-cytoplasmatischen Transports (Merkle, 2001, 2003; Harel und Forbes, 2004).

Da es während der gravitropen Krümmungsreaktion der etiolierten Sonnenblumenhypokotyle sehr wahrscheinlich keine Zellteilungsaktivität gibt, wird im Folgenden nur auf die Funktion

des Transports von Proteinen eingegangen. Durch die Veränderung der subzellulären Verteilung von Transkriptionsregulatoren übernimmt Ran eine wichtige Funktion in der Kontrolle der Genexpression. Dabei werden Substrate, die ein Erkennungssignal (NLS-nukleäres Lokalisations-Signal) für den Import in den Zellkern tragen, von einem cytoplasmatischen Rezeptorprotein der Importin β Familie erkannt. Diese Bindung wird durch ein Adaptor-Protein, dem Importin α vermittelt, woraufhin der Importin- α/β -Substrat-Komplex zu den Kernporen wandert. Mit Hilfe der GTPase Ran, die durch die Hydrolyse von Guanosintriphosphat (GTP) die notwendige Energie bereitstellt (Moore und Blobel, 1993; Melchior et al., 1993) und einem Protein namens NTF2 (nuclear transport factor 2), das als Katalysator für die GTP-Hydrolyse wirkt, gelangt der Komplex schließlich in den Kern (Moore und Blobel, 1994; Paschal und Gerace, 1995). Während die Bindung von RanGTP an Importin β im Kern die Abgabe des Import-Substrats ermöglicht, wird eine Bindung von RanGTP an Exportin für ein effizientes Beladen der Exportfracht benötigt.

In Merkle (2001, 2003) ist eine Beteiligung von Ran an mehreren Signaltransduktionsketten, die Phototropismus, Kälte- und Trockenstress- sowie Phytohormon-Signalwege mit einschließen, beschrieben. Dabei gehört der Transport von Proteinen vom Kern ins Cytosol und zurück zu den wichtigsten Kontrollmechanismen für die Regulation von Signalketten in Pflanzen. Die gravitrope Hochregulation der Ran-Expression spricht daher dafür, dass Ran sehr wahrscheinlich auch im Gravitropismus durch die Regulation diverser Ran-bindenden Proteine eine multifunktionelle Rolle im Transport von spezifischen Signalmolekülen und Transkriptionsregulatoren übernimmt.

Auch der durch Ran spezifisch geregelte Transport von einigen in dieser Arbeit identifizierten Genen ist bekannt. Dazu gehören neben den Histondeacetylasen (4.1.6) auch die Histone, die wie alle Proteine an Ribosomen im Cytoplasma synthetisiert werden und danach zur Erfüllung ihrer Funktion in den Kern transportiert werden müssen. Obwohl Histone so klein sind, dass sie auch durch Diffusion in den Kern gelangen könnten, besitzen sie ein NLS und werden über den Rezeptor-vermittelten Weg in den Kern gebracht. Dabei ist die Erkennung der Histone durch die Importine von ihrer Acetylierung abhängig. Eine Acetylierung der N-terminalen Histon-Schwanz-Domäne inhibiert nämlich wahrscheinlich den nukleären Transport der Core-Histone, indem das NLS maskiert wird, wodurch unnötige Signaltransduktionswege vermieden werden können (Baake et al., 2001).

Möglicherweise gibt es einen engen Zusammenhang zwischen der gravitropen Hochregulation von Ran und dem Histon H2B, da die Bindung von RCC1 mit den Histonen H2A und H2B die katalytische Aktivität von RCC1 stimuliert. Aus diesem Grund wurde vermutet, dass durch die Kopplung von RCC1 mit H2A/H2B die Polarität des Ran-GTP Gradienten aufgebaut wird, die den nukleo-cytoplasmatischen Transport und die anderen nukleären Prozesse antreibt (Nemergut et al., 2001).

Außerdem ist die Regulation des Ran-GDP/Ran-GTP-Zyklus in die Regulation der Auxinsensitivität involviert, indem Auxin-Suppressoren mit Hilfe des Importin-abhängigen Mechanismus in den Kern hinein gebracht werden (Kim et al., 2001). Hier wurde die *Antisense*-Expression des Ran-bindenden Proteins RanBP1 untersucht. RanBP1 ist ein lösliches Protein, welches RanGTP bindet und das Ran-GTPase-aktivierende Protein RanGAP1, welches Ran-GTP im Cytoplasma auf einem niedrigen Level hält, stimuliert. Dabei konnte gezeigt werden, dass durch die *Antisense*-Expression von RanBP1 das Verhältnis von GTP zu GDP im Cytoplasma so stark anstieg, dass der Transport von Substraten in den Kern eingeschränkt war und sich in einer Hypersensitivität gegenüber Auxin äußerte. Zu diesen Suppressoren, die die Auxin-induzierbaren Gene blockieren, gehören die Mitglieder der Aux/IAA-Genfamilie, denen sowohl eine suppressive als auch eine induktive Funktion in Bezug auf Auxin zugesprochen wird (Ulmasov et al., 1999). Ihre Aktivität wird nach Auxin-Stimulation durch Ubiquitinierung wieder aufgehoben (siehe Einleitung). Die Beteiligung von Ran an der Repression Auxin-induzierbarer Gene könnte eine Erklärung dafür sein, dass Ran in Gegenwart eines hohen Auxin-Levels herunterreguliert wird.

Daneben übernimmt Ran möglicherweise auch eine Rolle in dem cytoplasmatischen Transport entlang der Mikrotubuli. Neben vielen Viren (Campbell und Hope, 2003) ist auch von einigen Proteinen wie dem kleinen Parathormon-verwandten Protein PTHrP (Lam et al., 2002) und dem Tumor-Suppressor Protein p53 (Giannakakou et al., 2000) bekannt, dass sie einen Mikrotubuli-organisierten Transport auf ihrem Weg in den Kern nutzen.

In Keryer et al. (2003) konnte Ran in diesem Zusammenhang in der Spitzendomäne polarisierter Stützzellen des Innenohrs lokalisiert werden, in der die Mikrotubuli verankert sind, ebenso wie an den Enden Taxol-stabilisierter Mikrotubuli. Die Lokalisierung von Ran in den Stützzellen des Innenohrs ist auch in der Hinsicht interessant, dass sich im Innenohr Otolithen zur Wahrnehmung der Schwerkraft befinden, ähnlich den Statolithen der Pflanzen.

Hier sind die Maculazellen, die eigentlichen Schwerkraftsensoren, in die Stützzellen eingebettet, auf denen die Otolithen aufliegen (Anken und Rahmann, 1998). Darüber hinaus konnte in Tabakprotoplasten durch Immunfärbung des Ran-bindenden Proteins Importin α in einer cytoskelettartigen Struktur vom Kern bis zur Plasmamembran lokalisiert werden (Smith et al., 1997). Dabei wurde festgestellt, dass Importin α über das NLS mit den Mikrotubuli und den Mikrofilamenten assoziiert ist (Smith and Raikhel, 1998). Auch die bedeutende Rolle von Ran in der Spindelformation, durch die Destabilisierung von Importin-Komplexen während der Mitose, lässt vermuten, dass Ran ebenso in der Mikrotubuli-Organisation während der Interphase eine bedeutende Rolle spielt (Dasso, 2002). Hierdurch wäre Ran neben dem Transport von Signalmolekülen innerhalb des Cytoplasmas vielleicht auch an einer Schwerkraftwahrnehmung bzw. -weiterleitung durch das Cytoskelett beteiligt

Die gravitrop induzierte GTPase Ran ist darüber hinaus auch über das Ran-bindende Protein RanBPM mit Integrinen verbunden. RanBPM wurde an der Plasmamembran tierischer Zellen gefunden, wo es mit dem beta2 Integrin kolokalisiert und interagiert (Denti et al., 2004). Dabei assoziierte RanBPM im phosphorylierten Zustand mit der Plasmamembran, wobei die Phosphorylierung von RanBPM durch Stress-Stimuli gesteigert werden konnte. Eine gesteigerte Interaktion mit Integrinen während der Gravistimulation würde hier bedeuten, dass Ran möglicherweise in der Signaltransduktion von Zelle zu Zelle eine wichtige Rolle spielt.

4.2 Vergleichbarkeit von Protoplasten mit intakten Hypokotylen

In den verschiedenen Experimenten wird die Genexpression in unterschiedlichem Pflanzenmaterial miteinander verglichen. Aufgrund der teilweise negativ korrelierenden Ergebnisse nach Auxin- und Gravistimulation (eIF1 und Ran) stellt sich die Frage, ob der unterschiedliche physiologische Zustand von Protoplasten und intakten Hypokotylen einen direkten Vergleich der Genexpression zulässt. Dementsprechend könnte die Auxinstimulation durch den mit der Protoplastierung einhergehenden Stress maskiert worden sein. Allerdings konnten die Protoplasten nach der Verdauung der Zellwände über Nacht regenerieren, wodurch die natürlichen physiologischen Verhältnisse weitgehend wieder hergestellt werden konnten. Außerdem wurde schon zahlreich beschrieben (Sheen, 2001), dass Protoplasten auf die gleiche Weise wie auch intakte Zellen auf Stressfaktoren, ausgelöst durch Oxidantien, Hitze, osmotische Stresssignale oder Pathogene, reagieren können. Sogar die Membranbeschaffenheit ist vergleichbar mit der von intakten Zellen und dadurch geeignet um

Membran-Transporter oder die Regulierung der Ionenkanäle durch Stress und Hormonstimulation zu untersuchen (Sheen, 2001). Zudem behalten die Protoplasten während der Isolation ihren differenzierten Status bei, den sie im intakten Gewebe besessen haben, und zeigen weiterhin intakte physiologische Funktionen wie zum Beispiel Photosynthese in Mesophyllzellen (Edwards et al., 1970) oder die Blaulicht-Induzierbarkeit der H⁺-ATPase in den Schließzellen (Assmann et al., 1985). Auch in Sonnenblumenprotoplasten konnte bereits eine differentielle H⁺-ATPase-Aktivität nach Auxingabe festgestellt werden, was die Funktionsfähigkeit der Protoplasten beweist (Müller und Schnabl, 2001).

Darüber hinaus zeigt Pasternak et al. (2005), dass auch die molekulare Antwort in isolierten Protoplasten auf ganze Pflanzen übertragbar ist, und somit direkt relevant für das Verständnis vom Verhalten intakter Pflanzen ist. Dies war auf ähnliche Effekte nach Auxinbehandlung und oxidativem Stress auf das Wachstum zurückzuführen, die sowohl in ganzen Pflanzen, Pflanzenorganen als auch in Protoplasten zu erkennen waren. Anhand der positiv korrelierenden Ran- und eIF1-Expressionsergebnisse, bei denen ein direkter Vergleich zwischen gravistimulierten Hypokotylen und gravistimulierten Protoplasten möglich war, konnte kein Effekt bedingt durch das unterschiedliche Experimenten-Design festgestellt werden. Es konnte sowohl nach µg-Stimulation der Protoplasten im schnellrotierenden Klinostaten als auch im TEXUS40-Flug sowie nach einfacher Gravistimulation durch Kippen der gesamten Pflanze ein Anstieg der Ran-mRNA gezeigt werden. Somit stellen die Sonnenblumen-Hypokotylprotoplasten, deren Fähigkeit zur Schwerkraftwahrnehmung bereits durch die Inositoltrisphosphat-Messungen bewiesen worden ist (Müller, 2000; Schnabl, 2001; 2002), ein geeignetes Modellsystem für die Analyse der Genexpression dar.

4.3 Vergleich zwischen apikaler und basaler Genexpression

In dieser Arbeit wurde zwischen apikalen und basalen Hypokotylabschnitten unterschieden, um eine nähere Bestimmung des für den Gravistimulus sensitiven Bereichs zu erreichen. Dabei zeigte der Vergleich in den Genexpressions-Analysen einen deutlichen Unterschied in der Expressionsstärke bzw. der differentiellen Regulation der amplifizierten cDNA-Fragmente zwischen apikalen und basalen Hypokotylsegmenten bzw. Hypokotylprotoplasten.

Bei dem Differential Display der gravistimulierten Hypokotyle kann man in allen vier cDNA-Fragmenten, bei denen zwischen apikaler und basaler Expression unterschieden wurde, nur im apikalen Bereich eine differentielle Regulation beobachten (Tab. 3.1). Nur das Fragment D19-

405 bp, die Calcium-abhängige Proteinkinase, war sowohl apikal als auch basal differentiell hochreguliert (Tab. 3.1, Abb. 3.3 c). Nach der Verifizierung mit spezifischen Primern zeigte sich, dass auch Cytochrom c sowie eIF1 und Ran apikal und basal differentiell reguliert sind. Vergleicht man aber die relative Änderung der Expressionsrate nach Gravistimulation in den apikalen und basalen Hypokotylsegmenten, kann man bei eIF1 und Cytochrom c im apikalen Bereich einen deutlich stärkeren Anstieg des mRNA-Levels sehen (Abb. 3.7, 3.8). Daher sieht es so aus, als ob der apikale Bereich sensitiver auf die Gravistimulation reagiert. Dies ist vermutlich auf die stärkere Krümmungsrate im apikalen Gewebe zurückzuführen, da der basale Hypokotylabschnitt aufgrund seines physiologischen Alters und des differenzierteren Gewebes reaktionsschwächer bzw. langsamer ist. In vielen verschiedenen Pflanzenarten kann ein steiler Gradient in der Zellstreckung von der basalen bis zur apikalen Region von etiolierten Keimlingen festgestellt werden, wobei sich die Streckungszone direkt unter dem Keimhaken befindet (Gendreau et al., 1997). Der höhere Expressionsanstieg in den apikalen Hypokotylabschnitten resultiert daher möglicherweise aus der höheren Wachstumsrate des apikalen Bereichs im Vergleich zum basalen Gewebebereich. Somit wäre eine Involvierung der gravitrop induzierten Gene in die Zellstreckung eine Erklärung für die stärkere Expressionsrate im apikalen Bereich. Cytochrom c beispielsweise wird vermehrt dort exprimiert, wo eine höhere mitochondriale Biogenese erforderlich ist, was mit der hohen Aktivität der Protonenpumpen während der Zellstreckung korreliert (Abb. 3.3 b; 3.7). Auch bei der Xylosyltransferase, die direkt am Um- und Aufbau der Zellwand beteiligt ist, wäre eine höhere Expression im apikalen Bereich zu vermuten. Sie wurde in dieser Arbeit allerdings nur im Gesamthypokotyl untersucht.

Dementsprechend konnte bei Catalá et al. (1997) eine mit der Wachstumsrate korrelierende Expressionsrate einer Xyloglucan-Endotransferase LeXET gezeigt werden, indem der mRNA-Level in der basalen Region der etiolierten Tomatenhypokotyle abnahm. Auf der anderen Seite konnten sie bei einem weiteren XET-Gen LeXET2 ein gegenteiliges Verhalten feststellen (Catalá et al., 2001). Gleichzeitig wurde LeXET2 negativ durch Auxin reguliert, während die Expression von LeXET durch Auxin induzierbar war. Dieses unterschiedliche Expressionsmuster war auf unterschiedliche Funktionen von LeXET und LeXET2 im Zellwandmetabolismus zurückzuführen, wobei LeXET wahrscheinlich eine Rolle während der Zellexpansion spielt, und LeXET2 in die Umstrukturierung von Nicht-Zellulosegebundenen Xyloglucan-Domänen involviert ist. Dies würde den unterschiedlichen mRNA-Level in apikalen und basalen Hypokotylen in Abhängigkeit von der Funktion der Gene erklären.

Bei Ran kann man nach Gravistimulation durch Kippen in den basalen Segmenten einen stärkeren Anstieg (4-fach) des mRNA-Gehaltes beobachten als in den apikalen Segmenten (3-fach) (Abb. 3.6), während die Stimulation durch Mikrogravitation in der TEXUS-Rakete in beiden Hypokotylabschnitten einen einheitlichen Expressionsanstieg zeigt. Allerdings ist der Expressionslevel von Ran in den unbehandelten Kontrollen in den apikalen Proben um ein dreifaches höher als in den basalen Proben, während die Cytochrom c-Expression und die eIF1-Expression in den apikalen und den basalen Kontrollen auf dem gleichen Niveau lagen. Dies kann bedeuten, dass Ran während der gravitropen Antwort vermutlich sowohl im apikalen also auch im basalen Hypokotylabschnitt gleichermaßen benötigt wird, wodurch im basalen Bereich ein stärkerer Anstieg erforderlich ist.

Ein ähnliches Ergebnis zeigten die $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ -Analysen unter Mikrogravitationsbedingungen im schnellrotierenden Klinostaten sowie im TEXUS40-Flug (Kriegs et al., 2006). Hier konnte in den apikalen Protoplasten im Gegensatz zum basalen Gewebe nur ein sehr geringer Anstieg bzw. kein Anstieg des $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ -Gehalts festgestellt werden, was auf eine höhere gravitrope Sensitivität des basalen Gewebes hindeutete. Aufgrund dieser positiven Korrelation wird Ran während der gravitropen Signaltransduktion möglicherweise durch den sekundären Botenstoff $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ induziert. Die gravistimulierte $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ -Freisetzung wurde allerdings nicht in einem längeren Zeitrahmen als während des Raketenflugs gemessen.

Bei der Differential Display Analyse nach Auxinstimulation der Hypokotylprotoplasten konnten basal ebenfalls weniger differentielle Peaks detektiert werden als apikal. Auch hier waren alle 13 cDNA-Fragmente im apikalen Bereich differentiell exprimiert, und nur vier davon auch im basalen Bereich differentiell reguliert (Tab. 3.1). Bei dem Vergleich der relativen Änderung in der Expressionsrate sieht man auch in den spezifischen PCR-Produkten von eIF1 und Ran im apikalen Hypokotylabschnitt zwar eine geringe, aber leicht stärkere Expressionsänderung, die zudem in die entgegengesetzte Richtung verläuft (Abb. 3.8, 3.9). Daneben wird die Expression von Cytochrom c sogar ausschließlich im apikalen Bereich reguliert (Abb. 3.10). Auch Müller und Schnabl (2001) konnten mittels der Auxin-induzierbaren Aktivierung der PM/H^+ -ATPase in den apikalen Hypokotylprotoplasten der Sonnenblume eine weitaus höhere Auxin-Sensitivität feststellen. Daraus könnte man schließen, dass im basalen Gewebe vermutlich weniger Auxin-Rezeptoren exprimiert werden. Dabei handelt es sich wahrscheinlich um mehr als zwei Auxinrezeptoren, die zum einen für

die Genexpressions-abhängige und zum anderen für die Genexpressions-unabhängige Signaltransduktion verantwortlich sind. Die bis jetzt am Besten untersuchten Auxinrezeptoren sind das Auxin-bindende Protein ABP1 und das „transport inhibitor response“-Protein TIR1 (siehe Einleitung). Bei TIR1 handelt es sich um ein lösliches und nukleäres Protein, weshalb Antworten auf Auxin, die an der Zelloberfläche wahrgenommen werden wie z.B. bei nicht permeablen Auxinanaloga, nicht durch TIR1 vermittelt werden können (Venis et al., 1990). Diese Auxinantworten sind wahrscheinlich durch ABP1 reguliert, die häufig mit Ionenströmungen durch die Plasmamembran assoziiert sind. Die Auxin-Regulation über den Proteolyseweg und der transkriptionalen Aktivierung mit Hilfe des TIR1-Rezeptors dauert dagegen eine gewisse Zeit und ist zwangsläufig viel langsamer als zum Beispiel eine Membranpolarisierung oder die Induktion von Calciumwellen (Napier, 2005). Daher sind sehr schnelle Auxin-Antworten unter 5 Minuten wahrscheinlich nicht durch TIR1-reguliert wie zum Beispiel die schnelle Aktivierung von MAPKinasen (Mockaitis und Howell, 2000) oder die schnelle Expression von SAUR-Genen innerhalb von 2-5 min, die nicht auf eine *de novo*-Proteinsynthese angewiesen sind (McClure und Guilfoyle, 1989).

4.4 Korrelation zwischen auxin- und gravistimulierter Genexpression

Die Genexpressionsanalysen zeigten anhand der Induzierbarkeit der identifizierten Gene nach Auxin- und Gravistimulation sowohl negative Korrelationen wie bei Ran und eIF1 als auch positive Korrelationen wie bei Cytochrom c und der Xylosyltransferase (nicht verifiziert).

Bei Ran und eIF1, deren Expression in auxin- und in gravistimulierter cDNA untersucht wurde, konnte neben einer gravitropen Expressionssteigerung im apikalen und basalen Hypokotylbereich, durch Auxin nur eine leichte Induktion in den basalen Protoplasten festgestellt werden, während apikal sogar eine leichte Herunterregulation zu sehen war. Da die Auxin-abhängige Herunterregulation im vermutlich Auxin-sensitiveren apikalen Gewebe zu beobachten war, kann man daraus schließen, dass Ran und eIF1 negativ durch Auxin reguliert werden und wahrscheinlich keine Rolle in der Auxin-induzierten Zellstreckung spielen. Weiterhin ist die gravistimulierte Induktion von Ran und eIF1 wahrscheinlich unabhängig von Auxin. Bei Ran ist die Herunterregulation vielleicht in der indirekten Funktion als Repressor von Auxin-induzierbaren Genen begründet. Möglicherweise übt eIF1 eine ähnliche Funktion aus, indem es regulatorisch in die Translation eingreift. Auch die Histondeacetylase, die ebenfalls als Repressor Auxin-induzierbarer Gene wirkt, wurde nur in den apikalen Hypokotylprotoplasten herunterreguliert.

Eventuell handelt es sich aber auch um zeitlich aufeinander folgende bzw. parallel verlaufende Signalwege, indem Auxin in einem Regelmechanismus der gravitropen Induktion der genannten Gene entgegenwirkt. Es ist bekannt, dass Auxin sehr schnelle Reaktionen auf Transkriptionsebene auslöst. McClure und Guilfoyle (1989) konnten in den Hypokotylen der Sojabohne eine sehr schnelle Regulation der Transkription innerhalb von 2-5 Minuten nach Auxingabe feststellen. Weiterhin wurde in der Wurzelspitze von *Arabidopsis* eine schnelle Expression, sowohl Hoch- als auch Herunterregulation, von Genen aus der SAUR und IAA-Genfamilie nach Gravistimulation innerhalb von 2 min beschrieben (Kimbrough et al., 2004). Da der Versuchsaufbau eine Vergleichbarkeit in einem einheitlichen zeitlichen Rahmen zwischen der Auxin- und der Gravistimulation herstellen sollte, wurde in dieser Arbeit keine frühe Auxin-Induktion untersucht. Nachdem aber auch eine sehr schnelle Expressionssteigerung der Ran-mRNA und der eIF1-mRNA innerhalb von 200 Sekunden während des TEXUS-Fluges und während der Rotation im schnelldrehenden Klinostaten gezeigt werden konnte (Abb. 3.12 a, 3.13 a), wäre eine Untersuchung der frühen Auxin-Induktion interessant.

Leider kann man in dieser Studie nicht zwischen der relativen Änderung in der Synthese von gravitropen Transkripten und der Stabilität von spezifischen Transkripten unterscheiden. Daher spielt vielleicht die Instabilität der mRNA bei der Vergleichbarkeit der beiden Stimulationsexperimenten eine Rolle, da für Transkripte von Auxin-induzierbaren Genen eine geringe Stabilität festgestellt wurde (Gutierrez et al., 2002). Die SAUR-Gene, zum Beispiel, besitzen ein *Downstream*-Element in der 3'-untranslatierten Region, welches sie für einen schnellen Abbau kennzeichnet (McClure et al., 1989; Newman et al., 1993). Während stabile Transkripte eine Halbwertszeit von einigen Stunden bis zu einigen Tagen besitzen, ist die Halbwertszeit von instabilen Transkripten kürzer als 60 Minuten (Hargrove et al., 1991). Dadurch, dass Gene mit instabilen Transkripten oft für Proteine kodieren, die eine wichtige regulative Rolle spielen wie die Transkriptionsfaktoren *c-myc* und *c-fos* in tierischen Zellen (Greenberg und Belasco, 1993), wird durch eine schnelle Änderung des mRNA-Niveaus eine kontrollierte Genexpression ermöglicht. Da es sich bei Ran und eIF1 ebenfalls um wichtige Regulatoren handelt, wäre es möglich, dass eine Expressionssteigerung dieser Gene durch Auxin aufgrund einer eventuellen kurzen Halbwertszeit nach 30 min im apikalen Gewebe schon nicht mehr nachweisbar war.

Dagegen ist die gravitrope Cytochrom c-Induktion mit der Auxin-induzierten Genexpression positiv korreliert. Dabei ist die Auxin-abhängige Hochregulation der Cytochrom c-Expression ebenfalls nur im vermutlich sensitiveren apikalen Hypokotylbereich zu sehen. Hier wird

Cytochrom c erst innerhalb 60 min durch Auxin induziert, wobei es durchaus möglich ist, dass das Maximum nach 60 min noch nicht erreicht ist. Dies könnte durch längere Stimulationszeiten näher beobachtet werden. Da Cytochrom c nach Gravistimulation schon in den ersten 30 min hochreguliert wird, gefolgt von einem starken Anstieg nach 60 min, wird die gravitrope Expression möglicherweise durch einen Auxineffekt verstärkt. Diese positive Korrelation deutet an, dass Cytochrom c während der gravitropen Antwort eine wichtige Rolle für die Zellstreckung spielt, was einen erhöhten Energiebedarf widerspiegelt und auch mit der erhöhten PM/H⁺-ATPase-Aktivität in Auxin-stimulierten apikalen Protoplasten korreliert (Müller und Schnabl, 2001).

Auch die Xylosyltransferase, die vermutlich eine Rolle im Zellwandmetabolismus spielt, zeigt eine positive Korrelation in ihrer Expression, da sie ebenfalls sowohl durch Auxin- (apikal) als auch durch Gravistimulation hochreguliert wird. Von der Funktion her sind wahrscheinlich die meisten Gene, die gleichzeitig durch Auxin und gravitrop induzierbar sind, direkt in die (differentielle) Wachstumskontrolle involviert. Bei Esmon et al. (2006) konnten einige gravistimierte Gene identifiziert werden, deren Expression mit dem lateralen Auxingradienten korrelierte, was sich in einer Akkumulation der Gene in der stärker wachsenden Flanke vor oder während der Krümmung äußerte. Gleichzeitig waren diese Gene in Abhängigkeit von dem Auxin-regulierten Transkriptionsfaktor ARF auch durch Auxin induzierbar. Bei diesen Genen handelte es sich zum Beispiel um Mitglieder der Expansin-Genfamilie, die in die Zellwand-Ausdehnung involviert sind. Dabei sind Expansine durch einen niedrigen pH-Wert induzierbar, was mit der Aktivierung der H⁺-ATPase durch Auxin nach 10-20 min korreliert (Esmon et al., 2006).

Möglicherweise sind eIF1 und Ran als Genexpressions-Regulatoren an der Expression dieser Gene, die am Zellwandum- und -aufbau beteiligt sind, involviert, so dass eine sehr frühe Auxin-induzierte Expression von Ran und eIF1 während der gravitropen Antwort durchaus denkbar wäre.

Auf der anderen Seite konnte auch schon gezeigt werden, dass Gene, die in die Auxin-abhängige Signaltransduktion involviert sind, von einer Gravistimulation negativ beeinflusst werden. Kimbrough et al. (2004) konnten z.B. beobachten, dass die Expression des wurzelspezifischen Auxin-Efflux-Carriers EIR1 (PIN2) durch Gravistimulation herunterreguliert wird, obwohl EIR1 eine wichtige Rolle in der gravitropen Krümmungsantwort spielt. Zudem wurde festgestellt, dass die Querverteilung von Auxin

infolge einer Gravistimulation nicht notwendig für die asymmetrische Wachstumsantwort ist. Dies könnte allerdings auf eventuell gewebespezifische Veränderungen in der Auxin-Sensitivität oder in der Umwandlung von gebundenem Hormon zu freiem Hormon zurückzuführen sein (Brock et al., 1991). Aber auch andere Experimente bezüglich des $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ -Signalweges demonstrieren, dass die asymmetrische Verteilung von Auxin während der gravitropen Antwort nicht für die Krümmungsreaktion des gravistimulierten Pflanzenorgans verantwortlich zu sein scheint. In gravistimulierten Hafer-Koleoptilen konnte beobachtet werden, dass bei niedrigen Temperaturen von 4 °C eine gewohnte $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ -Freisetzung stattfand, die bei anschließenden Raumtemperaturbedingungen eine gravitrope Krümmung auslöste, andere Faktoren wie die Verteilung von Auxin aber nicht mehr erfolgten (Perera et al., 2001). Diese Resultate lassen vermuten, dass es sich bei der gravitropen Krümmung um einen Auxin-unabhängigen $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ -vermittelten Signalweg handelt.

Der in Signaltransduktionswegen tierischer Zellen weit verbreitete sekundäre Botenstoff $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ konnte auch für pflanzliche Zellen nachgewiesen werden, und wurde von Müller (2000) sowie Perera et al. (1999, 2001) in der Schwerkraft-abhängigen Signaltransduktion untersucht. Dabei konnten sie in Abhängigkeit einer veränderten Schwerkraftorientierung einen $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ -Anstieg feststellen. Bei einem Vergleich der gravitropen mRNA-Expression von Ran, eIF1, Histon H2B, CDPK, beta-6-Xylosyltransferase und Cytochrom c mit der differentiellen $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ -Freisetzung konnte somit eine positive Korrelation gezeigt werden. Die Daten von Müller (2000) zeigen ebenfalls, dass $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ in der Auxin-induzierten Signaltransduktion involviert und somit wahrscheinlich auch an der Koordination der Zellstreckung beteiligt ist. In dieser Hinsicht zeigen die Untersuchungen in dieser Arbeit teilweise eine positive (Cytochrom c, Xylosyltransferase), aber überwiegend eine negative (apikal – Ran und eIF1, Histon H3, FBPA) Korrelation zwischen der Auxin-induzierten $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ -Freisetzung und der Auxin-induzierten mRNA-Expression. Auch in Sederoff et al. (2004) gibt es Beispiele für eine negative Korrelation auf molekularer Ebene zwischen $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ - und Auxin-Induktion. In Gravistimulationsexperimenten konnte beobachtet werden, dass transgene *Arabidopsis*-Pflanzen mit einem reduzierten Level an $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ das gleiche Expressionsmuster Auxin-induzierbarer Gene (z.B. SAURs, IAAs) wie die Wildtypen zeigten, was für eine $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ -unabhängige Auxin-regulierte Transkription sprechen würde. Daneben konnten in den Wildtypen innerhalb einer Minute Gravitations-spezifische Reaktionen auf Transkriptionsebene festgestellt werden, zu denen allerdings keine Gene zählten, die in Hormon-vermittelte Antworten involviert sind. In den transgenen Pflanzen

wurden die meisten der frühen gravitrop induzierbaren Gene nach Gravistimulation allerdings nicht induziert. Daher scheint die frühe gravitrope Genexpression abhängig von $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ gewesen zu sein. Möglicherweise handelt es sich also bei Ran und eIF1 als sehr früh gravitrop induzierbare Gene (Klinostat, Rakete), um eine Auxin-unabhängige $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ -vermittelte Transkription.

4.5 Graviperzeption

Im „gravitational pressure“ Modell (Staves, 1997) agiert der gesamte Protoplast als Statolith. Hier wird die Gravitation durch Wechselwirkungen zwischen der Plasmamembran und der Zellwand wahrgenommen, so dass Dehnungs- und Zugkräfte, die als mechanische Belastung auf die Plasmamembran wirken, *Stretch*-aktivierbare Ionenkanäle öffnen (Kanzaki, 1999). Allerdings zeigen die Genexpressionsanalysen mit den Protoplasten in dieser Arbeit, dass auch isolierte Protoplasten ohne Verbindung zur Extrazellulären-Matrix auf Schwerkraft reagieren. Sowohl im Klinostaten als auch in der TEXUS40-Rakete konnte eine Induktion der Genexpression in Protoplasten gezeigt werden. Auch die $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ -Analytik von Müller (2000) konnte bereits belegen, dass der Protoplast als kleinste funktionale Einheit in der Lage ist autonom auf eine veränderte Orientierung zum Schwerkraftvektor zu reagieren. Daher entstehen durch die Gravistimulation vermutlich eher Kräfte innerhalb des Protoplasten, die auf *Stretch*-aktivierbare Ionenkanäle in der Zellmembran bzw. in Membranen diverser Zellorganellen wirken können. Sogar isolierte Zellkerne wurden als mechanische und thermische Sensoren erkannt, indem sie auch unabhängig von ihrer gewohnten cytosolischen Umgebung auf Calcium-Signale reagieren konnten (Xiong et al., 2004). Darüber hinaus gibt es auch in der Kernhüllenmembran mechanosensitive Ca^{2+} -Kanäle, die für eine Ca^{2+} -Freisetzung verantwortlich sein können (Itano et al., 2003). Das bedeutet, dass die Aktivierung der Genexpression über die Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren, möglicherweise auch durch mechanosensitive Ca^{2+} -Kanäle in der Kernhülle kontrolliert wird. Auch $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ -Rezeptoren konnten neben dem Endoplasmatischen Retikulum (Martinec et al., 2000) und dem Tonoplasten (Alexandre et al., 1990; Allen et al., 1995) in tierischen Zellen an der Kernhülle lokalisiert werden (Bare et al., 2005). Folglich kann die Transkriptionsmaschinerie im Kern sowohl durch die $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ -vermittelte Ca^{2+} -Freisetzung als auch durch die Regulation von Dehnungs-aktivierbaren Ionenkanälen reguliert werden.

Möglicherweise sind auch Integrine in die gravitrope Signalperzeption involviert. Im Allgemeinen lösen die Transmembranproteine nach einem initialen Adhäsionskontakt mit einem extrazellulären Liganden eine Serie von Ereignissen aus, indem sie Signale in die Zelle weitergeben und im Zellinneren weitere komplexe Vorgänge verursachen. Dabei interagieren Integrine über Aktin-bindende Proteine mit dem Cytoskelett und stellen somit eine Verbindung zwischen der extrazellulären Matrix mit dem Cytoskelett, aber auch direkt mit Signaltransduktionsmolekülen wie Proteinkinasen oder der Phospholipase C dar.

Zum anderen kontrollieren Integrine aber auch den nukleo-cytoplasmatischen Verkehr (Aplin und Juliano, 2001), indem z.B. Transkriptionsregulatoren direkt an eine konservierte Sequenz in der cytoplasmatischen Schwanzdomäne von Integrin α binden und somit aus dem Kern ausgeschlossen werden (Cyert, 2001). Auch die bei Denti et al. (2004) beschriebene Interaktion des Ran-bindenden Proteins RanBPM mit Integrinen zeigt eine enge Verknüpfung der Signalweiterleitung durch Integrine mit dem Transport von Proteinen.

Aber nicht nur die Interaktion mit Ran ist möglicherweise ein Hinweis darauf, dass Integrine auch während der gravitropen Antwort eine wichtige Rolle in der Signaltransduktion spielen. Es ist auch bekannt, dass Integrine die Translations-Initiation in Abhängigkeit von einer Bindung an das extrazelluläre Adhäsionsprotein Fibronectin induzieren (Gorrini et al., 2005). Auch durch die Phosphorylierung und damit Inaktivierung eines Repressors von eIF-4E mit Hilfe des Phosphatidylinositol-3-Kinase/Akt-Signalweges, sind Integrine in den Translationsmechanismus integriert (Chung et al., 2002). Ebenso verhindert eine Integrin-Signalkaskade den Ausstrom von Cytochrom c aus den Mitochondrien in Abhängigkeit von der Aktivität des PI-3-Kinase/Akt-Signalweges (Aoudjit und Vuori, 2001). Darüber hinaus ist auch eine Integrin-vermittelte Regulierung der Chromatinstruktur durch eine gesteigerte Histon H3 Acetylierung bekannt (Rose et al., 2005).

Daneben konnte bereits eine Aktivierung der gravitrop induzierbaren Phosphatidylinositol-5-Kinase durch Integrine nachgewiesen werden, welches über eine Signalkaskade einen Anstieg des gravitrop regulierten $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ bewirken kann. Dabei phosphoryliert die Phosphatidylinositol-5-Kinase einen Inositolrest des Membranlipids Phosphatidylinositol, was zur Synthese von $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$ führt. $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ wiederum entsteht, indem PIP_2 durch die Phospholipase C hydrolysiert wird. Aufgrund dieser positiven Korrelation könnte die gravitrope Induktion möglicherweise auf eine Integrin-vermittelte Signaltransduktion zurückzuführen sein.

Zudem sind Integrine wie schon in der Einleitung erwähnt (1.2) durch ihre Lokalisierung in den Amyloplasten sowie im Endomembran-System vielleicht auch innerhalb der Zelle in die

Signalweiterleitung involviert und somit eventuell schon an der Schwerkraftwahrnehmung beteiligt (Reuzeau et al., 1997; Lynch et al., 1998).

4.6 Einordnung der identifizierten Gene in die gravitrope Signaltransduktion

Die meisten Signaltransduktionswege verursachen eine spezifische Veränderung in der Genexpression. Dafür muss ein extrazelluläres Signal durch die Plasmamembran und anschließend durch die Kernhülle weitergegeben werden, um das Signal vom Cytoplasma in den Kern weiterzuleiten. Dabei haben viele Signalantworten eine nukleäre Lokalisierung von Transkriptionsfaktoren oder alternativ von Kinasen zur Folge, die im Kern Transkriptionsfaktoren phosphorylieren und aktivieren. Daher können die in dieser Arbeit identifizierten Gene in der gravitropen Signaltransduktion höherer Pflanzen zu einer schlüssigen Hypothese zusammengefügt werden, wobei dem GTP-bindenden Protein Ran eine besondere regulative Rolle zukommt (siehe Abb. 4.1).

Aufgrund der Fähigkeit der Protoplasten, auf einen veränderten Schwerkraftreiz zu reagieren, kann man davon ausgehen, dass im Zellinneren ein gravitropes Signal, wahrscheinlich durch die Sedimentation von Statolithen, erzeugt wird. Dabei wird das Signal entweder direkt durch eine Membran wahrgenommen oder über das Cytoskelett an eine Membran weitergegeben. Durch das Öffnen von mechanosensitiven Kanälen wird Calcium aus diversen intrazellulären Speichern freigesetzt. Gleichzeitig steigt der $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ -Gehalt an (Müller, 2000; Perera et al., 1999). $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ bindet an einen spezifischen Rezeptor, der sich entweder am ER oder an der Vakuole befinden kann, oder möglicherweise auch an der Kernhülle wie es in tierischen Zellen schon beschrieben wurde (Bare et al., 2005) und aktiviert ebenfalls Calciumkanäle. Der resultierende Calcium-Ausstrom in das Cytosol bewirkt die Aktivierung der gravitrop hochregulierten Calcium-abhängigen Proteinkinase (4.1.1). Diese phosphoryliert wahrscheinlich abhängig von Auxin die PM-H^+ -ATPase, was durch die Ansäuerung des Apoplasten zu einer gesteigerten Dehnbarkeit der Zellwand führt. Auf der anderen Seite phosphoryliert eine CDPK möglicherweise unabhängig von Auxin die V-ATPase , wodurch es durch eine erhöhte Anionenaufnahme in die Vakuolen zu einer Turgorsteigerung kommt (Pei et al., 1996). Durch die CDPK-abhängige Aktivitätssteigerung der Vakuolen-ständigen H^+ -ATPase wird vermutlich auch die Fruktose-1,6-bisphosphat Aldolase hochreguliert (4.1.2). Bei der daraufhin eingeleiteten Zellstreckung ist die sowohl gravitrop als auch durch Auxin hochregulierte Xylosyltransferase in den Auf- und Umbau der Zellwand involviert (4.1.4).

Der ansteigende Zellstoffwechsel wiederum benötigt eine erhöhte mitochondriale ATP-Produktion, was sich in einer hochregulierten Expression von Cytochrom c widerspiegelt (4.1.3). Weiterhin reguliert die Calcium-Ausschüttung die Aktivierung von Calcium-abhängigen Proteinkinasen für die Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren, die als Substrate von CDPKs bereits festgestellt werden konnten (Roberts und Harmon, 1992; Harmon et al., 2000). Möglicherweise geschieht die Phosphorylierung des gravitrop induzierten Translations-Initiations-Faktors eIF1 ebenfalls über eine CDPK, welcher somit durch eine selektive Translation regulativ in die Genexpression eingreifen kann (4.1.7). Während der Signaltransduktion wird der nukleo-cytoplasmatische Transport durch die GTPase Ran kontrolliert, wodurch die gravitrop regulierten Proteine zum Ort ihrer Funktion gelangen (4.1.8). Auf diesem Weg werden beispielsweise die Histone (4.1.5) in den Kern importiert und die Translations-Initiations-Faktoren aus dem Kern exportiert. Dabei stellt das Cytoskelett in Verbindung mit dem Ran-bindenden Protein Importin α wahrscheinlich ein aktives Element für den Transport von Proteinen zwischen dem Kern und der Plasmamembran dar. An dem dynamischen Verhalten des Cytoskeletts wiederum sind auch Histondeacetylasen durch die Destabilisierung der Mikrotubuli (4.1.6) sowie CDPKs durch die Aktivierung von Aktin-depolymerisierenden Faktoren beteiligt (4.1.1). Dieser Cytoskelett-vermittelte Transport reguliert auch die Umverteilung von Proteinen wie zum Beispiel den Auxin-Influx- und Efflux-Carriern, wodurch die laterale Verteilung von Auxin ermöglicht wird (Muday et al., 2000; Geldner et al., 2001). Eventuell werden durch eine darauf folgende Auxininduktion im Kern Histondeacetylasen abgebaut, bzw. aus dem Kern transportiert, wodurch die Transkription Auxin-induzierbarer Gene initiiert wird (Devoto et al., 2002; Gao et al., 2004).

Bei der Signalweiterleitung von Zelle zu Zelle spielen vermutlich Integrine eine Rolle, indem sie in Assoziation mit RanBPM die Signaltransduktion von der Plasmamembran über das Cytoskelett bis hin zum Kern initiieren. Vielleicht sind sie aber auch schon in die Signalperzeption innerhalb der Zelle involviert (Lynch et al., 1998; Reuzeau et al., 1997).

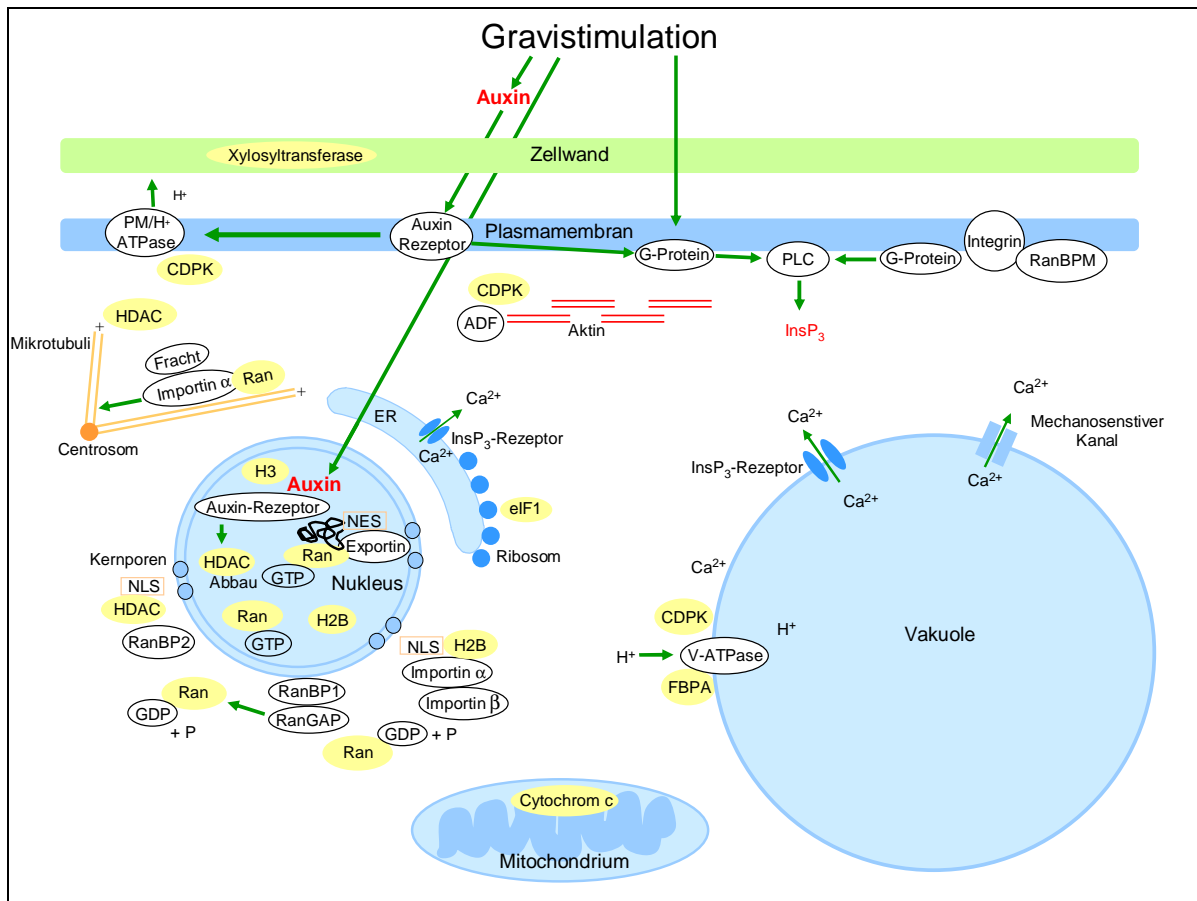


Abb. 4.1 Modell der gravitropen Signaltransduktion. Die Beteiligung der Calcium-abhängigen Proteinkinase (CDPK), des Cytochroms c, der Xylosyltransferase, des Translations-Initiations-Faktors eIF1, des Histons H2B und des G-Proteins Ran an der gravitropen Signaltransduktion konnte in den Genexpressionsstudien nachgewiesen werden. Die Histondeacetylase (HDAC), das Histon H3 und die Fruktose-1,6-bisphosphat Aldolase (FBPA) wurden aufgrund des Expressionsverlauf nach Auxinstimulation in den Signalweg eingeordnet. PLC – Phospholipase C, InsP_3 – Inositol-1,4,5-trisphosphat, NLS – nukleäres Lokalisations-Signal, NES – nukleäres Export-Signal, ADF- Aktin-depolymerisierender Faktor.

Die in dieser Arbeit gezeigte Auxin-unabhängige Expression der gravitrop stimulierten Gene Ran und eIF1 weist auf einen alternativen Signaltransduktionsweg hin, welcher nicht auf Auxin als primären Botenstoff beruht. Zudem ist die sehr schnelle Expression dieser Gene innerhalb von 200 s vergleichbar mit den früh induzierbaren $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ -abhängigen Transkripten bei Sederoff et al. (2004). Gleichzeitig konnte aber auch eine $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ -unabhängige Expression von Auxin-induzierbaren Genen beobachtet werden (Kimbrough et al., 2005). Daher muss man von mindestens zwei parallel verlaufenden Signaltransduktionswegen ausgehen. Dabei handelt es sich zum einen um eine Hormon-unabhängige, eventuell $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ -vermittelte Genexpression, und zum anderen um eine Auxin-abhängige Genexpression, die wahrscheinlich sowohl durch sehr schnelle Reaktionen als auch durch später folgende Signalkaskaden, aufgrund neu synthetisierter oder auch umverteilter Proteine, ausgelöst wird.

5 Zusammenfassung

Thema der vorliegenden Arbeit war die nähere Charakterisierung der gravitropen Signaltransduktion in *Helianthus annuus* anhand von Genexpressionsanalysen in gravitroptimulierten und Auxin-stimulierten Sonnenblumenhypokotylen bzw. Hypokotylprotoplasten. Dieser parallele Versuchsansatz sollte den Zusammenhang von gravitrop induzierbaren Genen und Auxin genauer analysieren, um neben gemeinsam genutzten Signalwegen eventuell parallel verlaufende Hormon-unabhängige Signaltransduktionswege zu identifizieren.

Für die Genexpressionsanalysen wurden zum einen Sonnenblumenhypokotyle um 45° gekippt und zum anderen Sonnenblumen-Hypokotylprotoplasten mit Auxin induziert. Mit Hilfe der Methode der Differential Display RT-PCR in Kombination mit der sensitiven Auftrennungsmöglichkeit auf der Kapillarelektrophorese konnten acht differentiell regulierte Gene mit einer Homologie zu einer bekannten Sequenz isoliert werden. Zu diesen Genen gehören die beiden Histone H2B und H3, eine Histondeacetylase und der Translations-Initiations-Faktor eIF1, welche regulativ in die Transkriptions- und Translationsmaschinerie eingreifen, eine Calcium-abhängige Proteinkinase, die durch Aktivierung und Inaktivierung von Enzymen an Signaltransduktionen beteiligt ist, Cytochrom c und eine Fruktose-1,6-bisphosphat Aldolase, die den Energiestoffwechsel der Zelle repräsentieren sowie eine beta-6-Xylosyltransferase, die wahrscheinlich im Zellwandmetabolismus involviert ist. Während die Calcium-abhängige Proteinkinase, das Histon H2B und das Cytochrom c gravitrop hochreguliert wurden, wurden das Histon H3, die Histondeacetylase, der Translations-Initiations-Faktor und die Fruktose-1,6-bisphosphat Aldolase nach Auxinapplikation herunterreguliert. Die Expression der Xylosyltransferase konnte sowohl durch Gravistimulation als auch durch Auxinstimulation induziert werden.

Weiterhin wurde in dieser Arbeit die in Theisen (2005) identifizierte gravitrop induzierte GTPase Ran, die hauptsächlich den Transport von Proteinen in und aus dem Zellkern reguliert, näher charakterisiert.

Von den identifizierten Genen konnten Ran, Cytochrom c und der Translations-Initiations-Faktor vollständig sequenziert werden. Bei diesen drei Genen wurde die differentielle Expression mit genspezifischen Primern verifiziert. Diese Verifizierung zeigte, dass man bei

einer mindestens zweifachen differentiellen Expressionsrate im Differential Display von einer tatsächlichen differentiellen Regulation ausgehen kann.

Durch einen Vergleich der Expression der gravitrop induzierten Gene in Auxin-stimuliertem Gewebe sowie der Auxin-induzierten Gene in gravistimuliertem Gewebe konnten Ran, Cytochrom c, eIF1 und die Xylosyltransferase in Abhängigkeit von Auxin in die gravitrope Signaltransduktion eingeordnet werden. Dabei zeigte sich, dass Ran und eIF1 wahrscheinlich unabhängig von der gravitropen Querverteilung von Auxin induziert werden.

Dagegen scheinen das sowohl gravitrop als auch durch Auxin induzierbare Cytochrom c und die Xylosyltransferase während der gravitropen Signaltransduktion durch Auxin reguliert zu werden und sind wahrscheinlich in die gravitrope Krümmungsreaktion involviert.

Zudem konnten die Genexpressionsanalysen durch Gravistimulationsversuche unter simulierter und realer Mikrogravitation ergänzt werden. Hierbei zeigte sich, dass auch isolierte Protoplasten Veränderungen in Bezug auf den Schwerkraftvektor wahrnehmen und mit einer Regulation auf Transkriptionsebene reagieren. Dadurch konnte eine sehr frühe Hochregulation der GTPase Ran und des Translations-Initiations-Faktors nachgewiesen werden.

Durch die positiv korrelierenden Ergebnisse der gravitropen Reaktion in gravistimulierten Hypokotylen und gravistimulierten Hypokotylprotoplasten konnte weiterhin die Vergleichbarkeit der beiden pflanzlichen Versuchssysteme gezeigt werden.

Anhand der Ergebnisse wurde schließlich eine Hypothese zur Beteiligung der identifizierten Gene während der gravitropen Signaltransduktion sowie zur Rolle von Auxin in der gravitrop regulierten Genexpression formuliert.

Literaturverzeichnis

- Abel S, Theologis A (1996) Early genes and auxin action. *Plant Physiol* 111(1): 9-17.
- Alexandre J, Lassales JP, Kado RT (1990) Opening of calcium channels in isolated red beet root vacuole membrane by inositol 1,4,5 trisphosphate. *Nature* 343: 567-570.
- Allen GJ, Muir SR, Sanders D (1995) Release of Ca²⁺ from individual plant vacuoles by both InsP₃ and cyclic ADP-ribose. *Science* 268: 735-737.
- Allwood EG, Smertenko AP, Hussey PJ (2001) Phosphorylation of plant actin-depolymerising factor by calmodulin-like domain protein kinase. *FEBS Lett* 499: 97-100.
- Anken RH, Rahmann H (1998) Neurobiological responses of fish to altered gravity conditions: a review. *Acta Astronaut* 42: 431-454.
- Aoudjit F, Vuori K (2001) Integrin signaling inhibits paclitaxel-induced apoptosis in breast cancer cells. *Oncogene* 20: 4995-5004.
- Aplin AE, Juliano RL (2001) Regulation of nucleocytoplasmic trafficking by cell adhesion receptors and the cytoskeleton. *J Cell Biol* 155: 187-191.
- Assmann SM, Simoncini L, Schroeder JI (1985) Blue light activates electrogenic ion pumping in guard cell protoplasts of *Vicia faber*. *Nature* 318: 285-287.
- Atlante A, Calissano P, Bobba A, Azzariti A, Marra E, Passarella S (2000) Cytochrome c is released from mitochondria in a reactive oxygen species (ROS)-dependent fashion and can operate as a ROS scavenger and as a respiratory substrate in cerebellar neurons undergoing excitotoxic death. *J Biol Chem* 275: 37159-66.
- Ayscough KR (1998) In vivo functions of actin-binding proteins. *Curr Opin Cell Biol* 10: 102-111.
- Baake M, Bauerle M, Doenecke D, Albig W (2001) Core histones and linker histones are imported into the nucleus by different pathways. *Eur J Cell Biol* 80: 669-677.
- Bailey-Serres J (1999) Selective translation of cytoplasmic mRNAs in plants. *Trends Plant Sci* 4: 142-148.
- Bare DJ, Kettlun CS, Liang M, Bers DM, Mignery GA (2005) Cardiac Type 2 Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor: Interaction and modulation by calcium/calmodulin-dependent protein kinase II. *J Biol Chem* 280(16): 15912-15920.
- Beltran-Pena E, Aguilar R, Ortiz-Lopez A, Dinkova TD, De Jimenez ES (2002) Auxin stimulates S6 ribosomal protein phosphorylation in maize thereby affecting protein synthesis regulation. *Physiol Plant* 115: 291-297.
- Blancaflor EB, Fasano JM, Gilroy S (1998) Mapping the functional roles of cap cells in the response of Arabidopsis primary roots to gravity. *Plant Physiol* 116: 213-222.

- Blancaflor EB, Masson PH (2003) Plant gravitropism. Unraveling the ups and downs of a complex process. *Plant Physiol* 133: 1677-90.
- Boehning D, Patterson RL, Sedaghat L, Glebova NO, Kurosaki T, Snyder SH (2003b) Cytochrome c binds to inositol (1,4,5) trisphosphate receptors, amplifying calcium-dependent apoptosis. *Nat Cell Biol* 5: 1051-61.
- Botella JR, Arteca JM, Somodevilla M, Arteca RN (1996) Calcium-dependent protein kinase gene expression in response to physical and chemical stimuli in mungbean (*Vigna radiata*). *Plant Mol Biol* 30: 1129-37.
- Braun M, Buchen B, Sievers A (2002) Actomyosin-mediated statolith positioning in gravisensing plant cells studied in microgravity. *J Plant Growth Regul* 21: 137-145.
- Braun M, Hauslage J, Czogalla A, Limbach C (2004) Tip-localized actin polymerization and remodeling, reflected by the localization of ADF, profilin and villin, are fundamental for gravity-sensing and polar growth in characean rhizoids. *Planta* 219: 379-388.
- Braun M, Wasteneys GO (1998) Distribution and dynamics of the cytoskeleton in graviresponding protonemata and rhizoids of characean algae: exclusion of microtubules and a convergence of actin filaments in the apex suggest an actin-mediated gravitropism. *Planta* 205: 39-50.
- Briegleb W (1992). Some quantitative aspects of the fast-rotating clinostat as a research tool. *ASGSB Bull* 5: 23-30.
- Brock TG, Kapen EH, Ghosheh NS, Kaufman PB (1991) Dynamics of auxin movement in the gravistimulated leaf-sheath pulvinus of oat (*Avena sativa*). *J Plant Physiol* 138: 57-62.
- Brown DT (2001) Histone variants: are they functionally heterogeneous? *Genome Biol* 2(7): reviews0006.1-0006.6.
- Buchen B, Braun M, Hejnowicz Z, Sievers A (1993) Statoliths pull on microfilaments. Experiments under microgravity. *Protoplasma* 172: 38-42.
- Camoni L, Harper JF, Palmgren MG (1998) 14-3-3 proteins activate a plant calcium-dependent protein kinase (CDPK). *FEBS Lett* 430: 381-384.
- Campbell EM, Hope TJ (2003) Role of the cytoskeleton in nuclear import. *Adv Drug Deliv Rev* 55: 761-771.
- Caspar T, Pickard BG (1989) Gravitropism in a starchless mutant of *Arabidopsis*: implications for the starch-statolith theory of gravity sensing. *Planta* 177: 185-197.
- Catala C, Rose JK, Bennett AB (1997) Auxin regulation and spatial localization of an endo-1,4-beta-D-glucanase and a xyloglucan endotransglycosylase in expanding tomato hypocotyls. *Plant J* 12: 417-426.

Catala C, Rose JK, York WS, Albersheim P, Darvill AG, Bennett AB (2001) Characterization of a tomato xyloglucan endotransglycosylase gene that is down-regulated by auxin in etiolated hypocotyls. *Plant Physiol* 127: 1180-92.

Chester N, Marshak DR (1993) Dimethyl sulfoxide-mediated primer T_m reduction: a method for analyzing the role of renaturation temperature in the polymerase chain reaction. *Anal Biochem* 209: 284–290.

Chung J, Bachelder RE, Lipscomb EA, Shaw LM, Mercurio AM (2002) Integrin (alpha 6 beta 4) regulation of eIF-4E activity and VEGF translation: a survival mechanism for carcinoma cells. *J Cell Biol* 158: 165-174.

Clark EA, Brugge JS (1995) Integrins and signal transduction pathways: the road taken. *Science* 268: 233-239.

Cosgrove DJ, Li ZC (1993) Role of Expansin in Cell Enlargement of Oat Coleoptiles (Analysis of Developmental Gradients and Photocontrol). *Plant Physiol* 103: 1321-1328.

Cui D, Neill SJ, Tang Z, Cai W (2005) Gibberellin-regulated XET is differentially induced by auxin in rice leaf sheath bases during gravitropic bending. *J Exp Bot* 56: 1327-34.

Cui Y, Dinman JD, Kinzy TG, Peltz SW (1998) The Mof2/Sui1 protein is a general monitor of translational accuracy. *Mol Cell Biol* 18: 1506-16.

Cyert MS (2001) Regulation of nuclear localization during signaling. *J Biol Chem* 276: 20805-8.

Dasso M (2002) The Ran GTPase: theme and variations. *Curr Biol* 12: R502-508.

Davies KM, Seelye JF, Irving DE, Borst WM, Hurst PL, King GA (1996) Sugar regulation of harvest-related genes in asparagus. *Plant Physiol* 111: 877-883.

Davletova S, Meszaros T, Miskolczi P, Oberschall A, Torok K, Magyar Z, Dudits D, Deak M (2001) Auxin and heat shock activation of a novel member of the calmodulin like domain protein kinase gene family in cultured alfalfa cells. *J Exp Bot* 52(355): 215-221.

De Nisi P, Dell'Orto M, Pirovano L, Zocchi G (1999) Calcium-dependent phosphorylation regulates the plasma-membrane H(+)-ATPase activity of maize (*Zea mays* L.) roots. *Planta* 209: 187-194.

Denti S, Sirri A, Cheli A, Rogge L, Innamorati G, Putignano S, Fabbri M, Pardi R, Bianchi E (2004) RanBPM is a phosphoprotein that associates with the plasma membrane and interacts with the integrin LFA-1. *J Biol Chem* 279(13): 13027-13034.

Devoto A, Nieto-Rostro M, Xie D, Ellis C, Harmston R, Patrick E, Davis J, Sherratt L, Coleman M, Turner JG (2002) COI1 links jasmonate signalling and fertility to the SCF ubiquitin-ligase complex in *Arabidopsis*. *Plant J* 32: 457-466.

Dharmasiri N, Dharmasiri S, Estelle M (2005) The F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature* 435: 441-445.

- Dirks RW, Raap AK (1995) Cell-cycle-dependent gene expression studied by two-colour fluorescent detection of a mRNA and histone mRNA. *Histochem Cell Biol* 104: 391-395.
- Dolan L, Davies J (2004) Cell expansion in roots. *Curr Opin Plant Biol* 7: 33-39.
- Faik A, Price NJ, Raikhel NV, Keegstra K (2002) An Arabidopsis gene encoding an alpha-xylosyltransferase involved in xyloglucan biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 7797-802.
- Fasano JM, Swanson SJ, Blancaflor EB, Dowd PE, Kao Th, Gilroy S (2001) Changes in Root Cap pH Are Required for the Gravity Response of the Arabidopsis Root. *Plant Cell* 13(4): 907-922.
- Firn RD, Wagstaff C, Digby J (2000) The use of mutants to probe models of gravitropism. *J Exp Bot* 51(349): 1323-40.
- Frias I, Caldeira MT, Perez-Castineira JR, Navarro-Avino JP, Culianez-Macia FA, Kuppinger O, Stransky H, Pages M, Hager A, Serrano R (1996) A major isoform of the maize plasma membrane H(+)-ATPase: characterization and induction by auxin in coleoptiles. *Plant Cell* 8: 1533-44.
- Friml J, Wisniewska J, Benkova E, Mendgen K, Palme K (2002) Lateral relocation of auxin efflux regulator PIN3 mediates tropism in Arabidopsis. *Nature* 415(6873): 806-809.
- Friml J (2003) Auxin transport - shaping the plant. *Curr Opin Plant Biol* 6: 7-12.
- Fukaki H, Wysocka-Diller J, Kato T, Fujisawa H, Benfey PN, Tasaka M (1998) Genetic evidence that the endodermis is essential for shoot gravitropism in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 14: 425-430.
- Gao MJ, Parkin I, Lydiate D, Hannoufa A (2004) An auxin-responsive scarecrow-like transcriptional activator interacts with histone deacetylase. *Plant Mol Biol* 55: 417-431.
- Geldner, N, Friml, J, Stierhof Y D, Jurgens G, and Palme K (2001) Auxin transport inhibitors block PIN1 cycling and vesicle trafficking. *Nature* 413: 425-428.
- Gendreau E, Traas J, Desnos T, Grandjean O, Caboche M, Hofte H (1997) Cellular basis of hypocotyl growth in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* 114: 295-305.
- Giannakakou P, Sackett DL, Ward Y, Webster KR, Blagosklonny MV, Fojo T (2000) p53 is associated with cellular microtubules and is transported to the nucleus by dynein. *Nat Cell Biol* 2: 709-717.
- Gorrini C, Loreni F, Gandin V, Sala LA, Sonenberg N, Marchisio PC, Biffo S (2005) Fibronectin controls cap-dependent translation through beta1 integrin and eukaryotic initiation factors 4 and 2 coordinated pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 9200-5.
- Greenberg ME, Belasco JG (1993) in *Control of Messenger RNA Stability* (Belasco, J. G., and Brawerman, G., eds) Academic Press, Inc., San Diego, CA 199-218.

- Gutierrez, RA., Ewing, RM, Cherry, JM, Green, PJ (2002) Identification of unstable transcripts in Arabidopsis by cDNA microarray analysis: Rapid decay is associated with a group of touch- and specific clock-controlled genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 11513-11518.
- Hagen G, Guilfoyle T (2002) Auxin-responsive gene expression: genes, promoters and regulatory factors. *Plant Mol Biol* 49: 373-85.
- Hager A, Debus G, Edel HG, Stransky H, Serrano R (1991) Auxin induces exocytosis and the rapid synthesis of a high-turnover pool of plasma-membrane H⁺-ATPase. *Planta* 185 (4): 527-537.
- Harel A, Forbes DJ (2004) Importin beta: conducting a much larger cellular symphony. *Mol Cell* 16(3): 319-330.
- Hargrove JL, Hulsey MG, Beale EG (1991) The kinetics of mammalian gene expression. *Bioessays* 13: 667-74.
- Harmon AC, Putnam-Evans C, Cormier MJ (1987) A calcium-dependent but calmodulin-independent protein kinase from soybean. *Plant Physiol* 83: 830-837.
- Harmon AC, Gribskov M, Harper JF (2000) CDPKs: a kinase for every Ca²⁺ signal? *Trends Plant Sci* 5: 154-159.
- Hayashi T, Matsuda K (1981) Biosynthesis of xyloglucan in suspension-cultured soybean cells. Occurrence and some properties of xyloglucan 4-beta-D-glucosyltransferase and 6-alpha-D-xylosyltransferase. *J Biol Chem* 256: 11117-22.
- Heilmann I, Shin J, Huang J, Perera IY, Davies E (2001) Transient dissociation of polyribosomes and concurrent recruitment of calreticulin and calmodulin transcripts in gravistimulated maize pulvini. *Plant Physiol* 127(3): 1193-203.
- Holcik M, Sonenberg N (2005) Translational control in stress and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6: 318-327.
- Horvath DP, Chao WS, Anderson JV (2002) Molecular analysis of signals controlling dormancy and growth in underground adventitious buds of leafy spurge. *Plant Physiol* 128: 1439-46.
- Hrabak EM (2000) Calcium-dependent protein kinases and their relatives. In M Kreis, JC Walker, eds, *Advances in Botanical Sciences, Plant Protein Kinases, Vol 32*. Academic Press, New York 185-223.
- Ingber D (1999) How cells (might) sense microgravity. *Faseb J* 13: 3-15.
- Ishikawa H, Evans ML (1993) The role of the distal elongation zone in the response of maize roots to auxin and gravity. *Plant Physiol* 102: 1203-10.
- Itano N, Okamoto S, Zhang D, Lipton SA, Ruoslahti E (2003) Cell spreading controls endoplasmic and nuclear calcium: a physical gene regulation pathway from the cell surface to the nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(9): 5181-5186.

Iwabuchi M (1994) Annual report. Division of developmental biology. www.nibb.ac.jp/annual_report/1994/16.html

Jackson RG, Lim EK, Li Y, Kowalczyk M, Sandberg G, Hoggett J, Ashford DA, Bowles DJ (2001) Identification and biochemical characterization of an Arabidopsis indole-3-acetic acid glucosyltransferase. *J Biol Chem* 276: 4350-6.

Jackson RG, Kowalczyk M, Li Y, Higgins G, Ross J, Sandberg G, Bowles DJ (2002) Over-expression of an Arabidopsis gene encoding a glucosyltransferase of indole-3-acetic acid: phenotypic characterisation of transgenic lines. *Plant J* 32: 573-83.

Johannes E, Collings DA, Rink JC, Allen NS (2001) Cytoplasmic pH dynamics in maize pulvinal cells induced by gravity vector changes. *Plant Physiol* 127: 119-30.

Joo JH, Bae YS, Lee JS (2001) Role of auxin-induced reactive oxygen species in root gravitropism. *Plant Physiol* 126(3): 1055-60.

Kalra G, Bhatla SC (1999) Distribution of membrane-bound calcium and activated calmodulin in cultured protoplasts of sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Current Science* 76: 1580-1584.

Kanzaki M, Nagasawa M, Kojima I, Sato C, Naruse K, Sokabe M, Iida H (1999) Molecular identification of a eukaryotic, stretch-activated nonselective cation channel. *Science* 285(5429): 882-886.

Kepinski S, Leyser O (2005) The Arabidopsis F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature* 435: 446-51.

Keryer G, Di Fiore B, Celati C, Lehtreck KF, Mogensen M, Delouvee A, Lavia P, Bornens M, Tassin AM (2003) Part of Ran is associated with AKAP450 at the centrosome: involvement in microtubule-organizing activity. *Mol Biol Cell* 14: 4260-71.

Kim D, Kaufman PB (1995) Basis for changes in the auxin-sensitivity of *Avena sativa* (oat) leaf-sheath pulvini during the gravitropic response. *J Plant Physiol* 145(1/2): 113-120.

Kim SH, Arnold D, Lloyd A, Roux SJ (2001a) Antisense expression of an Arabidopsis ran binding protein renders transgenic roots hypersensitive to auxin and alters auxin-induced root growth and development by arresting mitotic progress. *Plant Cell* 13(12): 2619-2630.

Kim YS, Min JK, Kim D, Jung J (2001b) A soluble auxin-binding protein, ABP57. Purification with anti-bovine serum albumin antibody and characterization of its mechanistic role in the auxin effect on plant plasma membrane H⁺-ATPase. *J Biol Chem* 276(14):10730-6.

Kimbrough JM, Salinas-Mondragon R, Boss WF, Brown CS, Sederoff HW (2004) The fast and transient transcriptional network of gravity and mechanical stimulation in the Arabidopsis root apex. *Plant Physiol* 136(1): 2790-2805.

Kimbrough JM, Brown CS, Sederoff HW (2005) Co-expression and hormonal regulation of genes in response to gravity and mechanical stimulation in the Arabidopsis root apex. *Gravit Space Biol Bull* 18: 117-118.

- Kirsh O, Seeler JS, Pichler A, Gast A, Muller S, Miska E, Mathieu M, Harel-Bellan A, Kouzarides T, Melchior F, Dejean A (2002) The SUMO E3 ligase RanBP2 promotes modification of the HDAC4 deacetylase. *Embo J* 21: 2682-91.
- Kiss JZ, Hertel R, Sack FD (1989) Amyloplasts are necessary for full gravitropic sensitivity in roots of *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 177: 198-206.
- Kiss JZ, Wright JB, Caspar T (1996) Gravitropism in roots of intermediate-starch mutants of *Arabidopsis*. *Physiol Plant* 97(2): 237-244.
- Konishi H, Yamane H, Maeshima M, Komatsu S (2004) Characterization of fructose-bisphosphate aldolase regulated by gibberellin in roots of rice seedling. *Plant Mol Biol* 56: 839-848.
- Kriegs B, Theisen R, Schnabl H (2006) Ins(1,4,5)P₃ and Ran expression during simulated and real microgravity. *Protoplasma* (accepted).
- Kuo MH, Allis CD (1998) Roles of histone acetyltransferases and deacetylases in gene regulation. *Bioessays* 20: 615-626.
- Lam MH, Thomas RJ, Loveland KL, Schilders S, Gu M, Martin TJ, Gillespie MT, Jans DA (2002) Nuclear transport of parathyroid hormone (PTH)-related protein is dependent on microtubules. *Mol Endocrinol* 16(2): 390-401.
- Latha R, Hosseini Salekdeh G, Bennett J, Swaminathan MS (2004) Molecular analysis of a stress-induced cDNA encoding the translation initiation factor, *eIF1*, from the salt-tolerant wild relative of rice, *Porteresia coarctata* *Functional Plant Biology* 31(10): 1035-1042.
- Lawson TG, Lee KA, Maimone MM, Abramson RD, Dever TE, Merrick WC, Thach RE (1989) Dissociation of double-stranded polynucleotide helical structures by eukaryotic initiation factors, as revealed by a novel assay. *Biochemistry* 28(11): 4729-4734.
- Leblanc N, Perrot-Rechenmann C, Barbier-Brygoo H (1999) The auxin-binding protein Nt-ERabp1 alone activates an auxin-like transduction pathway. *FEBS Lett* 449: 57-60.
- Lee HY, Bahn SC, Kang YM, Lee KH, Kim HJ, Noh EK, Palta JP, Shin JS, Ryu SB (2003) Secretory low molecular weight phospholipase A2 plays important roles in cell elongation and shoot gravitropism in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 15: 1990-2002.
- Lenne P, Chupeal M (1983) Isolation and culture of sunflower protoplasts. *Plant Science Letters* 30: 297-301.
- Leyser O (2002) Molecular genetics of auxin signaling. *Annu Rev Plant Biol* 53: 377-98.
- Li H, Shen SS, Xu ZH, Xue HW (2003) [Isolation and expression pattern analysis of rice auxin-induced *eIF3a* coding gene]. *Shi Yan Sheng Wu Xue Bao* 36: 54-60.
- Liang P, Pardee AB (1997) Differential display. A general protocol. *Methods Mol Biol* 85: 3-11.

- Lino B, Baizabal-Aguirre VM, Gonzalez de la Vara LE (1998) The plasma-membrane H(+)-ATPase from beet root is inhibited by a calcium-dependent phosphorylation. *Planta* 204: 352-359.
- Loescher W, Nevins DJ (1972) Auxin-induced Changes in Avena Coleoptile Cell Wall Composition *Plant Physiol.* 50: 556-563.
- Lu M, Sautin YY, Holliday LS, Gluck SL (2004) The glycolytic enzyme aldolase mediates assembly, expression, and activity of vacuolar H⁺-ATPase. *J Biol Chem* 279: 8732-9.
- Luger K, Mader AW, Richmond RK, Sargent DF, Richmond TJ (1997) Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* 389: 251-60.
- Lynch TM, Lintilhac PM, Domozych D (1998) Mechanotransduction molecules in the plant gravisensory response: amyloplast/statolith membranes contain a beta 1 integrin-like protein. *Protoplasma* 201: 92-100.
- Martin RC, Mok MC, Habben JE, Mok DW (2001) A maize cytokinin gene encoding an O-glucosyltransferase specific to cis-zeatin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 5922-6.
- Martinec J, Feltl T, Scanlon CH, Lumsden PJ, Machackova I (2000) Subcellular localization of a high affinity binding site for D-myo-inositol 1,4,5-trisphosphate from *Chenopodium rubrum*. *Plant Physiol* 124: 475-83.
- Masson PH (1995) Root gravitropism. *Bioessays* 17(2): 119-127.
- Matsuyama A, Shimazu T, Sumida Y, Saito A, Yoshimatsu Y, Seigneurin-Berny D, Osada H, Komatsu Y, Nishino N, Khochbin S, Horinouchi S, Yoshida M (2002) In vivo destabilization of dynamic microtubules by HDAC6-mediated deacetylation. *Embo J* 21: 6820-31.
- Matzke MA, Mette MF, Matzke AJ (2000) Transgene silencing by the host genome defense: implications for the evolution of epigenetic control mechanisms in plants and vertebrates. *Plant Mol Biol* 43: 401-15.
- McClure BA, Guilfoyle T (1989) Rapid redistribution of auxin-regulated RNAs during gravitropism. *Science* 243: 91-3.
- McClure BA, Hagen G, Brown CS, Gee MA, Guilfoyle TJ (1989) Transcription, organization, and sequence of an auxin-regulated gene cluster in soybean. *Plant Cell* 1(2): 229-239.
- McKinsey TA, Zhang CL, Lu J, Olson EN (2000a) Signal-dependent nuclear export of a histone deacetylase regulates muscle differentiation. *Nature* 408(6808): 106-111.
- Melchior F, Paschal B, Evans J, Gerace L (1993) Inhibition of nuclear protein import by nonhydrolyzable analogues of GTP and identification of the small GTPase Ran/TC4 as an essential transport factor. *J. Cell Biol.* 123: 1649-1659.
- Merkle T, Haizel T, Matsumoto T, Harter K, Dallmann G, Nagy F (1994) Phenotype of the fission yeast cell cycle regulatory mutant *pim1-46* is suppressed by a tobacco cDNA encoding a small, Ran-like GTP-binding protein. *Plant J* 6: 555-565.

- Merkle T (2001) Nuclear import and export of proteins in plants: a tool for the regulation of signalling. *Planta* 213(4): 499-517.
- Merkle T (2003) Nucleo-cytoplasmic partitioning of proteins in plants: implications for the regulation of environmental and developmental signalling. *Curr Genet* 44(5): 231-260.
- Merkys A, Darginaviciene J (1997) Plant gravitropic response. *Adv Space Biol Med.* 6: 213-230.
- Migliaccio F, Piconese S, Faggiano M, Rosi C (2002) Understanding the gravitropic response of plants through the study of new arabidopsis mutants and the random positioning machine. *J Gravit Physiol* 9: 217-218.
- Miyazawa Y, Sakai A, Miyagishima S, Takano H, Kawano S, Kuroiwa T (1999) Auxin and Cytokinin Have Opposite Effects on Amyloplast Development and the Expression of Starch Synthesis Genes in Cultured Bright Yellow-2 Tobacco Cells. *Plant Physiol.* 121: 461-470.
- Mockaitis K, Howell SH (2000) Auxin induces mitogenic activated protein kinase (MAPK) activation in roots of Arabidopsis seedlings. *Plant J* 24: 785-796.
- Monshausen GB, Zieschang HE, Sievers A (1996) Differential proton secretion in the apical elongation zone caused by gravistimulation is induced by a signal from the root cap. *Plant Cell Environ* 19: 1408-14.
- Moore MS, Blobel G (1993) The GTP-binding protein Ran/TC4 is required for protein import into the nucleus. *Nature* 365: 661-663.
- Moore MS, Blobel G (1994) A G protein involved in nucleocytoplasmic transport: the role of Ran. *Trends Biol. Sci.* 19: 211-216.
- Morre DJ, Brightman AO (1991) NADH oxidase of plasma membranes. *J Bioenerg Biomembr* 23: 469-489.
- Morita MT, Kato T, Nagafusa K, Saito C, Ueda T, Nakano A, Tasaka M (2002) Involvement of the vacuoles of the endodermis in the early process of shoot gravitropism in Arabidopsis. *Plant Cell* 14: 47-56.
- Morsomme P, Boutry M (2000) The plant plasma membrane H(+)-ATPase: structure, function and regulation. *Biochim Biophys Acta* 1465: 1-16.
- Moseyko N, Zhu T, Chang HS, Wang X, Feldman LJ (2002) Transcription profiling of the early gravitropic response in Arabidopsis using high-density oligonucleotide probe microarrays. *Plant Physiol* 130(2): 720-8.
- Muday GK (2000) Maintenance of asymmetric cellular localization of an auxin transport protein through interaction with the actin cytoskeleton. *J of Plant Growth Reg* 19: 385-396.
- Muday GK, Murphy AS (2002) An emerging model of auxin transport regulation. *Plant Cell* 14: 293-9.

- Munnik T, Irvine RF, Musgrave A (1998) Phospholipid signaling in plants. *Biochim Biophys Acta* 1389: 222-272.
- Murfett J, Wang XJ, Hagen G, Guilfoyle TJ (2001) Identification of Arabidopsis histone deacetylase HDA6 mutants that affect transgene expression. *Plant Cell* 13(5): 1047-61.
- Müller G (2000) Die Signaltransduktion über Inositol-1,4,5-trisphosphat in Sonnenblumen-Hypokotylprotoplasten am Beispiel des Schwerkraftreizes Bonn, Univ., Diss., 2004.
URN: urn:nbn:de:hbz:5n-00178.
URL: http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online/landw_fak/2000/mueller_georg
- Müller G, Schnabl H (2001) Signal transduction during graviresponse in sunflower hypocotyls (*Helianthus annuus* L.). 2nd Pan Pacific Basin Workshop on Microgravity Sciences. Paper BT-1023.
- Napier RM (2005) TIRs of joy: new receptors for auxin. *Bioessays* 27: 1213-7.
- Neale D, Blomstedt CK, Bronson P, Le TN, Guthridge K, Evans J, Gaff DF, Hamill JD (2000) The isolation of genes from the resurrection grass *Sporobolus stapfianus* which are induced during severe drought stress *Plant, Cell & Environment* 23: 265.
- Nemergut ME, Mizzen CA, Stukenberg T, Allis CD, Macara IG (2001) Chromatin docking and exchange activity enhancement of RCC1 by histones H2A and H2B. *Science* 292: 1540-3.
- Newman TC, Ohme-Takagi M, Taylor CB, Green PJ (1993) DST sequences, highly conserved among plant SAUR genes, target reporter transcripts for rapid decay in tobacco. *Plant Cell* 5: 701-714.
- Noh B, Bandyopadhyay A, Peer WA, Spalding EP, Murphy AS (2003) Enhanced gravi- and phototropism in plant *mdr* mutants mislocalizing the auxin efflux protein PIN1. *Nature* 423: 999-1002.
- Palmieri M, Kiss JZ (2005) Disruption of the F-actin cytoskeleton limits statolith movement in Arabidopsis hypocotyls. *J Exp Bot* 56: 2539-50.
- Parker KE, Briggs WR (1990) Transport of indole-3-acetic acid during gravitropism in intact maize coleoptiles. *Plant Physiol* 94: 1763-1768.
- Paschal BM, Gerace L (1995) Identification of NTF2, a cytosolic factor for nuclear import that interacts with nuclear pore complex protein p62. *J. Cell Biol* 129: 925-937.
- Pasternak T, Potters G, Caubergs R, Jansen MA (2005) Complementary interactions between oxidative stress and auxins control plant growth responses at plant, organ, and cellular level. *J Exp Bot* 56: 1991-2001.
- Pei ZM, Ward JM, Harper JF, Schroeder JI (1996) A novel chloride channel in *Vicia faba* guard cell vacuoles activated by the serine/threonine kinase, CDPK. *Embo J* 15: 6564-74.
- Perbal G, Driss-Ecole D (2003) Mechanotransduction in gravisensing cells. *Trends Plant Sci* 8: 498-504.

- Perbal G, Driss-Ecole D (1994) Transduction of the gravity stimulus in the root statocyte. *Adv Space Res.* 14(8): 11-9.
- Perera IY, Heilmann I, Boss WF (1999) Transient and sustained increases in inositol 1,4,5-trisphosphate precede the differential growth response in gravistimulated maize pulvini. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(10): 5838-5843.
- Perera IY, Heilmann I, Chang SC, Boss WF, Kaufman PB (2001) A role for inositol 1,4,5-trisphosphate in gravitropic signaling and the retention of cold-perceived gravistimulation of oat shoot pulvini. *Plant Physiol* 125(3): 1499-1507.
- Peterson CL, Laniel MA (2004) Histones and histone modifications. *Curr Biol* 14: R546-51.
- Pichler A, Gast A, Seeler JS, Dejean A, Melchior F (2002) The nucleoporin RanBP2 has SUMO1 E3 ligase activity. *Cell* 108: 109-20.
- Plieth C, Trewavas AJ (2002) Reorientation of seedlings in the earth's gravitational field induces cytosolic calcium transients. *Plant Physiol* 129: 786-96.
- Potikha TS, Collins CC, Johnson DI, Delmer DP, Levine A (1999) The involvement of hydrogen peroxide in the differentiation of secondary walls in cotton fibers. *Plant Physiol* 119: 849-58.
- Putman-Evans C, Harmon AC, Palevitz BA, Fechheimer M, Cormier MJ (1989) Calcium-dependent protein kinase is localized with F-actin in plant cells. *Cell Motility and the Cytoskeleton* 12: 12-22.
- Ranjeva R, Graziana A, Mazars C (1999) Plant graviperception and gravitropism: a newcomer's view. *FASEB J* 13: 135-141.
- Rao GN (2000) Oxidant stress stimulates phosphorylation of eIF4E without an effect on global protein synthesis in smooth muscle cells. Lack of evidence for a role of H₂O₂ in angiotensin II-induced hypertrophy. *J Biol Chem* 275: 16993-9.
- Rayle DL, Cleland RE (1992) The Acid Growth Theory of auxin-induced cell elongation is alive and well. *Plant Physiol* 99: 1271-4.
- Reichheld JP, Vernoux T, Lardon F, Van Montagu M, Inzé D (1999) Specific checkpoints regulate plant cell cycle progression in response to oxidative stress. *Plant J* 17: 647-656.
- Reuzeau C, Doolittle KW, McNally JG, Pickard BG (1997) Covisualization in living onion cells of putative integrin, putative spectrin, actin, putative intermediate filaments, and other proteins at the cell membrane and in an endomembrane sheath. *Protoplasma* 199: 173-97.
- Ribichich KF, Tioni MF, Chan RL, Gonzalez DH (2001) Cell-type-specific expression of plant cytochrome c mRNA in developing flowers and roots. *Plant Physiol* 125: 1603-10.
- Richter PR, Streb C, Ntefidou M, Lebert M, Häder DP (2003) High light-induced sign change of gravitaxis in the flagellate *Euglena gracilis* is mediated by reactive oxygen species. *Acta Protozool* 42: 197-204.

- Roberts DM, Harmon AC (1992) Calcium-modulated proteins: targets of intracellular calcium signals in higher plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 43: 375-414.
- Rose J, Likhovotvorik R, Hoyt DG (2005) Role Of Histone H3 Acetylation In The Effects Of Integrin-Engagement On Histone-Promoter DNA Interaction In Murine Lung Endothelial Cells. *Mol Pharmacol* 68: 439-446.
- Ross J, Li Y, Lim E, Bowles DJ (2001) Higher plant glycosyltransferases. *Genome Biol* 2: Reviews3004.
- Sack FD (1987) The structure of the stem endodermis in etiolated pea seedlings. *Can J Bot*. 65(7): 1514-9.
- Sack FD (1991) Plant gravity sensing. *Int Rev Cytol* 127: 193-252.
- Sack FD (1997) *Planta*. Plastids and gravitropic sensing. 203(1): 63-8.
- Sakurai M, Pak JY, Muramatsu Y, Fukuhara T (2004) Integrin-like protein at the invaginated plasma membrane of epidermal cells in mature leaves of the marine angiosperm *Zostera marina* L. *Planta* 220: 271-7.
- Schmidt W, Galland P (2000) Gravity-induced absorbance changes in *Phycomyces*: a novel method for detecting primary responses of gravitropism. *Planta* 210(5): 848-52.
- Schmidt W, Galland P (2004) Optospectroscopic detection of primary reactions associated with the graviperception of *Phycomyces*. Effects of micro- and hypergravity. *Plant Physiol* 135: 183-92.
- Schmitz P, Schnabl H (1989) Regeneration and evacuation of protoplasts from mesophyll, hypocotyl and petioles from *Helianthus annuus* L.. *Journal of Plant Physiology* 155: 223-227.
- Schnabl H (2001) *Biotechnology in Space*. In: Rehm H-J, Reed G (eds) *Biotechnology*, 2nd Edition Vol. 10. Wiley-VCH Verlag, Weinheim 507-521.
- Schnabl H (2002) Gravistimulated Effects in Plants. Horneck G (ed.) In: *Astrobiology, The Quest for the Conditions of Life*, Springer Verlag 297-313.
- Scott AC, Allen NS (1999) Changes in cytosolic pH within *Arabidopsis* root columella cells play a key role in the early signaling pathway for root gravitropism. *Plant Physiol* 121: 1291-8.
- Sedbrook JC, Chen R, Masson PH (1999) ARG1 (altered response to gravity) encodes a DnaJ-like protein that potentially interacts with the cytoskeleton. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(3):1140-5.
- Sederoff HW, Salinas-Mondragon R, Perera IY, Boss WF, Braun C-S (2004) The role of InsP₃ in transcriptional regulation of gravitropism. *ASGSB 2004 Annual Meeting Abstracts*.
- Sheen J (2001) Signal transduction in maize and *Arabidopsis* mesophyll protoplasts. *Plant Physiol* 127: 1466-75.

Sheikh MS, Fernandez-Salas E, Yu M, Hussain A, Dinman JD, Peltz SW, Huang Y, Fornace AJ, Jr. (1999) Cloning and characterization of a human genotoxic and endoplasmic reticulum stress-inducible cDNA that encodes translation initiation factor 1(eIF1(A121/SUI1)). *J Biol Chem* 274: 16487-93.

Sieberer T, Seifert GJ, Hauser MT, Grisafi P, Fink GR, Luschnig C (2000) Post-transcriptional control of the Arabidopsis auxin efflux carrier EIR1 requires AXR1. *Curr Biol* 10: 1595-8.

Sievers A, Buchen B, Volkmann D, Hejnowicz Z (1991) Role of the cytoskeleton in gravity perception. *In* CW Lloyd, eds, *The Cytoskeletal Basis of Plant Growth and Form*. Academic Press, London, pp 169-182.

Sievers A, Sondag C, Trebacz K, Hejnowicz Z (1995) Gravity induced changes in intracellular potentials in statocytes of cress roots. *Planta* 197: 392-8.

Simmons C, Migliaccio F, Masson P, Caspar T, Soll D (1995) A novel root gravitropism mutant of Arabidopsis thaliana exhibiting altered auxin physiology. *Physiol Plant* 93: 790-8.

Sinclair W, Trewavas AJ (1997) Calcium in gravitropism. A re-examination. *Planta* 203: S85-90.

Smith HM, Hicks GR, Raikhel NV (1997) Importin alpha from Arabidopsis thaliana is a nuclear import receptor that recognizes three classes of import signals. *Plant Physiol* 114: 411-7.

Smith HM, Raikhel NV (1998) Nuclear localization signal receptor importin alpha associates with the cytoskeleton. *Plant Cell* 10: 1791-9.

Staves MP (1997) Cytoplasmic streaming and gravity sensing in Chara internodal cells. *Planta* 203(1): 79-84.

Sun Y, Hegamyer G, Colburn NH (1994) Molecular cloning of five messenger RNAs differentially expressed in preneoplastic or neoplastic JB6 mouse epidermal cells: one is homologous to human tissue inhibitor of metalloproteinases-3. *Cancer Res* 54: 1139-44.

Swarup R, Kargul J, Marchant A, Zadik D, Rahman A, Mills R, Yemm A, May S, Williams L, Millner P, Tsurumi S, Moore I, Napier R, Kerr ID, Bennett MJ (2004) Structure-function analysis of the presumptive Arabidopsis auxin permease AUX1. *Plant Cell* 16: 3069-83.

Swatzell LJ, Edelmann RE, Makaroff CA, Kiss JZ (1999) Integrin-like proteins are localized to plasma membrane fractions, not plastids, in Arabidopsis. *Plant Cell Physiol* 40(2): 173-183.

Tariq M, Paszkowski J (2004) DNA and histone methylation in plants. *Trends Genet* 20: 244-51.

Theisen R (2005) Gravitrope Genexpression in *Helianthus annuus* L.. http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online/math_nat_fak/2005/theisen_ralf/index.htm

Tiwari SB, Wang XJ, Hagen G, Guilfoyle TJ (2001) AUX/IAA proteins are active repressors, and their stability and activity are modulated by auxin. *Plant Cell* 13: 2809-22.

- Tiwari SB, Hagen G, Guilfoyle T (2003) The roles of auxin response factor domains in auxin-responsive transcription. *Plant Cell* 15: 533-43.
- Tominaga R, Samejima M, Sakai F, Hayashi T (1999) Occurrence of cello-oligosaccharides in the apoplast of auxin-treated pea stems. *Plant Physiol* 119: 249-54.
- Trewavas AJ (1992) What remains of the Cholodny-Went theory? A summing up. *Plant Cell Environ* 15: 793-4.
- Trewavas A, Knight M (1994) Mechanical signalling, calcium and plant form. *Plant Mol Biol* 26: 1329-1341.
- Ulmasov T, Murfett J, Hagen G, Guilfoyle TJ (1997a) Aux/IAA proteins repress expression of reporter genes containing natural and highly active synthetic auxin response elements. *Plant Cell* 9(11):1963-71.
- Ulmasov T, Hagen G, Guilfoyle TJ (1997b) ARF1, a transcription factor that binds to auxin response elements. *Science* 276: 1865-8.
- Ulmasov T, Hagen G, Guilfoyle TJ (1999) Activation and repression of transcription by auxin-response factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(10): 5844-5849.
- Urao T, Katagiri T, Mizoguchi T, Yamaguchi-Shinozaki K, Hayashida N, Shinozaki K (1994) Two genes that encode Ca²⁺-dependent protein-kinases are induced by drought and high-salt stresses in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Genetics and Genomics* 244: 331-340.
- Venis MA, Napier RM (1990) Characterisation of auxin receptors. *Symp Soc Exp Biol* 44: 55-65.
- Volkman D, Baluska F, Lichtscheidl I, Driss-Ecole D, Perbal G (1999) Statoliths motions in gravity-perceiving plant cells: does actomyosin counteract gravity? *Faseb J* 13: 143-7.
- Waller F, Riemann M, Nick P (2002) A role for actin-driven secretion in auxin-induced growth. *Protoplasma* 219: 72-81.
- Wang AH, Yang XJ (2001) Histone deacetylase 4 possesses intrinsic nuclear import and export signals. *Mol Cell Biol* 21: 5992-6005.
- Wang N, Butler JP, Ingber DE (1993) Mechanotransduction across the cell surface and through the cytoskeleton. *Science* 260: 1124-7.
- Weijers D, Benkova E, Jager KE, Schlereth A, Hamann T, Kientz M, Wilmoth JC, Reed JW, Jurgens G (2005) Developmental specificity of auxin response by pairs of ARF and Aux/IAA transcriptional regulators. *Embo J* 24: 1874-85.
- Welsh J, Rampino N, McClelland M, Perucho M (1995) Nucleic acid fingerprinting by PCR-based methods: applications to problems in aging and mutagenesis. *Mutat Res* 338: 215-29.
- Xing H, Zhang S, Weinheimer C, Kovacs A, Muslin AJ (2000) 14-3-3 proteins block apoptosis and differentially regulate MAPK cascades. *Embo J* 19: 349-58.

- Xing T, Wang XJ, Malik K, Miki BL (2001) Ectopic expression of an Arabidopsis calmodulin-like domain protein kinase-enhanced NADPH oxidase activity and oxidative burst in tomato protoplasts. *Mol Plant Microbe Interact* 14: 1261-4.
- Xiong TC, Jauneau A, Ranjeva R, Mazars C (2004) Isolated plant nuclei as mechanical and thermal sensors involved in calcium signalling. *Plant J* 40(1): 12-21.
- Yoder TL, Zheng HQ, Todd P, Staehelin LA (2001) Amyloplast sedimentation dynamics in maize columella cells support a new model for the gravity-sensing apparatus of roots. *Plant Physiol* 125: 1045-60.
- Yoon GM, Cho HS, Ha HJ, Liu JR, Lee HS (1999) Characterization of NtCDPK1, a calcium-dependent protein kinase gene in *Nicotiana tabacum*, and the activity of its encoded protein. *Plant Mol Biol* 39: 991-1001.
- Yoon H, Donahue TF (1992) Control of translation initiation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* 6: 1413-9.
- Young LM, Evans ML, Hertel R (1990) Correlations between gravitropic curvature and auxin movement across gravistimulated roots of *Zea mays*. *Plant Physiol* 92: 792-6.
- Young LM, Evans ML (1996) Patterns of auxin and abscisic acid movement in the tips of gravistimulated primary roots of maize. *Plant Growth Regul* 20: 253-8.
- Zhao Y, Pokutta S, Maurer P, Lindt M, Franklin RM, Kappes B (1994) Calcium-binding properties of a calcium-dependent protein kinase from *Plasmodium falciparum* and the significance of individual calcium-binding sites for kinase activation. *Biochemistry* 33: 3714-21.
- Zheng HQ, Staehelin LA (2001) Nodal endoplasmic reticulum, a specialized form of endoplasmic reticulum found in gravity-sensing root tip columella cells. *Plant Physiol* 125: 252-65.
- Zhong W, Yeung ES (2003) High-throughput analysis of total RNA expression profiles by capillary gel electrophoresis. *Anal Chem* 75: 4415-22.

Abkürzungsverzeichnis

ABA	Abscisic Acid
ABP1	Auxin-bindendes Protein1
ACC	1-Aminocyclopropan-1-Carboxylase
ADF	Aktin depolymerisierender Faktor
Akt	Proteinkinase 3
AuxRE	Auxin-responsive Element
ARF	Auxin Response Factor
BSA	Bovine Serum Albumin
cDNA	copy DNA
CE	Kapillarelektrophorese
CDPK	Calcium-abhängige Proteinkinase
DNA	Desoxyribonucleic Acid
eIF	eukaryotischer Initiations-Faktor
FBPA	Fruktose-1,6-bisphosphat Aldolase
F (for)	forward
FM	Frishmasse
GA	Gibberellic Acid
GST	Glutathion-S-Transferase
HDAC	Histondeacetylase
hyperg	Hypergravitation
IAA	Indol-3-Essigsäure
Ins(1,4,5)P ₃	D <i>myo</i> Inositol-1,4,5-trisphosphat
µg	Mikrogravitation
MES	2-(N-Morpholino-) Ethansulforsäure
mRNA	messenger RNA
NES	nukleäres Export Signal
NLS	nukleäres Lokalisations Signal
NPC	Nuclear Pore Complex
PCR	Polymerase Chain Reaction
PI	Phosphatidylinositol PI-3K-Akt-Signalweges
PIP ₂	Phosphatidyl-4,5-phosphat
PM/H ⁺ -ATPase	Plasmamembran/H ⁺ -ATPase

RNA	Ribonucleic Acid
ROS	Reactive Oxygen Species
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkription Polymerase Chain Reaction
R (Rev)	reverse
SAUR	Small Auxin Up-regulated RNAs
TE	Tris-EDTA
TIR1	Transport Inhibitor Response 1
U	Unit
UV	ultraviolett
V-ATPase	vakuoläre ATPase

Anhang

Histon H3

>B02-270 bp

CCCGTAAGATCCGTAAGTACCAGAAGAGTACCAAGCTGCTAATCCGCAAATTGCC
GTTCCAGAGGCTTGTTCGTGAAATTGCTCAGGACTTCAAGACTGATCTGAGGTTTC
CAGAGCCATGCTGTGCTAGCTCTTCAGGAGGCAGCTGAGGCATATCTCGTTGGTC
TCTTTGAGGACACCAACCTGTGTGCCATTCATGCCAAGAGGGTGCACAATCATGCC
CAAGGACATCCAGCTCGCGAGGCGTATCCGTGGAGAGCGTGCTTAGGTTGTTTTG
AGTGCTTATCACAGATGAAGGTTTGTGTTGCCTTTGTCTGTTTCGTTTATTACTTAT
GCTAGATTCTGTTTGTAAATGTTTGGGAGTAAACTTGAACCAGAACCCTTCTATTGT
AGGATGTAAATTCTATACTGATAAGTTGTAAGATTTGGTAATATGTGGATAT
TAATGTGATAATGTGGTGTCTCTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

>B02-270 bp

RKIRKYQKSTKLLIRKLPFQRLVREIAQDFKTDLRFQSHAVLALQEAAEAYLVGLFED
TNLCAIHAKRVTIMPKDIQLARRIRGERA

Fruktose-1,6-bisphosphat Aldolase

>B02-339 bp

TGATCCGTGGAAAGTATCAAGGTGGTTCTGGTTTGAGTGAAGGTGCATCTGAAAG
CCTCCATGTTAAGGACTACAAGTACTAAACGTTGCTGCGTAAGTCTTCAGTACTA
TGTTTTTTTTTGGAGACATTTTTGTCTGAATGAGGTTGGTTGGATTTTGATTTTCTGG
ACCTATTTCTATGTTTGTTTTTTGTTTTAGACCTGTGGTTTAAATCCGAGTAGGAG
ATTTTTATAATAAGCATGAGTAACATTTCTGCTTGGTTTGATTGATATATACTTCT
GTTTGCTGCTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

>B02-339 bp

IRGKYQGGSGLSEGAESLHVKDYKY

Unbekannt

>B03-287

bp

CATCCCCCTGGAAGAAGAACAACACGACATTATTCATATTCATATCTTTCTGCAA
TAATATTATCCTGCAAATAAATGCATCACTGTAGAATCTTCAATCCTGACACCAC

AAGTACACGCATTGTATCCTCCTGATTAAATCCCATCAATTTCTTCACAAACCCTA
AACCCCCAAATCGCAAAAAGATTCTGCTGTTGATTATCAAGGGGACTGTTCAATT
GTTTGAGAATCTGCAAAAAAAAAAAAAAAAAA

Translations-Initiations-Faktor eIF1

>B04-505 bp

ATACTAATATTCTTCGGTCAATCTTCAATCTTGCCGTTGAGAGGAGACAGAGATTT
TCGTAATAATTATCTTAGTCCAGACGAAGTTCATGGTTGATATAGAAGTTCAGATC
CCATCTGCTTTCGATCCATTTGCTGACGTTGAACAAGATTCGGGCGGTGGTGCTG
GAGTGAAAGAGTATGTTTCATATCCGCATACAACAAAGAAATGGTAGGAAAAGCT
TGACAACAGTTCAGGGTCTGAAAAAGGAGCTCAGCTACGATAAAAATTCTCAAAG
ATCTCAAGAAAGAATTCTGCTGTAATGGCACTGTTGTGCAGGATAAAGAGCTTGG
TAAAGTGATCCAGCTTCAAGGCGATCAACGCAAGAACGTCTCTGCGTTCTTGAGC
CGTGCAGGTATTGTGAAGAAAGATCAGATCAAATTCATGGTTTTTGAAGACAAA
GTTTGTTGATTGAAAGTTTAGTTGTTTTACTTACTATTGATGCCTACTATAAATTCT
TGAATTCTGTTCTTGTTTTATGCTGTTTTTAAGTGATTGATATCATGAGTACCCGG
ATGATGTTTCATCAGTTTGTGGTTCATAATGAAATAAAAGTTCTCAGTGTTTTCAA
AAAAAAAAAAAAAAAA

B04-505 bp

MVDIEVQIPSAFDPFADVEQDSGGGAGVKEYVHIRIQQRNGRKSLLTVQGLKKELSY
DKILKDLKKEFCCNGTVVQDKELGKVIQLQGDQRKNVSAFLSRAGIVKKDQIKIHGF

Unbekannt

>B09-348 bp

TGGGGGACTCCGGTGGAGCTACTGCTGCTTATGATGATGATAATAGTAATCAACA
TATGGGGTTTAGACAGACAGGGTCTTTTAATTTGACTGGTAAGAAGATGAATTAT
AAAATGTTTTGAAAATGTCATCAGGAAAATAAAAATCTTAGGGTTCATGTTTGGT
AGTTGACTTCTTATGGACTACTTTAGTTTACTGGATTCGTATAGTTGGAGGGGTAGA
TTAACAGATGTAAATTCCTTGTATTGATGATCATATATGTGTTTTTACTTTGAAT
ACAAGTGTTTTATTACCAAAAAAAAAAAAAAAAAA

Unbekannt

>B10-365 bp

CTGCTGGGACCGCATTGTTTTGTGCTTCCTGGTCAACTATTACATTGATCTTACT
GCTTTCATCACAAACAAAAGGAGAAACCTTACTCTTAGTCTTAGCTTTAGATTTAG
ATCTTGTCGAGGCTTTAGAATTGGATTTTCCATTGAGGGCGACGCTAGCCTTGAC
AGCGAGTGCGGCCATTTTCGGAAGCGCTAAGAGGGTTGCGAAGTTTAGAAACGGG
TAAAACAAAATAAATCTGACCGGCATCAAGCTCGTCTTGGGCATCAAGAGGCGT
AATATGCTCGTCATAAGACAGGTTGTCTGAGTTGTAAAAAATAAAAAAAAAAAAAA

Ran

>B10-666 bp

ATGGACTGAAGGAGTAGAAAACCTCAAACCACAATCACAGCAGCAGCAGCAGCTT
TCTATATATACAGCATGGCTCTGCCGAATCAGCAAACCTGTTGATTACCCGAGTTTC
AAGCTTGTAATTGTCGGTGATGGTGGAACTGGAAAACTACTTTTGTGAAGAGAC
ACTTGACCGGAGAATTTGAGAAGAAATATGAACCAACCATTTGGTGTGAGGTTCA
TCCCTTGGATTTCTTCACCAATTGTGGAAAGATTCGGTTTTACTGCTGGGACACAG
CTGGACAGGAGAAATTTGGTGGTCTTCGTGATGGATATTATATTCACGGTCAATG
TGCCATTATCATGTTTGATGTAACCGCAAGATTGACTTACAAGAATGTTCCACAT
GGCATCGTGATCTTTGCCGTGTGTGTGAAAACATCCCAATCGTGCTTTGCGGTAA
CAAGGTTGATGTAAGAACCGTCAAGTGAAGGCAAAACAGGTTACTTTCCATAG
AAAGAAGAACCTGCAGTATTATGAGATCTCAGCCAAGAGCAATTACAACCTTTGA
GAAGCCATTTCTTTATCTCGCCCGGAACTTGCTGGAGACCCCAATTTGCATTTTG
TCGAGTCTCCTGCCCTTGCTCCTCCAGAAGTGCAAATAGACATGGCCGCACAACA
ACAGCATGAAGCAGAGCTTGCTGCAGCTGCTAGCCAGCCGCTTCCAGATGATGAT
GATGATGCTTTTGAATAGGGTCCAAAAGTTGAAGCGGATTTTATGAGGGTTTGTG
TCTGTTGAGTTTTGGATTGTTGAATGGTTTTATTATAAACGTTTGGTAGGATGCAG
TGAGGTTTGTGTTTGCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

>B10-666 bp

MALPNQQTVDYPSFKLVIVGDGGTGKTTFVKRHLTGEFEKKYEPTIGVEVHPLDFFT
NCGKIRFYCWDTAGQEKFGLRDGYIYGQCAIIMFDVTARLTYKNVPTWHRDLR
VCENIPIVLCGNKVDVKNRQVKAKQVTFHRKKNLQYYEISAKSNYNFEKPFLYLARK
LAGDPNLHFVESPALAPPEVQIDMAAQQQHEAELAAAASQPLPDDDDDAFE

beta-6-Xylosyltransferase

>B12-363 bp

GGTAGTAATCCTCTTGAAGTGAAGGATGAGCTCGGTTTGCTCCACCCTGTATATA
AAGCTGTTAAGGTATCGTCGTCTTGAAATAAACACGTTAGGAAGGAGAATTAGTT
GGTTGTTTTCACTTGCGAATTGGTATTGCGGTCTACATTATTTTGTATCGTTCTTTT
ATTCGTTGGATGTCATAGCTTGTTGATTGTATTGAATTTTTTCTTGTTATTAGCCAG
TTTATATGGAAAGGAAACAAAAAGCTTGAGCCCAAAAAAAAAAAAAAAAAA

>B12-363 bp

GSNPLEVKDELGLLHPVYKAVKVSSS

Histon H2B

>B16- 378 bp

GCTATGGGGATCATGAACTCGTTTATCAACGATATCTTCGAGAAGTTGGCGGCTG
AGGCTTCCAACTCGCCAGGTACAACAAGAAGAACACGCTTTCTTCAAGGGAAA
TCCAGACTGCTGTCAGGCTTGTCTTGCCTGGTGAGCTGGCCAAACATGCGGTTTCT
GAGGGGACTAAGGCTGTCACCAAGTTTACTAGCGGTTAGGTTTGTGTTTGGTA
TGTTTAGATCTGTAATTGGTTGTTTTTAAGAAGTCAAGTTCATATGCTTTATGAAC
TTTTGTTTTAGATGATTAAGTATTTTGCAAAAAAAAAAAAAAAAAA

>B16-378

NSFINDIFEKLAAEASKLARYNKKNTLSSREIQTAVRLVLPGELAKHAVSEGTKAVTK
FTSG

Histondeacetylase

>B18-241 bp

GAGTCGAAATTAAGTCGGATTCAACGCCGTTTCGGCTCAATCAGGGATGATTGT
GTTGGAAGGTGGTCACACTGACCACAAATCGGTTTCGAGTACTATGCAAGTTAAT
GGATTAGGAAATGGGGTGACGGAGAACAACGGTCATGATCAAGTTGTTGTA
GACGTAACAGCTGGCAAAAAGTATTCAGGGACACATGAAGACATGACTCTTGAG
GAAATGTACGCCAAAGATGGTGATTTTGTGACGAAGATGACAGTGATTGGGAC
CCCTTAGAAAACCATATAACAGTTCCCACATGGTTTTGTGTTAACTGTACGCTGGT
GAACCTTGATGGTGCTATCTATTGCCATATATGTGGAGAGCATAAAGAATCTGGA
ATCCTTAGGCATGGCTTTCTTGCATCGTCTTACATGAGGCAGATTCGGTTACAAA

TAAATCATTGGAACGCAACGGGAAATCAGAAGCTTCTTGCTCACAACTCTATGGCC
CCACATAAACTAACAGCTGTGGGTTTTGATGAGAGAATGTTGCTTCACTCTGAGG
TAAATGTTTTTTATTAAAAAATCATTGCCCATGATTATTTATCATTCTCAATGTT
CATGTAGCTCAAAAGGTAATTAGTTGGATACACATACTTGGTCTTTATTATAATGT
AGGTTGAAATGAAGTCACATCCCCATCCTGAAAGACCAGATCGTCTTCGAGCAAT
TGCTGCCAGCCTGGCAACAGCAGGTATATTTCTGGAAGATGCCGTTTCGATTTCA
GCAAGAGAAATTACGCGAGAAGAAGCTGCTGAGGGTTCCTCTGATGAAAATATT
AATTCGTTCCAATTTCAAGCCAATGCGTTGCTAGGTATGTTAAACAGTGACAAT
TAATAATAACCTCTACATTTAGCGTTGCCTCATTGTGTTTGTAGGTACGCTAAGT
AACGATTATTAAGCCGGTTACACTTGCTTGTATGTCAGTTATTTACACCTGATAC
TTATGCAAACAAAGATTCAGCACTCGCCGCAAGGCTGGCAGCGGGATTGTGTGCT
GATCTTGCTTCTGCCGTATATTCCGGGCGCGCTAAAAATGGGTTTGCTCTGGTGCG
TCCTCCAGGTCATCATGCTGGCGTAAAACATGCGATGGGATTCTGCCTTCACAAC
AATGCTGCAGTTGCTGCATCAGCCGCTCAGGCTGCAGGAGCGAAAAAAGTTTTAA
TTCTTGATTGGGATGTACACCATGGAAATGGCACTCAGGAAATATACGAGCAGAA
CAAACGGTGATTCTTGCAACCAATGATGTTACTTTCTTCAGCTCATTGATGATGT
GCTATATTAATAAAACATCTGTTTCCAATTATATTGATTTGTACAGGTTTTGTAT
GTATCTTTACATAGACATGAAGGTGGAAATTTTTATCCTGGTACTGGTGCAGCCC
ATGAGTTTGGTTCCATGGGTGGAGAAGGGTACTGTGTAACGTTCCATGGAGTCG
GGGCGGAGTCGGAGATAACGATTATATTTTTGCATTTGAGCATATCGTGCTTCCA
ATAGCCCGTGAGTTTGCTCCTGATTTTACAATCATTTTCAGCTGGATTTGATGCTGC
AAGGGGTGATCCACTTGGATGCTGTGATGTGACTCCTGTTGGTTATGCACAAATG
ACAAAATGCTGACTTCTTTATCTAAAGGAAAGTTGCTCGTTATCCTAGAGGGCG
GTTACAATCTCCGTTCAATATCATCATCAGCTACAGCAGTAATCAAGGTATTGCTT
GGTGAAAAACCCGAAAGCATGTTGGAGAATGTTGTACCGTCTAAATCTGGACTGC
GGACGGTTCTAGATGTTTTGAAGATACAGAACAATTTTTGGCCTATTCTAGGCCCT
ATCTTTTCAGATCTGCAATCGCGGTGGGGATCTTATGCTATTCAGGAAAAAAAAA
AAAAAA

>B18-241 bp

VEIKVGFNAVSAQSGMIVLEGGHTDHKSVSSTMQVNLGNGVTENNGHDQVVVTD
VTAGKKYSGTHEDMTLEEMYAKDGFDEDDSDWDPLENHITVPTWFCVNCTLVN
LDGAIYCHICGEHKESGILRHGFLASSLHEADSVTNKSLERNKSEASCSQSMAPHKL
TAVGFDERMLLHSEVNVFYPDRLRAIAASLATAGIFPGRCSISAREITREELLRVHSD

ENINSVQLSSQC VARYVKQFVQVLYVSLHRHEGGNFYPGTGAAHEFGSMGGEGYCV
NVPWSRGGVGDNDYIFA FEHIVLPIAREFAPDFTIISAGFDAARGDPLGCCDVTPVGY
AQMTKMLTSLSKGKLLVILEGGYNLRSISSSATAVIK VLLGEKPESMLENVVPSKSGL
RTVLDV LKIQNNFWPILGPIFSDLQSRWGSYAIQEKKKK

Cytochrom c

>D02-492 bp

AATTTTCTCTTTCAACACATAAAAACCGCTTTTCATCCCATTCCGAAAACCCTAAC
CCTCTCTCTCTCTCTAACCTCTCTACGCAACCTTCAATCGGCGATTCAATCTACAC
ACCGTAATGGCGTCTTTCGCGGAGGCTCCTGCCGGAATCCAACCACCGGTGAGA
AGATCTTCAAGACAAAGTGCGCTCAATGTCACACCGTTCGAGAAAGGCGCTGGTC
ACAAACAAGGACCCAACCTAAATGGACTGTTTGGAAGGCAGTCTGGAACCACTG
CTGGATATTCTTACTCTGCTGGTAACAAGAACAAGGCAGTTATCTGGGAGGAAAA
CACTTTGTACGACTACTTGTGTAACCCGAAGAAGTACATCCCTGGAACAAAGATG
GTTTTCCAGGACCGAAAAAGCCACAGGAGCGTGCAGATCTCATTGCATACTTGA
AGACATCCACAGCGTAATTTTTTCAATTACGTATTATAACACCATTTTGAAGTTCT
CTTGGTGATTTCGTGGTATTAGGAGATAACTTTGGATTATATTTTGATAAATAAGG
GGAGGACATTCATCAAATTTTATTACTCTCATCATTTTTTTGTTATTCAAATGGCAA
GAGCCTTTTTGTTCTTCAGACAGAAATTACTATGCGTTTGAAGTGATTGTTTTAC
ACCCCATAAAAAAAAAAAAAAAAA

>D02-492 bp

MASF AEAPAGNPTTGEKIFKTKCAQCHTVEKGAGHKQGP NLNGLFGRQSGTTAGYS
YSAGNKNKAVIWEENTLYDYLLNPKKYIPGTKMVFP GPKKPQERADLIAYLKTSTA

Calcium-abhängige Proteinkinase

>D19-405 bp

AAGCCCGTATTACGTTGCTCCGGAGGTTCTCTTGAAGCATTACGGTCCAGAAGCG
GATGTGTGGATCGCAAGGGTGATACTTTACATATTGCTCAGTGGTGTGCCCCCGT
TTTGGGCTGAAACACAACAAGGGATATTTGATGCGGTTTTGAAGGGATACATAGA
CTTTGAGTCGGACCCGTGGCCTCTTATATCTGACAGTGCAAAGGATCTTATTAGG
AAGATGTTATGCTCTCGACCGTCAGACCGCCTAACTGCTCATGAAGTTCTATGTC
ATCCTTGGATTTGTGAAAACGGTGTTGCTCCTGATAGAGCACTGGATCCAGCCGT
TCTTTCTCGTTTGAAGCAGTTCTCTGCAATGAACAAGTTAAAGAAAATGGCTTTGC

GGGTTATAGCCGAAAGCCTGTCTGAAGAGGAGATTGCTGGTTTGAGAGAGATGTT
CAAAGCGATGGATACTGATAACAGTGGTGCGATAACATTTGATGAACTGAAAGC
CGGTTTAAGGAAGTTCGGTTCCACGTTGAAAGATACAGAGATACGAGACCTTATG
GATGCAGCTGATGTGGACAACAGCGGTACGATTGATTACGGAGAATTTGTAGCTG
CTACTATACATCTGAACAAGCTGGAAAGAGAAGAACACCTTGTGGCTGCATTCCA
GTATTTTCGACAAGGATGGAAGCGGTTATATAACCGTCGACGAGCTCCAGCAAGCT
TGTGCGGATCACAATATGACTGATTTTCTTGTTGAGGATATCATCAAAGAAGTTG
ACCAAGATAACGATGGGAGAATCGATTATGGGGAATTTGTGGCGATGATGACCA
AAGGGAATGCAGGAGTTGGAAGAAGAACAATGCGCAACAGTCTGAATATAAGCA
TGAGAGATGCACCAGGGGCACTCTAGTAATTTCTTTCCACGTTCCGCCTACAGA
TTGTACAGCAGGATGAGTGAGAATAGGAGGTGTGGCAGTTAATTGGATGGGTCG
CGGATGTTTTAACGTTTGATCATATGCGTTTGTGTTGTGTTGTATTATTTCAAATGT
AAGAACTTAAAAGAGTGCACAGTTTCTTGTTGTCATTGCTGTTCAAATTCTTGTA
GTTGTACCCTTGGGACAACACTTGTTTAATTTAATAGCAGGTTGAATCAGTTAAA
AAAAAAAAAAAA

>D19-405 bp

SPYYVAPEVLLKHYGPEADVWIARVILYILLSGVPPFWAETQQGIFDAVLKGYIDFES
DPWPLISDSAKDLIRKMLCSRPSDRLTAHEVLCHPWICENGVAPDRALDPAVLSRLK
QFSAMNKLKKMALRVIAESLSEEEIAGLREMFKAMDNDNSGAITFDELKAGLRKFGS
TLKDTEIRDLMDAADVDNSGTIDYGEFVAATIHLNKLEREEHLVAAFQYFDKDGSGY
ITVDELQQACADHNMTDFLVEDIIKEVDQDNDGRIDYGEFVAMMTKGNAGVGRRT
MRNSLNISM RDAPGAL

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Molekulare Physiologie und Biotechnologie der Pflanzen der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität zu Bonn angefertigt.

Das Projekt wurde finanziert vom Deutschen Zentrum für Luft und Raumfahrt (DLR).

Mein herzlicher Dank gilt Frau Prof. Dr. H. Schnabl für die Überlassung des interessanten Themas sowie für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes.

Des Weiteren möchte ich Herrn Dr. K. Pillen für die freundliche Übernahme des Korreferates danken.

Besonders möchte ich mich bei Dr. Ralf Theisen bedanken, der mich in dieses Thema eingearbeitet hat und mir stets in allen Fragen zur Seite stand.

Weiterhin sei allen Mitarbeitern, Doktoranden und Diplomanden des Instituts für ihre Hilfsbereitschaft, Unterstützung und stets gute und freundschaftliche Arbeitsatmosphäre gedankt.