

Gravitrope Genexpression in

Helianthus annuus

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Ralf Theisen

aus

Kruft

Bonn 2005

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1. Referentin: Prof. Dr. H. Schnabl
2. Referent: Privatdozent Dr. M. Braun

Tag der Promotion: 2005

Inhalt

1. Einleitung	Seite 8
1.1. Signaltransduktion und Tropismen	Seite 9
1.1.1. Gravitropismus	Seite 9
1.1.2. Statolithen-Theorie	Seite 11
1.2. Gravitrope Genexpression und die Detektion differentiell exprimierter Gene	Seite 12
1.3. Ziel der Arbeit	Seite 14
2. Material & Methoden	Seite 16
2.1. Pflanzen	Seite 16
2.2. RNA-Extraktion	Seite 17
2.3. cDNA	Seite 20
2.3.1. Oligonukleotide als Primer für cDNA-Synthese	Seite 20
2.3.2. cDNA-Ansatz	Seite 22
2.3.3. cDNA-Synthese-Protokoll	Seite 23
2.4. PCR	Seite 24

2.4.1. Oligonukleotide als Primer für die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	Seite 24
2.4.2. PCR-Ansatz	Seite 28
2.4.3. PCR-Protokoll	Seite 29
2.5. Differential Display	Seite 31
2.5.1. Kapillar-Elektrophorese von Nukleinsäuren	Seite 31
2.5.1.1. Markierte Oligonukleotide als Primer für die Fragmentanalyse	Seite 33
2.6. Agarose-Gelelektrophorese	Seite 34
2.7. Reamplifikation	Seite 34
2.8. Klonierung in Plasmid-Vektor	Seite 35
2.9. Klon-Identifizierung	Seite 36
2.10. Sequenzierung	Seite 37
3. Ergebnisse	Seite 38
3.1. Multipler Differential Display	Seite 38
3.1.1. Differentielle Peaks	Seite 39
3.1.1.1. Differentielle Peaks mit Primer B-08-Mod	Seite 39

3.1.1.2. Differentielle Peaks mit Primer B-10-Mod	Seite 41
3.1.1.3. Differentielle Peaks mit Primer B-12-Mod	Seite 43
3.1.1.4. Differentielle Peaks mit Primer B-15-Mod	Seite 44
3.1.1.5. Differentielle Peaks mit Primer B-16-Mod	Seite 45
3.1.1.6. Differentielle Peaks mit Primer B-18-Mod	Seite 46
3.1.2. Licht-induzierte Kontrollen	Seite 47
3.1.3. Gravitrope Peaks	Seite 48
3.2. Reamplifikation der gravitropen cDNAs	Seite 49
3.3. Klon-Analysen	Seite 50
3.4. Sequenzen	Seite 52
4. Diskussion	Seite 55
4.1. Differential Display	Seite 55
4.2. Homologien identifizierter RT-PCR-Produkte und ihrer Sequenzen	Seite 55
4.2.1. Homologie-Betrachtungen und Alignments	Seite 55
4.2.2. Homologien der gravitrop exprimierten Sequenzen	Seite 57

4.3. Zusammenhang der gravitropen Genexpression mit der Signal-Transduktion	Seite 60
4.4. Zusammenfassung	Seite 63
5. Literaturverzeichnis	Seite 64
6. Anhang	Seite 81
6.1. Anhang, Teil 1: Alignment mit homologen GenBank-Einträgen	Seite 81
6.1.1. Alignment von B-10-Mod-666 mit homologen GenBank-Einträgen	Seite 81
6.1.2. Alignment von B-12-Mod-365 mit homologen GenBank-Einträgen	Seite 84
6.1.3. Alignment von B-16-Mod-384 mit homologen GenBank-Einträgen	Seite 88
6.1.4. Alignment von B-18-Mod-443 mit homologen GenBank-Einträgen	Seite 91
6.2. Anhang, Teil 2: GenBank-Einträge	Seite 96
6.2.1. B-10-Mod-666-homologe GenBank-Einträge	Seite 96
6.2.2. B-12-Mod-365-homologe GenBank-Einträge	Seite 97
6.2.3. B-16-Mod-384-homologe GenBank-Einträge	Seite 98

1. Einleitung

Diese Arbeit über die gravitrope Genexpression bei *Helianthus annuus* ist ein Beitrag zur Lösung der Frage, wie denn eigentlich höhere Pflanzen erkennen, in welche Richtung ihre Organe wachsen sollen, bzw. mit welchen Mitteln sie diese Erkenntnis in einen bestimmten Phänotyp umsetzen. Der pflanzliche Phänotyp ist nämlich nur zum einen Teil durch ein inneres, ontogenetisches Programm festgelegt, zum anderen Teil entsteht der Phänotyp durch die Reaktion auf äußere Reize. Gelegentlich fällt eine saubere Trennung dieser Effekte schwer, aber bei genauer Betrachtung lässt sich immer wieder erkennen, wo die Grenze zwischen festgelegtem Programm und Anpassung verläuft ("Autotropismus", Stankovic et al., 1998a, 1998b).

Diejenigen (Krümmungs-) Bewegungen der Pflanzen, deren Richtung - im Gegensatz zu den Nastien - durch einen äußeren Reiz bestimmt wird, werden Tropismen genannt. Sie ermöglichen dadurch den Pflanzen eine Anpassung an ihre Umwelt (Poff et al., 1994). Der Reiz kann unterschiedlicher Natur sein (Licht, chemische Gradienten, Gravitation etc.); entsprechend unterscheidet man Phototropismus, Chemotropismus, Gravitropismus und andere Tropismen. Teilweise nutzen die verschiedenen Tropismen gemeinsame Strukturen und Vorgänge, über die die verschiedenen Reize wahrgenommen, weitergeleitet (Reid und Howell, 1995) und in eine Reaktion umgesetzt werden, teilweise sind diese Vorgänge hoch-spezifisch. Die Wirkungen der spezifischen Stimuli kann man bis hin zur Protein-Expression mit molekularbiologischen Methoden verfolgen (Schnabl et al., 1996). Leider sind im Fall des Gravitropismus bisher derart wenige Komponenten der Signaltransduktion bekannt bzw. ausreichend charakterisiert, daß eine geschlossene gravitrope Signaltransduktionskette noch nicht identifiziert wurde (Redhead und Palme, 1996). Die vorliegende Arbeit soll einen Beitrag zur Komplettierung dieser offenen Kette leisten.

1.1. Signaltransduktion und Tropismen

Äussere Reize ("Signale") werden durch Rezeptoren wahrgenommen. Diese Rezeptoren müssen Bestandteile der Zelle sein, um die Signale auch an den weiteren Stoffwechsel der Zelle weitergeben zu können (Trewavas und Malho, 1997). Innerhalb der Zelle und auch darüber hinaus können die Signale auf vielen verschiedenen Wegen weitergegeben werden, z.B. über eine geregelte Freisetzung von Calcium (Bush, 1995), Protonen (Fasano et al., 2001; Schumacher et al., 1999; Scott et al, 1999) oder anderer "second messenger". Es werden möglicherweise Transkriptionsfaktoren aktiviert (Sakamoto et al., 1993) und das Cytoskelett oder die Zellwand verändert (Cosgrove, 1993). Schliesslich führen alle Wege in diesem Signaltransduktionsnetzwerk zu einem geänderten Phänotyp (Firn und Digby, 1980; Gendreau et al., 1997).

Es entspricht dem Charakter eines Netzwerks, dass ein spezifisch veränderter Phänotyp (z.B. eine vollturgeszente Zelle) nicht die einzige Folge der Signaltransduktion darstellen muss, sondern selber wieder Strukturen und Signale (z.B. eine gewisse Gewebs-Spannung) bereitstellt, um immer wieder eine Anpassung der Zellen und Gewebe an sich ändernde Bedingungen zu erlauben (Hejnowicz und Sievers, 1996; Kato et al., 2002a, 2002b; Maksimov et al, 2001; Morita et al, 2002; Peters und Tomos, 1996; Ramahaleo et al., 1996; Sukharev, 1999; Talbott und Pickard, 1994). Es entspricht weiterhin dem Netzwerk-Charakter, wenn sich die Effekte der verschiedenen Tropismen gegenseitig beeinflussen, weil sie ja zu einem großen Teil über gemeinsame Wege führen (Digby und Firn, 2002; Galland et al., 2002; Lu und Feldman, 1997; Orbovic und Poff, 1997).

1.1.1. Gravitropismus

Der Gravitropismus ermöglicht den Pflanzen die dauerhafte Ausrichtung am Schwerkraft-Vektor, so dass die Pflanzenorgane für ihre jeweilige Funktion optimal orientiert sind (Chen et al., 1999, 2002; Cosgrove, 1997; Evans, 1991; Evans und Ishikawa, 1997; Firn und Digby, 1997; Fisher und Tomlinson, 2002; Fukaki et al., 1996a;

Ge et al., 2000; Hemmersbach und Häder, 1999; Hensel, 1990; Iino et al., 1996; Ingber, 1999; Jourdan et al., 2000; Kiss, 1997; Mueller et al., 1984; Mullen et al., 2000; Pickard, 1985; Ranjeva et al., 1999; Rubio et al., 2001; Sliwinski und Salisbury, 1984; Wagner et al., 1997, 1998; Wolverton et al., 2002a, 2002b).

Wie auch andere Tropismen erfordert der Gravitropismus zunächst die Wahrnehmung eines spezifischen Reizes über spezifische Strukturen, den Rezeptoren. Diese Wahrnehmung wird auch als Gravi-Perzeption bezeichnet (Sack, 1991). Diese Perzeption setzt den Stimulus in physiologische Signale um, die innerhalb der Pflanze weitergeleitet werden (Signal-Transduktion) und schließlich zu einer Reaktion der Pflanze führen.

Die Rezeptor-Strukturen werden zwar in spezifischen Strukturen, unter anderem in den sogenannten Statolithen (Nemec, 1900; Haberlandt, 1900; Audus, 1962; Sievers et al., 1991; Barlow, 1995; Sack, 1997) vermutet, letztlich ist aber nicht erwiesen, ob diese Strukturen tatsächlich den Reiz perzipieren. Die Tatsache, dass auch stärkefreie Mutanten zur Graviperzeption fähig sind (Caspar und Pickard, 1989), zeigt deutlich, dass andere Strukturen als Stärke-Statolithen zumindest an der Wahrnehmung beteiligt, wenn nicht sogar dafür entscheidend sind.

Letztlich ist der gravitrope Rezeptor noch unbekannt. Einen einheitlichen Rezeptor gibt es vermutlich auch nicht, denn, wann immer ein neuer Kandidat für diese Funktion gefunden wurde, wurde früher oder später ein eindeutiges Beispiel dafür gefunden, dass die gravitrope Signaltransduktion auch ohne diesen "Rezeptor" funktioniert. Als Beispiel für diese Redundanz gravitroper Mechanismen sei hier nur die Existenz stärkefreier und dennoch gravitroper *Arabidopsis*-Mutanten vor dem Hintergrund der allgemein akzeptierten Stärke-Statolithen-Theorie (s. Abschnitt 1.1.2.) genannt

Ebenfalls ungeklärt ist der Weg, den die Signaltransduktion nimmt, um zur Reaktion der Pflanze zu führen. Für diverse Boten-Moleküle (Calcium, IP₃, Auxin, Phytohormone etc.) liegen Befunde vor, die deren Beteiligung an der gravitropen Signaltransduktion belegen (Berdy et al., 2001; Friedman et al., 1998; Fuglsang et al., 1999; Golan et al., 1996; Jones et al., 2000; Kato et al., 2002a, 2002b; Kim et al., 2000; Lu et al., 1997; Meskauskas und Maksimov, 2001; Montague, 1995; Perera et al., 2001; Rahman et al.,

2001; Sinclair und Trewavas, 1997). Aber es bleibt weithin unklar, wann, wie und wo diese Moleküle zur spezifischen Reaktion der Pflanze führen. Erschwert werden Untersuchungen unter anderem dadurch, dass die gravitrope Reaktion durch andere Tropismen (vor allem durch den Phototropismus) beeinflusst wird (Behringer und Lomax, 1999; Correll und Kiss, 2002; Gaiser und Lomax, 1993; Kern und Sack, 1999; Lamparter et al., 1998; Robson und Smith, 1996; Schmidt und Galland, 2000).

Die gravitrope Reaktion wird bei etiolierten *Helianthus annuus*-Sämlingen als Krümmung sichtbar, die aus einer differentiellen Streckung auf den physiologischen Ober- und Unterseiten folgt und schliesslich zur korrekten Ausrichtung der Pflanzen führt (Berg und Peacock, 1992; Gordon et al., 1984). Wenn man nach einer gravitropen Stimulation (z.B. durch Kippen einer Pflanze) die verfügbaren Bestandteile der Signaltransduktionskette (IP₃, H⁺-ATPase-Aktivität, Calcium etc.) untersucht, werden viele - offenbar gravitrop induzierte - Änderungen erkennbar (Müller und Schnabl, 2001). Unter Schwerelosigkeit (bei Raumfahrt-Experimenten oder simuliert im schnelldrehenden Klinostaten) können die Pflanzenzellen nicht mehr normal gravitrop reagieren. Dem folgt eine komplexe Änderung der Komponenten der gravitropen Signaltransduktion (Brown et al., 1996; Hunte et al., 1993; Johnsson et al., 1996; Schnabl et al., 1996). Weil die Wirkung dieser Änderungen dem veränderten Phänotyp einiger Mutanten von *Arabidopsis thaliana* entspricht, gilt die Analyse dieser Mutanten als vielversprechender Ansatz zur Entdeckung von Komponenten der gravitropen Signaltransduktionskette (Bullen et al., 1990; Firn et al., 2000; Ishikawa und Evans, 1997; Mullen et al., 1998).

1.1.2. Statolithen-Theorie

In der Mehrzahl der Literatur über den Gravitropismus der Pflanzen gelten Statolithen als die Rezeptoren des gravitropen Stimulus (Blancaflor, 2002; Braun, 1997; Chang et al., 2001; Kiss et al., 1989, 1996; MacCleery und Kiss, 1999; Sack, 1997; Sack et al., 1994; Saether und Iversen, 1991; Schimek et al., 1999; Schwuchow et al., 2002;

Sievers et al., 1989, 1996; Vitha et al., 2000). Statolithen sind Strukturen mit erhöhter Dichte in spezialisierten Organellen. Neben den häufigsten Vertretern, den Amyloplasten (z.B. in *Lepidium*, *Arabidopsis* oder *Helianthus*) kommen Statolithen auch als Bariumsulfat-Kristalle (*Chara*) oder Protein-Kristalle (*Phycomyces*) vor. Die Statolithen sind in jedem Fall derart im Cytoskelett "aufgehängt", dass eine Änderung des Schwerkraftvektors sie zunächst aus ihrer ursprünglichen Lage drängt. Sie bewegen dann das umgebende Cytoskelett, in dem dadurch wiederum umfangreiche "Umbauten" ausgelöst werden (Braun, 2001; Braun und Wasteneys, 1998; Himmelpach und Nick, 2001; Himmelpach et al., 1999; Nick et al., 1997; Sedbrook et al., 1999; Yamamoto und Kiss, 2002). Wenn diese Cytoskelett-Reaktionen gestört werden, wird auch die gravitrope Reaktion gestört.

Bei Versuchen mit Stärke-freien Mutanten von *Arabidopsis*, in denen die Statolithen also nicht die gleiche hohe Dichte wie im Wildtyp von *Arabidopsis* haben, war die gravitrope Reaktion der Pflanzen aber nie vollkommen aufgehoben, nur abgeschwächt. Vielmehr liess sich die volle Reaktion durch Hyper-Gravitation wieder auslösen (Fitzelle und Kiss, 2001).

Es scheint eine parallele Evolution verschiedener gravitroper Signaltransduktionsketten in den Pflanzen stattgefunden zu haben (Barlow, 1995). Offensichtlich kommen diese auch gemeinsam in den gleichen Pflanzen vor. Anders liesse sich nicht erklären, wieso ein funktionaler Ausfall der Statolithen nie zu einem vollkommenen Ausfall der gravitropen Reaktivität der Zellen führt (Kiss et al., 1998, 1999).

1.2. Gravitrope Genexpression und die Detektion differentiell exprimierter Gene

Einer von vielen Vorgängen, die durch Tropismen reguliert werden, ist die Genexpression (Ascenzi und Gantt, 1997; Braam et al., 1996; Guilfoyle et al., 1998; Ogawa et al., 1999; Rorat et al., 1995; Sakai et al., 1996; Sheen, 1991; Sitbon und Perrot-Rechenmann, 1997; Theologis, 1986).

Die dauerhafte Anpassung an den Schwerkraftvektor verursacht eine differentielle

Anpassung der Genexpression (Bao et al., 2001; Caderas et al., 2000; Fuji et al., 2000; Fukaki et al., 1996b, 1998; Paul et al., 2001; Strudwick et al., 1997; Timpte et al., 1995). Möglicherweise passiert das so früh, dass sie einen zentralen Punkt der gravitropen Signaltransduktion darstellt.

Ob diese differentielle Genexpression nur eine Folge der differentiellen Streckung oder sogar das primäre Ziel der gravitropen Signaltransduktion ist, muß allerdings noch geklärt werden.

Denkbar wäre sogar, dass Strukturen, die man als Gravi-Rezeptoren bezeichnen könnte, über ihre gravitrope Expression gefunden werden. Dann nämlich, wenn die Expression dieser eigentlich auch ohne Gravi-Stimulation präformiert vorliegenden Rezeptoren ein gewisses Maß an Induktion bzw. Inhibition der Genexpression aufweist.

Differential Display von RT-PCR-Produkten dient zur Detektion differentiell exprimierter Gene. Diese Technik macht sich die Tatsache zunutze, daß sich verschiedene Gewebe infolge eines spezifischen Stimulus bzw. gleiche Gewebetypen im zeitlichen Verlauf nach einem spezifischen Stimulus unterschiedlich bzgl. ihrer Genexpression verhalten. Durch die Korrelation der Gene mit ihrem spezifischen Stimulus lassen sich möglicherweise alle Gene identifizieren, deren Expression durch Tropismen gesteuert wird.

Seit der Einführung der RT-PCR-Technik (Liang und Pardee, 1992) wurden viele Variationen in den Versuchsprotokollen etabliert (Atanassov et al., 1996; Bachem et al., 1996; Brosche und Strid, 1999; Carpin et al., 1999; Chen und Chen, 2000; Richert et al., 1996; Schramm et al., 2000; Sokol et al., 1998; Suty et al., 1996), um die Sensitivität und dadurch die räumliche und zeitliche Auflösung der Methode zu erhöhen. In praktisch allen publizierten Arbeiten, die Differential Display RT-PCR anwenden, werden solche Gene im paarweisen Vergleich von unterschiedlich stimulierten Geweben bzw. der RT-PCR-Produkte dieser Gewebe nachgewiesen. Falsch-positive, d. h. RT-PCR-Produkte, die differentiell aussehen, ohne es zu sein, werden dadurch reduziert, dass bei den Protokollen von einer möglichst großen Zahl von Individuen oder deren spezifischer Teile ausgegangen wird. Schliesslich zeigt auch die Reproduzierbarkeit der differenziellen Produkte, dass es sich wirklich um die Produkte differentiell exprimierter

Gene handelt.

In den meisten Fällen ist nur wenig über den zeitlichen Verlauf der Expression der gesuchten Gene bekannt. Allenfalls kann eine phänotypische Veränderung des Organismus nur zu einem bestimmten Zeitpunkt konstatiert werden. In diesem Fall und unter der Voraussetzung, daß eine Änderung der Genexpression überhaupt an dieser Änderung des Phänotyps beteiligt ist, kann man davon ausgehen, daß sich eine differentielle Änderung der Genexpression im angegebenen Zeitraum ergibt. Wenn man die Genexpression lediglich zu einem späten, d. h. nahe an einer phänotypischen Änderung liegenden Zeitpunkt untersucht, bleibt ungeklärt, wann die differentielle Genexpression einsetzt. Auch eine möglicherweise auftretende spezifische Reihenfolge in der Änderung der Expression spezifischer Gene, z. B. im Verlauf oder als Folge einer spezifischen Signaltransduktion, bleibt so ungeklärt.

1.3. Ziel der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der Genexpression in gravistimulierten Geweben von *Helianthus annuus* und die weitere Aufklärung der Signaltransduktion beim pflanzlichen Gravitropismus.

Frühere Arbeiten (Chen et al., 1998; Coenen und Lomax, 1998) analysierten lediglich die Expressionsmuster bereits bekannter Gene. Damit war es jedoch nicht möglich, am Gravitropismus an zentraler Stelle beteiligte Proteine zu finden, sofern diese noch nicht bekannt sind.

Mit Hilfe der sehr sensitiven und zuverlässigen RT-PCR und der Kapillarelektrophorese sollten in dieser Arbeit neue Gene identifiziert werden, die gravitrop exprimiert werden. Damit wird erstmals eine innovative Möglichkeit erarbeitet, um Strukturen zu charakterisieren, die an der gravitropen Reaktion beteiligt sind. Mit den bisher üblichen Methoden konnten diese nicht gefunden werden, weil die entsprechenden Sequenzen bisher unbekannt waren oder die Expressionsraten unterhalb der bisherigen

Nachweisgrenzen lagen.

Da in den meisten Fällen nur wenig über den zeitlichen Verlauf der Genexpression bekannt ist, wurde dieser über die Expression spezifischer RT-PCR-Produkte untersucht.

Seit der Entwicklung der sogenannten Northern-Blots (Alwine et al., 1977), die den sicheren Nachweis spezifischer Sequenzen in den Transkripten verschiedenster Gewebe ermöglichten, wurden diverse Methoden entwickelt, um spezifische mRNAs, deren Expressionsmuster vom Typ oder Zustand des Gewebes abhängig sind, nachzuweisen. All diese Methoden beruhen auf dem Vergleich zwischen den Analysen der verschiedenen Gewebstypen bzw. Zelltypen. Die Menge und Reinheit der mRNA-Präparate muß in diesen Analysen gleichartig sein, um einen aussagekräftigen Vergleich, den sogenannten "differential display" (Hammond et al., 2000; Liang und Pardee, 1992; Lund et al., 1997; Mazeyrat et al., 1998; Shinozaki und Yamaguchi-Shinozaki, 1997) zu erlauben.

Um radioaktives Arbeiten zu vermeiden, wurden die Analysen mit Hilfe von Fluoreszenz-markierten Primer-Molekülen über eine Kapillarelektrophoreseanlage durchgeführt.

2. Material & Methoden

2.1. Pflanzen

Die gravitrope Genexpression wurde an *Helianthus annuus* (var. Albena, KWS)-Hypokotylen untersucht (Abb. 1; Kutschera, 1990). Hypokotyle von Sämlingen dieser Pflanzen zeigen schon nach 1 Stunde unter geänderter Schwerkraft (-Richtung) einen deutlichen Gravitropismus, d.h. die Hypokotyle krümmen sich negativ gravitrop.

Die Samen wurden vor dem Aussäen in Vermiculit für 1 Stunde in 5% Natriumhypochlorit und anschliessend mit Leitungswasser gespült. Die Saatschalen wurden dann 7 Tage im Dunkeln in einer Kulturkammer bei 25 °C und 80% relativer Luftfeuchte untergebracht. Nach dieser Zeit erreichten die Hypokotyle eine Länge von ca. 10 cm (Abb. 1).



Abb. 1: Sämlinge von *Helianthus annuus* in einer Saatschale, die 7 Tage nach dem Aussäen auf Vermiculit im Dunkeln (25 °C, 80 % rel. Luftfeuchte) stand.

Die eigentliche Gravistimulation erfolgte durch Kippen der gesamten Saatschalen um

45°. Die Hypokotyle wurden nach 0, 15, 30, 45 und 60 Minuten geerntet, wobei der Sproß-Apex und die Keimblätter ebenso wie die Wurzeln entfernt wurden. Als Kontrollen wurden auch Hypokotyle von Pflanzen geerntet, die nicht gekippt aber dem gleichen, gedämpften Licht in der gleichen Dauer ausgesetzt wurden wie die Pflanzen, die gravistimuliert wurden. Weil nicht unter Licht-Ausschluß geerntet werden konnte, sollten diese Kontrollen zur Identifizierung Licht-induzierter Gene dienen, um diese von den gravitropen Genen unterscheiden zu können.

Die grob mit der Schere in 1-2 cm lange Stücke geschnittenen Hypokotyle wurden sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C in 50ml-Plastikschraubdeckelröhrchen aufbewahrt. Sobald der flüssige Stickstoff durch den nur lose aufgelegten Deckel der Röhrchen bei -80°C abgedampft war, konnten die Hypokotylstücke durch Schütteln der Röhrchen gemischt werden.

2.2. RNA-Extraktion

Vor der Extraktion der RNA aus dem Gewebe mussten die Hypokotylstücke mechanisch zerkleinert werden. Um einen RNA-Abbau durch im Gewebe vorhandene Ribonukleasen zu verhindern, wurden die in flüssigem Stickstoff gekühlten Hypokotylstücke in einem ebenfalls mit flüssigem Stickstoff vorgekühlten Edelstahlmörser zerstoßen (Abb. 2).

Mit diesem Mörser kann durch Aufsetzen des Deckels und wenigen Schlägen mit einem Hammer auf diesen Deckel das tiefkalte und dadurch spröde Gewebe soweit mechanisch zerrissen werden, dass innerhalb weniger Minuten, nachdem das so zerstoßene und noch immer gefrorene Gewebe in jeweils 3 ml Guanidiniumthiocyanat-haltigen Lysispuffer aufgenommen wurde, sich alle Gewebekomponenten aufgelöst haben. Durch das Zerquetschen des Gewebes bilden sich sehr viele Risse in dem noch intakt wirkenden Material. Durch diese Risse aber gelangt der Lysispuffer nach dem Auftauen des Materials so schnell in das gesamte Gewebe, dass ein Abbau der RNA verhindert wird.

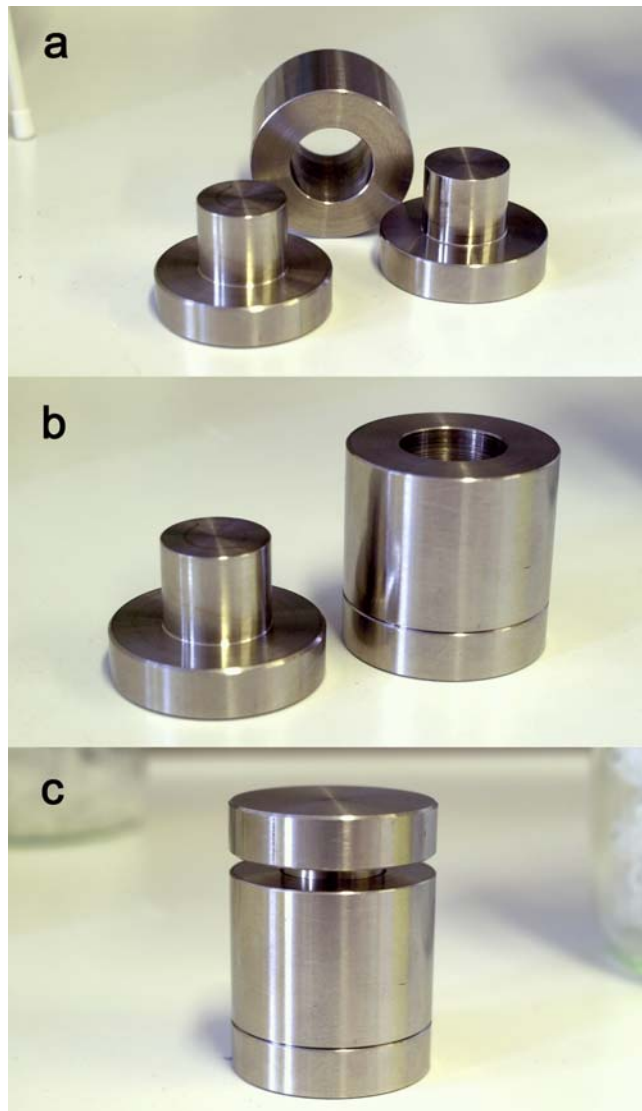


Abb. 2: Der dreiteilige Edelmörsers, bestehend aus zwei identischen Stempeln und einer Hülse (Bildabschnitt **a**), kann nach Aufstecken der Hülse auf einen Stempel (Bildabschnitt **b**) und Kühlen in flüssigem Stickstoff leicht mit gefrorenen Hypokotylstücken gefüllt und dann mit dem ebenfalls gekühlten zweiten Stempel geschlossen werden (Bildabschnitt **c**). Dieser Zusammenbau kann dann durch Schläge mit einem Hammer oder durch Pressen in einer Schraubzwinde zum Zerdrücken des Gewebes benutzt werden. Bei zügigem Entfernen der beiden Stempel kann das noch gefrorene Pflanzenmaterial aus der Hülse und in den Lysispuffer aufgenommen werden.

Durch dieses Verfahren ist ein maximaler Schutz der RNA vor Abbau im Gewebe gewährleistet.

Die weiteren Schritte zur Reinigung der Poly-A-RNA wurden entsprechend den Anweisungen im Oligotex Direct mRNA Kit der Firma Qiagen durchgeführt. Dabei wird zunächst ein Aliquot des Lysats (0,6 ml) mit dem doppelten Volumen des Verdünnungspuffers gemischt, anschliessend hybridisiert die mRNA an das Oligotex-Säulenmaterial zu hybridisieren. Nach diversen Wasch-Schritten zur Entfernung der störenden Komponenten des Lysats, werden mit 70°C-warmem Elutionspuffer (5mM Tris-Cl, pH 7,5) jeweils 28 µl mRNA eluiert.

Diese Produkte werden bei -80°C gelagert oder direkt zur Synthese von cDNA benutzt.

Entscheidend bei diesem Verfahren ist die Gewinnung der Poly-A-RNA - also der reifen mRNA (Wu et al., 1995) - über ein mit Oligo-dT beschichtetes Säulenmaterial ("Oligotex"). So wurde sichergestellt, dass störende Verunreinigungen (z.B. durch rRNA oder unreife hnRNA) minimiert wurden.

Ebenso wichtig für das weitere Verfahren ist der Effekt, dass durch die limitierte Kapazität des Säulenmaterials (6 µg mRNA von 1900 Basen Länge pro 10 µl Oligotex-Suspension) in allen Präparationen vergleichbare mRNA-Mengen gewonnen wurden. Mit den zur Verfügung stehenden Methoden (Photometrie) lassen sich kleine Mengen RNA quantitativ nicht exakt bestimmen, ohne den Verlust hoher Mengen der mRNA-Präparationen. Die alternative Bestimmung der Gesamt-RNA-Menge wird zwar von einigen Arbeitsgruppen benutzt, um das Ausgangsmaterial für die RT-PCR in gleichen Mengen bereitzustellen, aber der entscheidende Anteil der mRNA an der Gesamt-RNA kann durchaus von Präparation zu Präparation schwanken.

Die Methode, über markierte Oligo-dT-Sonden die Menge an Poly-A in einer Präparation zu bestimmen, ist nicht empfehlenswert, weil die markierten Proben mehrfach an ein mRNA-Molekül binden können und die Länge der 3'-Poly-A-Sequenz nicht einheitlich, sondern in den allermeisten Fällen auch weit größer als die der Oligo-dT-Sonden ist.

2.3. cDNA

Die mRNA wurde nach den Empfehlungen des Herstellers der AMV-Reversen Transkriptase (Roche) in "first strand cDNA" umgesetzt, die in den nachfolgenden Schritten das Template für die PCR darstellen sollte. Allerdings wurden nicht Oligo-dT-Nukleotide als Startermoleküle ("Primer") für die Synthese der cDNA verwendet, sondern modifizierte "Ankerprimer".

2.3.1. Oligonukleotide als Primer für cDNA-Synthese

Einfache Oligo-dT-Primer können zwar zur Gewinnung von cDNA benutzt werden, aber es können durchaus mehrere dieser Moleküle an ein Poly-A-template der mRNA binden, das mehrere hundert Basen lang sein kann. Außerdem muß spätestens im nächsten Schritt des Verfahrens - also der PCR - sichergestellt sein, dass ein Primer am 3'-Ende der cDNA-Sequenz an einer definierten Stelle des PCR-Templates bindet. Ohne Modifikation sind Oligo-dT-Primer also nur sehr begrenzt dazu geeignet, möglichst viele unterschiedliche mRNA-Moleküle in cDNA revers zu transkribieren (Abb. 3 zu den Modifikationen, die in dieser Arbeit an den Primern vorgenommen wurden).

Primer, die diese Funktion erfüllen, werden Ankerprimer genannt, weil ein A, G oder C an ihrem 3'-Ende genau am Anfang der Poly-A-Sequenz bindet, den Primer zum Annealing an diesem Übergang zwischen Poly-A- und 3'-nichtkodierender Sequenz fixiert, ihn quasi an dieser Stelle verankert. Ohne diese Bindung des 3'-terminalen "Anker"-Nukleotids an das mRNA-Template findet keine reverse Transkription statt, cDNA wird also nicht synthetisiert.

Um diesen Ankerprimer in den folgenden PCR-Schritten ebenfalls nutzen zu können, wurde seine Länge der Annealing-Temperatur der für die PCR vorgesehenen Random Primer (siehe Abschnitt 2.4.1.) angepasst. Als gleichermassen für die cDNA-Synthese mittels reverser Transkription und für die PCR-Amplifikation zusammen mit den Random Primern geeignet hat sich ein äquimolares Gemisch von Ankerprimern herausgestellt,

die jeweils nach 17 T ein A, G oder C als 3'-Ende enthielten.

Außerdem wurden die Ankerprimer an ihrem 5'-Ende um die Sequenz des M13-revers-Sequenzierungs-Primers verlängert. Während der first-strand-cDNA-Synthese stört dieses 3'-Ende der Primer die Bindung an die Template-mRNA kaum. Und im späteren Verlauf des Verfahrens ermöglicht diese frühzeitige Integration von spezifischen Primer-Sequenzen in die cDNA eine unkomplizierte Re-Amplifikation von spezifischen differentiellen Peaks und deren leichte Sequenzierbarkeit.

Weil die Primer, die zur Synthese der cDNA gebraucht wurden, später auch in der PCR verwendet werden sollten und für die Analyse der PCR-Produkte mit der Kapillarelektrophorese eine Fluoreszenz-Markierung der Primer notwendig war, wurden die Primer auch am 5'-Ende mit einem Carboxy-Fluorescein (FAM)-Molekül versehen, das die Funktion des Primers in der cDNA-Synthese und in der PCR nicht stört.



Abb. 3: Die Sequenz eines modifizierten Ankerprimers für die cDNA-Synthese. Zum spezifischen Binden an das Poly-A-Ende des mRNA-Templates dienen 17 T-Nucleotide. Um die Bindung exakt am Übergang von 3'-nichttranslatierter Sequenz zum Poly-A-Ende zu fixieren, befindet sich am 3'-Ende ein nicht-T-Nucleotid (grün). 5' vom oligo-T befindet sich die M13-revers-Primer-Sequenz (blau), die für die weiteren Verfahrensschritte nötig ist. Am 5'-Terminus befindet sich ein Carboxy-Fluorescein (FAM, rot), das für die Analyse der späteren PCR-Produkte auf der Kapillarelektrophorese benötigt wird

2.3.2. cDNA-Ansatz

Folgende Substanzen wurden gemäß Herstellerangaben (Roche, "first strand cDNA synthesis kit") für jeden 20 µl-RT-Ansatz auf Eis zusammenpipettiert und anschliessend gemischt:

6,9 µl	mRNA-Präparation
2 µl	10X-Puffer
0,8 µl	AMV-Reverse Transkriptase (RT, Roche)
1 µl	RNase-Inhibitor (Roche)
2 µl	10 mM dNTPs
4 µl	25 mM MgCl ₂
3,3 µl	80 µM Ankerprimer mit Fluoreszenz-Markierung

Um Probleme beim Pipettieren zu vermeiden, wurden immer mehrere Ansätze ohne mRNA zusammen angesetzt (sog Mastermix) und aliquotiert, bevor die unterschiedlichen mRNAs zugegeben wurden. Dadurch war eine einheitliche Zusammensetzung der RT-Ansätze gewährleistet.

2.3.3. cDNA-Synthese-Protokoll

Die RT-Ansätze wurden in einem Thermocycler (I-Cycler, BioRad) nach einem Protokoll behandelt, das in Tabelle 1 dargestellt ist.

Schritt	Beschreibung	Zeit	Temperatur [°C]
1.	Annealing	10'	25
2.	Reverse Transkription	1 h	42
3.	Denaturieren	5'	95
4.	Lagerung	Pause	4

Tabelle 1: Der Ablauf der Einzel-Schritte der cDNA-Synthese

Bei diesem Verfahren wird im ersten Schritt bei 25 °C den Oligo-dT-Primern Gelegenheit gegeben, an die Poly-A-Enden der mRNA-Templates zu binden. Im zweiten Schritt, bei 42 °C lösen sich die unspezifisch, also an nicht-homologen Stellen gebundenen Primer von der mRNA und die AMV-Reverse Transkriptase synthetisiert von den Ankerprimern ausgehend in 5'-3'-Richtung den sog. first strand der cDNA, der bis zum Ende dieses Schrittes an das mRNA-Template hybridisiert bleibt. Durch die anschliessende Denaturierung werden die cDNA/mRNA-Hybrid-Doppelstränge wieder gespalten und die Reverse Transkriptase inaktiviert. Es kommt bei dem abschliessenden Kühlen wieder zur Renaturierung der cDNA/mRNA-Hybridstränge, diese verhindert aber nicht die Verfügbarkeit der cDNA, weil in den folgenden Verfahrensschritten in jedem Fall wieder denaturiert und dadurch die cDNA als Template verfügbar wird. Die Hitze-Inaktivierung der Reversen Transkriptase verhindert auch die Bildung von unerwünschten Artefakten in den anschliessenden Verfahrensschritten.

2.4. PCR

In der Polymerase-Chain-Reaction (Mullis und Faloona, 1987; Newton, 1997) werden spezifisch DNA-Fragmente amplifiziert. Dadurch lassen sich kleinste Mengen spezifischer DNAs nachweisen und für weitere Verfahren präparieren.

2.4.1. Oligonukleotide als Primer für die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Bei der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) werden mit Hilfe geeigneter Startermoleküle, den sogenannten Primern und der zuvor synthetisierten first strand cDNA als Template spezifische Sequenzen aus der cDNA amplifiziert (Abb.4).

Allerdings waren die Sequenzen, die für die vorliegende Arbeit amplifiziert werden sollten, noch nicht bekannt. Also musste mit Primern gearbeitet werden, die so unspezifisch an die Templates binden, um nicht für jede theoretisch mögliche Sequenz einen eigenen Primer benutzen zu müssen. Für derartige Zwecke werden kommerzielle Primer-Kits (Random-Primer für die RAPD-PCR, Carl Roth) angeboten, die jeweils eine Reihe von Primern enthalten, die 10 Basen lang sind und eine willkürlich gewählte Sequenz aufweisen. Bei dieser Länge sind $4^{10} = 1048576$ unterschiedliche Sequenzen für die Primer möglich, bzw. durchschnittlich alle 1048576 Basen kommt die jeweilige Sequenz in der genomischen DNA und der davon abgeleiteten cDNA vor. Das würde bei spezifischen PCR-Bedingungen schon für die gelegentliche Amplifikation von spezifischen Sequenzen genügen. Um aber mehr Sequenzen zu amplifizieren und die dafür erforderliche geringe Stringenz der PCR-Bedingungen zu erreichen, wird mit diesen Primern bei tieferen als den maximal möglichen Annealing-Temperaturen in der PCR gearbeitet. Dadurch müssen nicht alle 10 Basen des Primers an eine Template-Sequenz binden, um als Startermolekül für die Taq-Polymerase zu dienen.

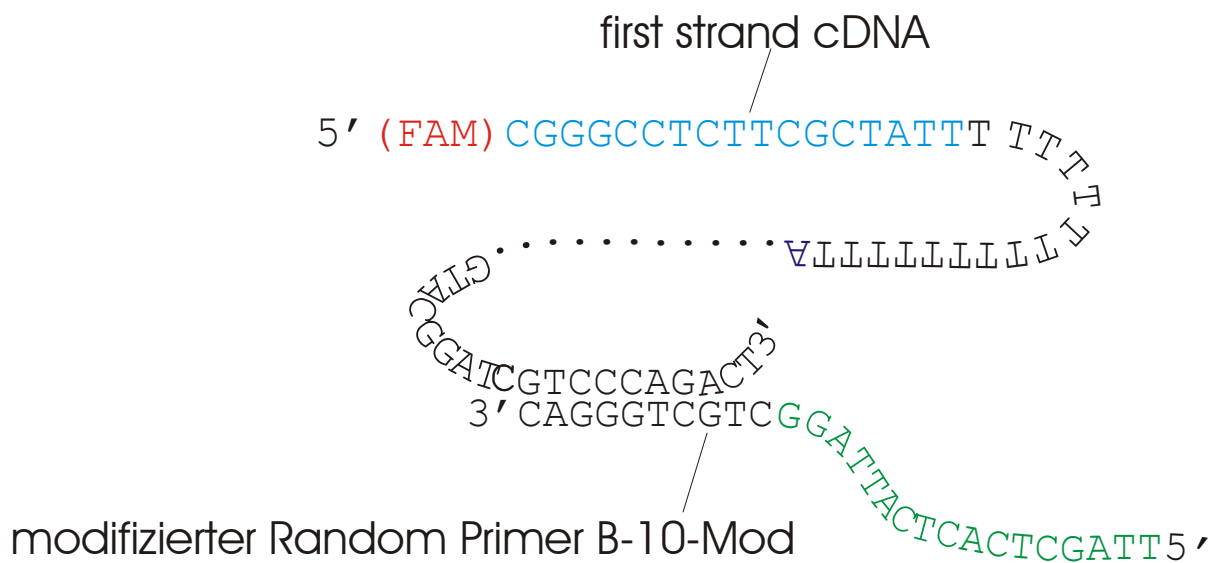


Abb.4: Das Produkt der Reversen Transkriptase, die first strand cDNA dient in der PCR als Template für die modifizierten Random Primer (in diesem Beispiel B-10-Mod). Bei ausreichend niedriger Annealing-Temperatur muss nicht der ganze Primer binden, sondern es reicht, wenn z.B. die 3'-terminalen 7 Nukleotide annealen. Die M13-forward- (grün) und M13-reverse- (blau) Sequenzen erlauben nach wenigen PCR-Zyklen eine Erhöhung der Annealing-Temperatur und dadurch eine verbesserte Produktivität und Spezifität der Amplifikation der Produkte aus den ersten Zyklen. Gleichzeitig erlauben diese M13-Sequenzen das leichte Reamplifizieren (siehe Abschnitt 2.7.) und Sequenzieren (siehe Abschnitt 2.10.) der Amplifikate. Die Markierung der PCR-Produkte mit FAM wurde für die Analyse auf der Kapillarelektrophorese (siehe Abschnitt 2.5.1.1.) benötigt.

Dadurch binden diese Primer in der PCR statistisch, also zufällig, an passende Zielsequenzen (deshalb auch "Random Primer"). Wenn die PCR-Bedingungen zusätzlich unspezifischer gewählt werden, binden die Primer an noch mehr zufällige Sequenzen, so dass ein einzelner derartiger Primer an vielen Sequenzen binden und zusammen mit einem Ankerprimer, der an das andere Ende des cDNA-Templates bindet, amplifizieren kann. "Random" (=zufällig) bedeutet allerdings nicht, dass der Primer an beliebige Sequenzen binden kann, sondern nur, dass diese Sequenzen

statistisch verteilt in der genomischen und damit auch in der davon abgeleiteten cDNA vorkommen.

Damit in späteren Schritten des Verfahrens diese Sequenzen spezifisch weiteramplifiziert werden konnten, die 10 Basen der Random Primer dafür aber keine ausreichende Spezifität bieten können, wurden die Primer am 5'-Ende um die M13-forward-Sequenzierungs-Primer-Sequenz ergänzt. Tabelle 2 enthält die Sequenzen aller in dieser Arbeit benutzten modifizierten Ankerprimer.

Bezeichnung des modifizierten Primers	Primer-Sequenz
B-01-Mod	TTAGCTCACTCATTAGGGTTTCGCTCC
B-02-Mod	TTAGCTCACTCATTAGGTGATCCCTGG
B-03-Mod	TTAGCTCACTCATTAGGCATCCCCCTG
B-04-Mod	TTAGCTCACTCATTAGGGGACTGGAGT
B-05-Mod	TTAGCTCACTCATTAGGTGCGCCCTTC
B-06-Mod	TTAGCTCACTCATTAGGTGCTCTGCCC
B-07-Mod	TTAGCTCACTCATTAGGGGTGACGCAG
B-08-Mod	TTAGCTCACTCATTAGGGTCCACACGG
B-09-Mod	TTAGCTCACTCATTAGGTGGGGGACTC
B-10-Mod	TTAGCTCACTCATTAGGCTGCTGGGAC
B-11-Mod	TTAGCTCACTCATTAGGGTAGACCCGT
B-12-Mod	TTAGCTCACTCATTAGGCCTTGACGCA
B-13-Mod	TTAGCTCACTCATTAGGTTCCCCCGCT
B-14-Mod	TTAGCTCACTCATTAGGTCCGCTCTGG
B-15-Mod	TTAGCTCACTCATTAGGGGAGGGTGTT
B-16-Mod	TTAGCTCACTCATTAGGTTTGCCCGGA
B-17-Mod	TTAGCTCACTCATTAGGAGGGAACGAG
B-18-Mod	TTAGCTCACTCATTAGGCCACAGCAGT
B-19-Mod	TTAGCTCACTCATTAGGACCCCCGAAG
B-20-Mod	TTAGCTCACTCATTAGGGGACCCTTAC
D-01-Mod	TTAGCTCACTCATTAGGACCGCGAAGG

Gravitrope Genexpression in *Helianthus annuus*

D-02-Mod	TTAGCTCACTCATTAGGGGACCCAACC
D-03-Mod	TTAGCTCACTCATTAGGGTCGCCGTCA
D-04-Mod	TTAGCTCACTCATTAGGTCTGGTGAGG
D-05-Mod	TTAGCTCACTCATTAGGTGAGCGGACA
D-06-Mod	TTAGCTCACTCATTAGGACCTGAACGG
D-07-Mod	TTAGCTCACTCATTAGGTTGGCACGGG
D-08-Mod	TTAGCTCACTCATTAGGGTGTGCCCCA
D-09-Mod	TTAGCTCACTCATTAGGCTCTGGAGAC
D-10-Mod	TTAGCTCACTCATTAGGGGTCTACACC
D-11-Mod	TTAGCTCACTCATTAGGAGCGCCATTG
D-12-Mod	TTAGCTCACTCATTAGGCACCGTATCC
D-13-Mod	TTAGCTCACTCATTAGGGGGGTGACGA
D-14-Mod	TTAGCTCACTCATTAGGCTTCCCAAG
D-15-Mod	TTAGCTCACTCATTAGGCATCCGTGCT
D-16-Mod	TTAGCTCACTCATTAGGAGGGCGTAAG
D-17-Mod	TTAGCTCACTCATTAGGTTTCCCACGG
D-18-Mod	TTAGCTCACTCATTAGGGAGAGCCAAC
D-19-Mod	TTAGCTCACTCATTAGGCTGGGGACTT
D-20-Mod	TTAGCTCACTCATTAGGACCCGGTCAC

Tabelle 2: Die Sequenzen der modifizierten Random Primer unterscheiden sich nur in den 3'-terminalen 10 Basen. Die 17 Nukleotide am 5'-Ende entsprechen der Sequenz des M13-forward-Sequenzierungs-Primers.

2.4.2. PCR-Ansatz

Folgende Substanzen wurden für jeden 40 µl-PCR-Ansatz auf Eis zusammenpipettiert und anschliessend gemischt:

25,075 µl	H ₂ O
0,1 µl	cDNA
4 µl	10X-Puffer
0,4 µl	Taq-Polymerase (Pharmacia)
0,825 µl	10 mM dNTPs
4 µl	25 mM MgCl ₂
2,8 µl	12 µM Random Primer
2,8 µl	12 µM Ankerprimer

Da diese teilweise kleinen Mengen die Genauigkeit der üblichen Laborpipetten übersteigen, wurden immer mehrere Ansätze ohne Primer zusammen angesetzt (sog. Mastermix) und aliquotiert, bevor unterschiedliche Primer zugegeben wurden. Nur dadurch war eine einheitliche Template-Menge zu gewährleisten.

2.4.3. PCR-Protokoll

Um zu erreichen, dass bei kleinen Annealing-Temperaturen einerseits keine M13-forward-Sequenzen von den jeweiligen Primern erkannt werden müssen (diese liegen im Template, der first strand cDNA nicht vor), andererseits die Random-Sequenzen der Primer aber eine möglichst große Zahl unterschiedlicher Sequenzen binden können - jedenfalls mehr als bei ihrer spezifischen Annealing Temperatur -, wurden zunächst 3 PCR-Zyklen bei der für die Random-Sequenz optimalen ("optimal" heisst hier, dass unter diesen Bedingungen eine möglichst große Zahl an unterschiedlichen Amplifikaten gebildet wird) Annealing-Temperatur durchgeführt. 37 Zyklen bei einer Annealing Temperatur, die für die Amplifikation mit M13-Sequenzen maximal möglich ist, sclossen sich an.

Die PCR-Ansätze wurden in einem Thermocycler (I-Cycler, BioRad) nach folgendem Protokoll behandelt:

Schritt	Zyklen-Zahl	Beschreibung	Zeit	Temperatur [°C]
1.	1	Denaturieren	5'	92
2.	3	Denaturieren	30"	92
		Annealing	1'	33
		Elongation	1'	72
3.	37	Denaturieren	30"	92
		Annealing	1'	65
		Elongation	1'	72
4.	1	finale Elongation	10'	72
5.	1	Lagerung	Pause	4

Tabelle 3: Die Abfolge der Einzel-Schritte der PCR im RT-PCR-Verfahren

2.5. Differential Display

Der Erfolg eines Differential Displays hängt von drei Faktoren ab: a) von der vergleichbaren Menge und Qualität der mRNA-Präparation, b) von der Wahl der Primer-Sequenzen und c) von der Empfindlichkeit der Analyse.

Wie die Präparation der mRNA in ausreichender Qualität und standardisierter Menge erfolgt, wurde in Abschnitt 2.2. beschrieben. Wie die Sequenz der Primer aussehen sollte, wurde in den Abschnitten 2.3.1 und 2.4.1 beschrieben.

Dass die Analyse über eine Kapillarelektrophorese die zuverlässigste und empfindlichste Methode darstellt, die zur vergleichenden Analyse von Nukleinsäuren zur Verfügung steht, ist an ihrer Verbreitung unter kommerziellen Sequenzierdiensten leicht zu erkennen. Diese Kapillarelektrophorese von Nukleinsäuren wurde auch in dieser Arbeit angewandt (siehe Abschnitt 2.5.1.).

Weil die RT-PCR-Technik sich die Tatsache zunutze macht, daß sich verschiedene Gewebe infolge eines spezifischen Stimulus bzw. gleiche Gewebetypen im zeitlichen Verlauf nach einem spezifischen Stimulus unterschiedlich bzgl. ihrer Genexpression verhalten, erlaubt ein Differential Display von RT-PCRs die Korrelation der Gene mit ihrem spezifischen Stimulus und damit wahrscheinlich die Identifikation aller Gene, deren Expression durch Tropismen gesteuert wird.

Dazu werden in engem zeitlichem Abstand nach dem Einsetzen des spezifischen Stimulus die Transkripte aus den stimulierten Geweben extrahiert, in cDNA revers transkribiert und mit der PCR amplifiziert. Die Analyse der Amplifikate mit der Kapillarelektrophorese ermöglicht eine simultane Darstellung der relativen Expressionsrate spezifischer Sequenzen zu jedem der gewählten Zeitpunkte nach dem Einsetzen der gravitropen Stimulation.

2.5.1. Kapillar-Elektrophorese von Nukleinsäuren

Eine überaus empfindliche Methode zur Analyse der PCR-Produkte, also für den eigentlichen Differential Display, stellt die Kapillarelektrophorese von Nukleinsäuren dar.

Bei diesem Verfahren werden die PCR-Produkte nicht radioaktiv, sondern mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert (Ito und Sakaki, 1997). Das ermöglicht im Vergleich zu radioaktiven Methoden eine wesentlich einfachere Handhabung bei vergleichbarer und teils besserer Aussagekraft der Analysen.

Für diese Arbeit wurde ein Kapillarelektrophoresegerät der Firma Applied Biosystems, der ABI310 benutzt, das mit einer Kapillare und Fluoreszenz-Detektion mit Hilfe eines Argon-Lasers arbeitet (Abb.5).

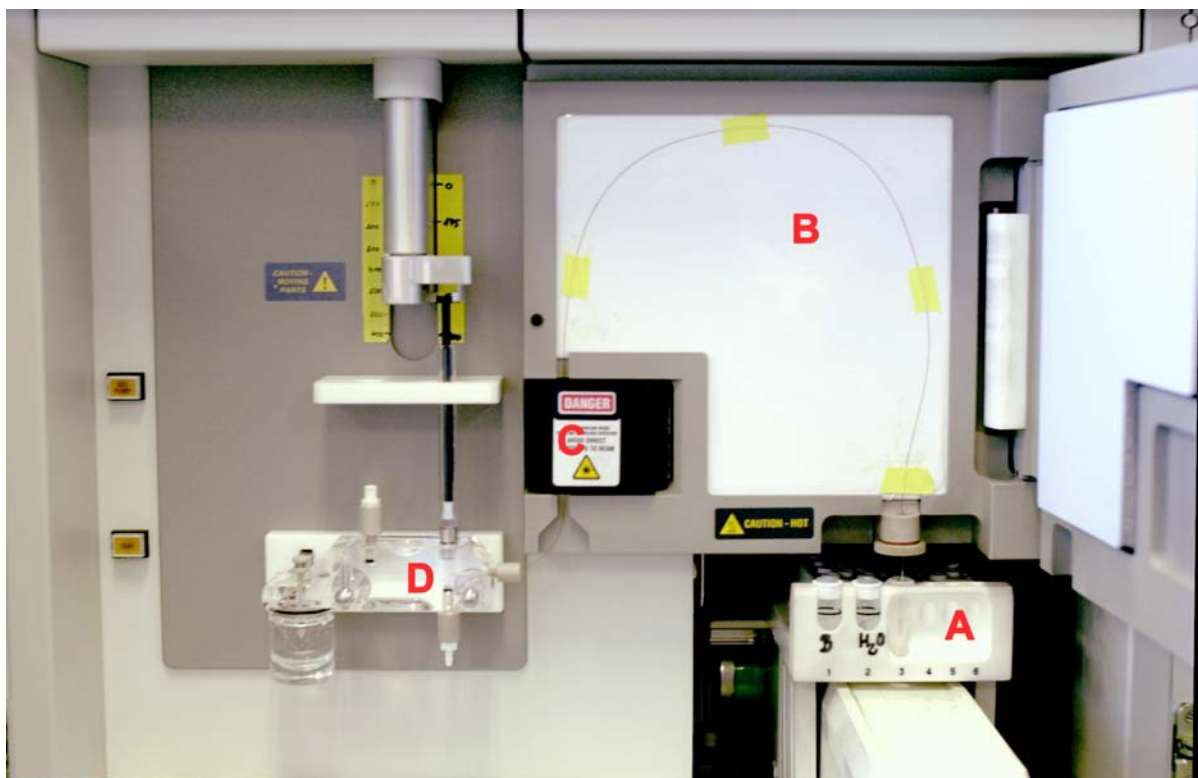


Abb. 5: Die Kapillarelektrophoreseanlage ABI310 von Applied Biosystems. A: Der Tray mit 48 bzw. 96 sample tubes, Behältern für Elektrophoresepuffer, Wasser und für das nach jeder einzelnen Analyse ausgepumpte Auftrennungspolymer. B: Die (geöffnete) Heizplatte mit der aufgeklebten Kapillare. C: Laser-Fluoreszenz-Detektor, durch dessen Strahlengang die Kapillare geführt wird. D: Der Acrylblock, der einen Behälter für Elektrophoresepuffer und eine Vorrats-Spritze mit frischem Auftrennungspolymer trägt.

Die Ergebnisse der kapillarelektrophoretischen Auftrennung werden grafisch ausgegeben (Abb.6). Dabei werden aber nicht die Rohdaten betrachtet, sondern die

Ergebnisse nach der Streckung mit Hilfe des internen DNA-Längenstandards, der in jeder Probe enthalten, aber mit einem anderen Fluoreszenz-Farbstoff (ROX) markiert ist als die eigentlichen Proben, die mit einem Carboxy-Fluorescein (FAM) markiert sind. Mit seiner Hilfe werden die Rohdaten der einzelnen Analysen entsprechend der tatsächlichen DNA-Fragmentgröße soweit gestreckt, dass die eigentlichen Proben basengenau miteinander vergleichbar werden.

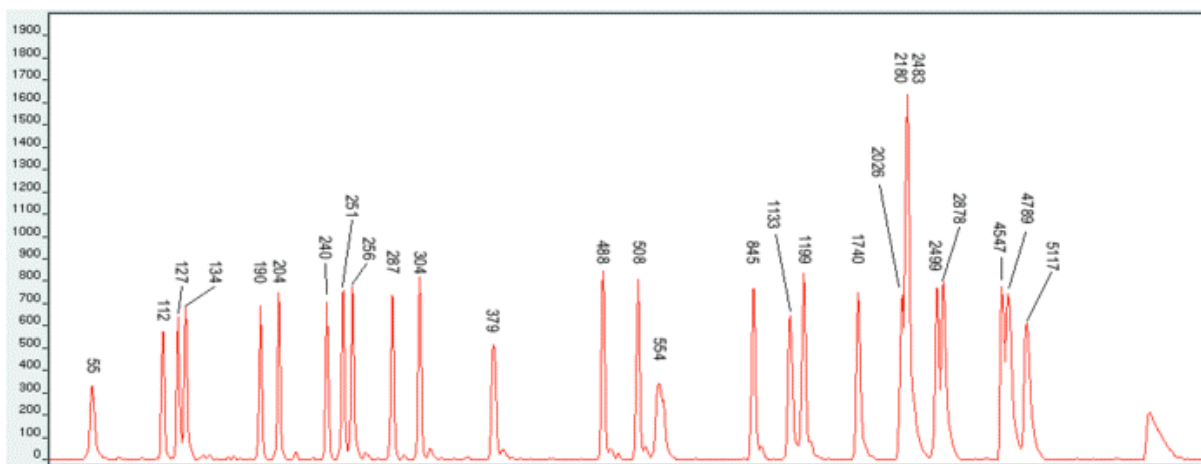


Abb. 6: Der DNA-Längenstandard ROX2500 ist bei der DNA-Fragmentanalyse in jeder Probe enthalten, die auf der Kapillarelektrophorese analysiert wird.

2.5.1.1. Markierte Oligonukleotide als Primer für die Fragmentanalyse

Die Primer, die für die cDNA-Synthese verwandt wurden, tragen ausschliesslich eine FAM-Fluoreszenz-Markierung (siehe Abschnitt 2.3.1). Die Kapillarelektrophoreseanlage (ABI310 von Applied Biosystems) kann zwar bis zu 5 unterschiedliche Fluoreszenzen in einer einzigen Analyse verarbeiten. Theoretisch liessen sich damit also simultan vier unterschiedliche RT-PCR-Ansätze und ein interner DNA-Längenstandard analysieren. Zum Einsatz kamen aber nur zwei Farbstoffe: neben dem bereits erwähnten FAM wurde eine ROX-Markierung bei den internen DNA-Längenstandards benutzt. Der Grund hierfür bestand darin, dass es offensichtliche Unterschiede gab bezüglich der messbaren Expressionsmuster im Differential Display in Abhängigkeit von der jeweils

verwandten Fluoreszenz-Markierung. Um derartige Fehler in der Analyse auszuschliessen, wurden alle RT-PCR-Analysen mit der gleichen Fluoreszenz-Markierung durchgeführt.

2.6. Agarose-Gelelektrophorese

Die PCR-Produkte, die im Differential Display differentielle Fragmente enthielten, wurden auf einem 1,5%igen Agarose-Gel (Sambrook und Russell, 2001) in 1X TAE-Puffer (40 mM Tris-Acetat, 1 mM EDTA) bei 50 Volt für 3 Stunden aufgetrennt. Die Banden wurden mit Skalpellklingen ausgeschnitten und mit dem "Gel Extraction Kit" der Firma Qiagen aus dem Gel isoliert. Diese Extrakte wurden anschliessend wieder mit der Kapillarelektrophorese analysiert, um sicherzustellen, dass die korrekte Bande ausgeschnitten wurde.

2.7. Reamplifikation

Die positiv identifizierten Gel-Extrakte wurden als Template für eine PCR-Reaktion (siehe Abschnitt 2.4.2) benutzt, allerdings wurden in dieser Reamplifikation statt der vorher benutzten modifizierten Random Primer M13-Sequenzierungsprimer eingesetzt, womit sichergestellt wurde, dass die spätere Sequenzierung mit gleichen Primern auch erfolgreich sein würde.

2.8. Klonierung in Plasmid-Vektor

An die Produkte der PCR-Reaktion wird durch die Taq-Polymerase, unabhängig von irgendeiner Template-Sequenz, an die 3'-Enden der eigentlich zunächst stumpfen Enden ("blunt ends") ein desoxy-Adenosin angefügt. Diese Reaktion ist bei weitem nicht so effektiv wie die normale Elongation in der PCR, aber durch die finale (vergleichsweise lange dauernde) Elongation in der PCR wird an allen 3'-Enden der bis dahin produzierten PCR-Fragmente diese Modifikation angefügt.

Die Firma Promega vertreibt ein Plasmid-Vektorsystem, bei dem an die "stumpfen" Enden der mit EcoRV linearisierten pGEM-5Zf(+)-Plasmide ein 3'-Thymidin angehängt wird. Diese Enden sind damit mit den PCR-Produkten kompatibel, die soeben beschrieben wurden. Eine Ligation der PCR-Produkte in diesen Vektor verläuft dadurch sehr effektiv und produziert eine große Zahl von Klonen nach der Transformation in Transformations-kompetente JM109-Bakterien. Eine Religation der Vektoren sollte zusätzlich zu den zueinander inkompatiblen Enden der Vektoren dadurch vermieden werden, dass die Enden der Vektor-Moleküle vom Hersteller dephosphoryliert wurden, so dass zwischen zwei Enden von Vektor-DNA keine Phosphodiester-Bindung mehr gebildet werden kann.

Die Ligationsreaktion wurde folgendermaßen auf Eis zusammenpipettiert:

- 2,5 µl 2X Ligase Puffer, Promega
- 0,5 µl pGEM-T-Vektor, Promega
- 1,5 µl PCR-Fragment (1,5-3 ng)
- 0,5 µl T4-Ligase.

Dieser Ansatz wurde über Nacht bei 4°C inkubiert. Danach wurden je 1,6 µl der Ligationsansätze in 1,5 ml-Reaktionsgefäße pipettiert und auf Eis gestellt. Die Transformations-kompetenten JM109-Bakterien wurden auf Eis aufgetaut und jeweils 40 µl davon auf die Ligationsansätze pipettiert und sehr vorsichtig verrührt. Diese Gefäße wurden dann für 20 Minuten auf Eis gestellt, dann für 45-50 Sekunden in ein 42°C warmes Wasserbad gestellt, wobei die Gefäße möglichst nicht geschüttelt werden

sollten, und dann wieder für 2 Minuten auf Eis gestellt.

Danach kamen jeweils 760 μl SOC-Medium (Raumtemperatur) dazu und die Gefäße wurden für 1,5 Stunden bei 37°C inkubiert. Zuletzt wurden je 150 μl der Transformationsansätze auf Nährböden, die Ampicillin (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) enthielten, ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.9. Klon-Identifizierung

In jeder der Petrischalen konnten am nächsten Tag hunderte Klone gezählt werden. Das bedeutete, dass in diesen Fällen geschlossene Plasmide bei der Transformation in die Bakterien gelangt sind, die dadurch die Ampicillin-Resistenz exprimieren und wachsen konnten. Die Klonierungseffizienz lag über 10^5 Klone je μg DNA. Allerdings kam es auch in den Kontroll-Ansätzen ohne Insert-DNA zu Religationen des Vektors, so dass auch auf diesen Nährböden eine Klonierungseffizienz von ca. 10^3 Klonen je μg DNA festgestellt werden musste. Offensichtlich war die Vektor-DNA nicht komplett so modifiziert, wie es im vorigen Abschnitt beschrieben wurde. Man musste also mit einem gewissen Anteil irregulärer Klonierungs-Produkte rechnen.

Die Plasmid-Klone, die die Inserts enthielten, die einer differentiellen cDNA im Differential Display entsprachen, wurden wie folgt identifiziert:

Mit 6 Klonen von jeder Petrischale wurden je 100 μl Flüssigmedium für die Bakterienkultur mit 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Ampicillin angeimpft und über Nacht bei 37°C inkubiert. Von diesen Kulturen wurde je 1 μl in 100 μl Wasser resuspendiert und dann für 10 Minuten auf 95°C geheizt. Davon wurde dann jeweils 1 μl als Template für eine PCR-Reaktion benutzt (siehe Abschnitt 2.4.2). Die Analyse der PCR-Produkte mit der Kapillarelektrophorese führte zur Identifikation der Plasmid-Klone mit den gewünschten Inserts. Dieselben PCR-Produkte dienten dann auch zur Sequenzierung.

2.10. Sequenzierung

Plasmid-DNA der identifizierten Klone bzw. die PCR-Produkte, die bei der Klon-Identifizierung anfielen, wurden zur Sequenzierung zur Firma MWG-Biotech versandt, die mit Hilfe der mitgeschickten M13-Sequenzierungsprimer die Sequenzen der differentiell exprimierten cDNAs bestimmte. Anschliessend wurden zu diesen Sequenzen homologe Sequenzen gesucht, um die differentiell exprimierten Gene näher charakterisieren zu können (Newman et al., 1994).

3. Ergebnisse

3.1. Multipler Differential Display

Mit Hilfe der GeneScan-Software für die ABI310-Kapillarelektrophoreseanlage lassen sich die Analysen der RT-PCR-Produkte von allen Zeitpunkten der Gravistimulation miteinander vergleichen, nicht nur paarweise. Dabei wird mit Hilfe des internen, ROX-markierten Längenstandards jede Analyse entsprechend der DNA-Fragmentgröße gestreckt. Weil der interne Standard sehr zuverlässig und genau ist, lassen sich mehrere derart gestreckte Analysen zu einem Bild kombinieren, dem multiplen Differential Display. Im diesem multiplen Differential Display lassen sich leicht differentielle Banden nachweisen. Dabei werden die internen Längen-Standards ausgeblendet und die Kurven für die verschiedenen Gravistimulations-Dauern unterschiedlich gefärbt: 0 Minuten = Grün, 15 Minuten = Blau, 30 Minuten = Rot, 45 Minuten = Orange, 60 Minuten = Schwarz

3.1.1. Differentielle Peaks

3.1.1.1. Differentielle Peaks mit Primer B-08-Mod

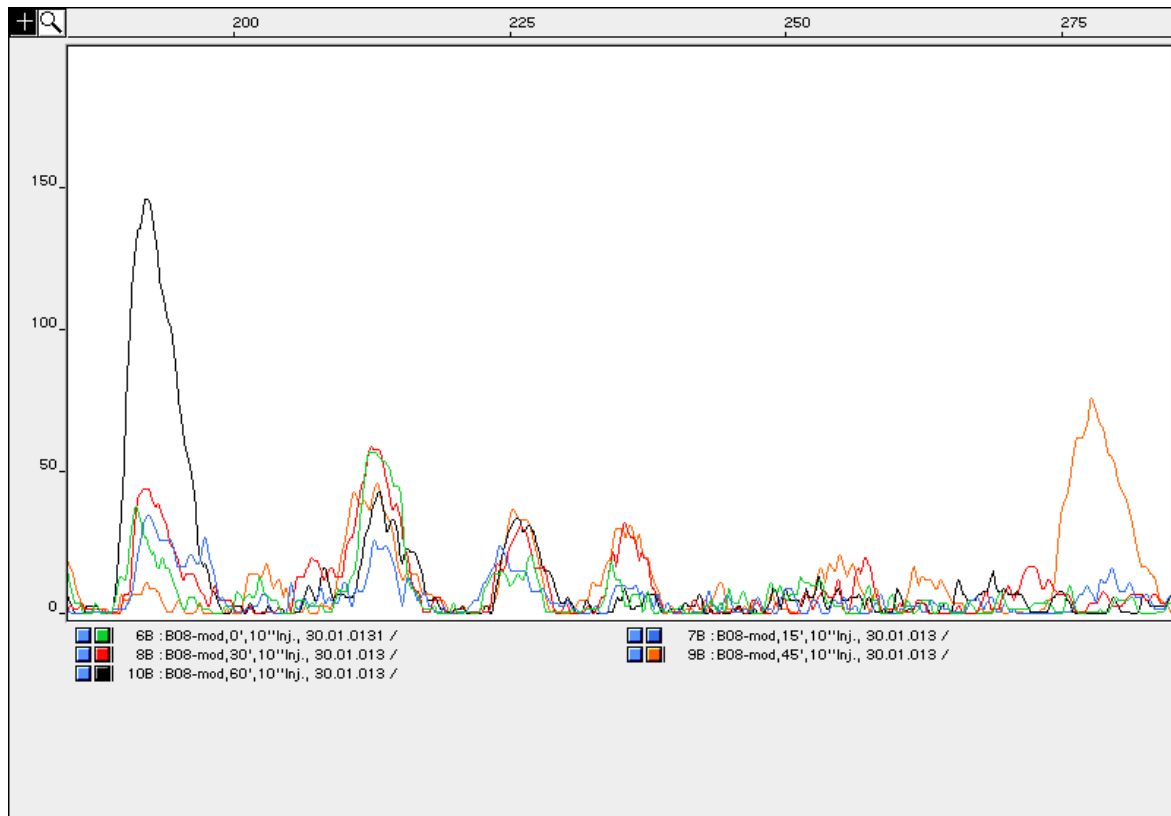


Abb. 7: Differential Display nach Gravistimulation mit Primer B08-Mod: differentieller Peak (mit Expressionsraten-Differenz > Faktor 2) bei 192 bp und 276 bp. Die Färbung der Kurven entspricht der Dauer der Gravistimulation: 0 Minuten = Grün, 15 Minuten = Blau, 30 Minuten = Rot, 45 Minuten = Orange, 60 Minuten = Schwarz

In Abb. 7 lässt sich das Expressionsverhalten unterschiedlicher Gene ablesen. Man kann fünf klar unterscheidbare Amplifikate erkennen (192 bp, 212 bp, 225 bp, 231 bp und 276 bp), die in dem betrachteten Zeitraum von einer Stunde eine Expressionsänderung um mindestens Faktor 2 aufweisen. Das zeitliche Verhalten ist aber keineswegs einheitlich. Während sich die Expressionsrate z.B. bei dem Amplifikat von 212 bp sehr schwankend darstellt, erhöht sie sich bei dem Produkt von 225 bp innerhalb

von 30 Minuten, um dann stabil zu bleiben. Bei dem Produkt von 231 bp verhält es sich ähnlich, allerdings geht die Expressionsrate nach 45 Minuten wieder auf das ursprüngliche Niveau zurück. Schliesslich gibt es zwei Amplifikate, die nur an einem der Zeitpunkte eine Änderung der mRNA-Menge zeigen (bei 192 bp und bei 276 bp). Das kann daran liegen, dass die Expression erst nach 45 Minuten messbar gesteigert wurde (bei 192 bp) oder es handelt sich um einen Fehler in der Messung (wahrscheinlich bei 276 bp). Die Wahrscheinlichkeit für einen Fehler liegt in einem Fall, wo die Expression unvermittelt und besonders stark ansteigt, um bei dem nächsten Zeitpunkt wieder auf Normal-Maß zu fallen, natürlich höher als in einem Fall, wo die erhöhte Genexpressionsrate gerade erst zum Ende der betrachteten Zeitreihe einsetzt.

3.1.1.2. Differentielle Peaks mit Primer B-10-Mod

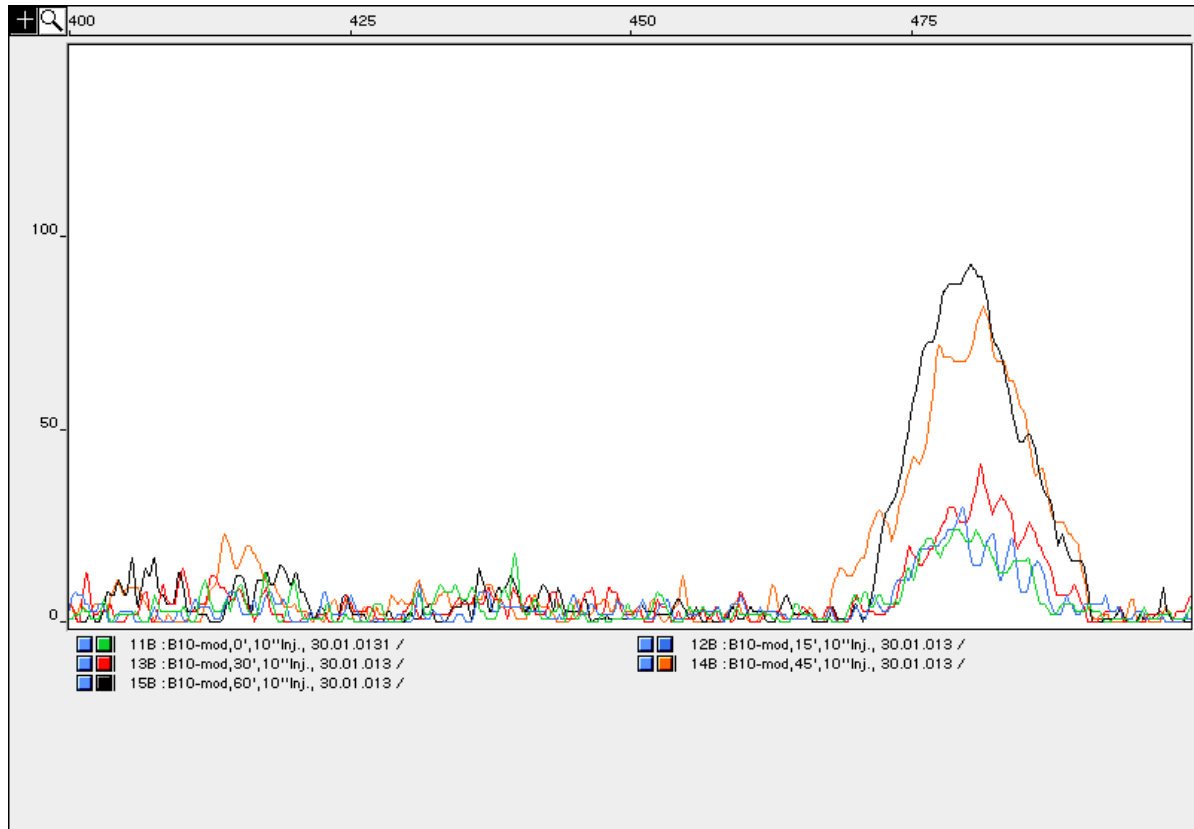


Abb. 8: Differential Display nach Gravistimulation mit Primer B10-Mod: differentielle Bande bei 480 bp

Mit Primer B-10-Mod liess sich bei 480 bp ein gravitroper, differentieller Peak nachweisen, der ein Einsetzen der gravitropen Reaktion nach 15 Minuten zeigt, die dann aber stetig bis 60 Minuten weiter ansteigt (Abb. 8). Weil die Zunahme zwischen 45 und 60 Minuten aber nur noch gering ausfällt, kann man annehmen, dass innerhalb dieser Zeit auch das Maximum der spezifischen gravitropen Reaktion erreicht wird.

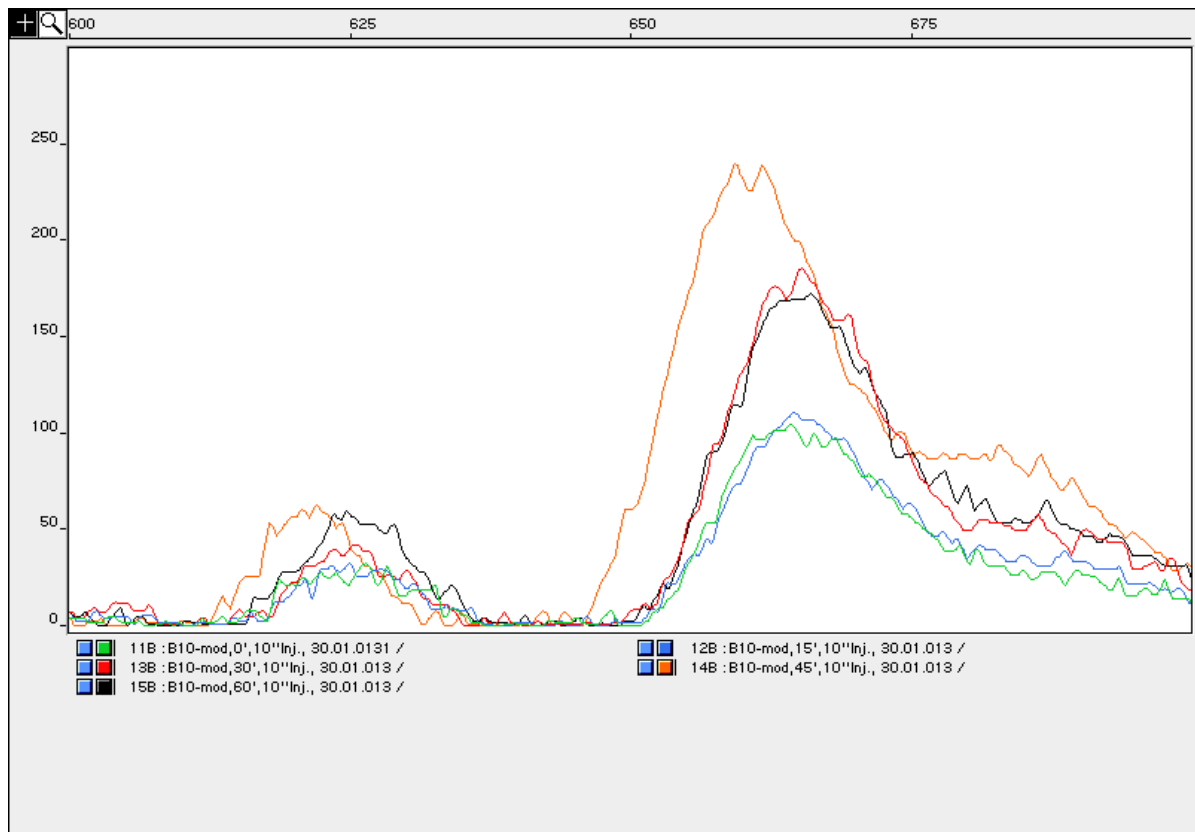


Abb. 9: Differential Display nach Gravistimulation mit Primer B10-Mod: differentielle Bande bei 666 bp

Bei 666 bp erzeugt Primer B-10-Mod einen Peak, der sein Maximum offenbar schon bei ca. 45 Minuten erreicht (Abb. 9). Dieses Bild lässt sich erklären, wenn man von einer ausgesprochen kurzen Lebensdauer (durchschnittlich unter 30 Minuten) der entsprechenden mRNA ausgeht.

3.1.1.3. Differentielle Peaks mit Primer B-12-Mod

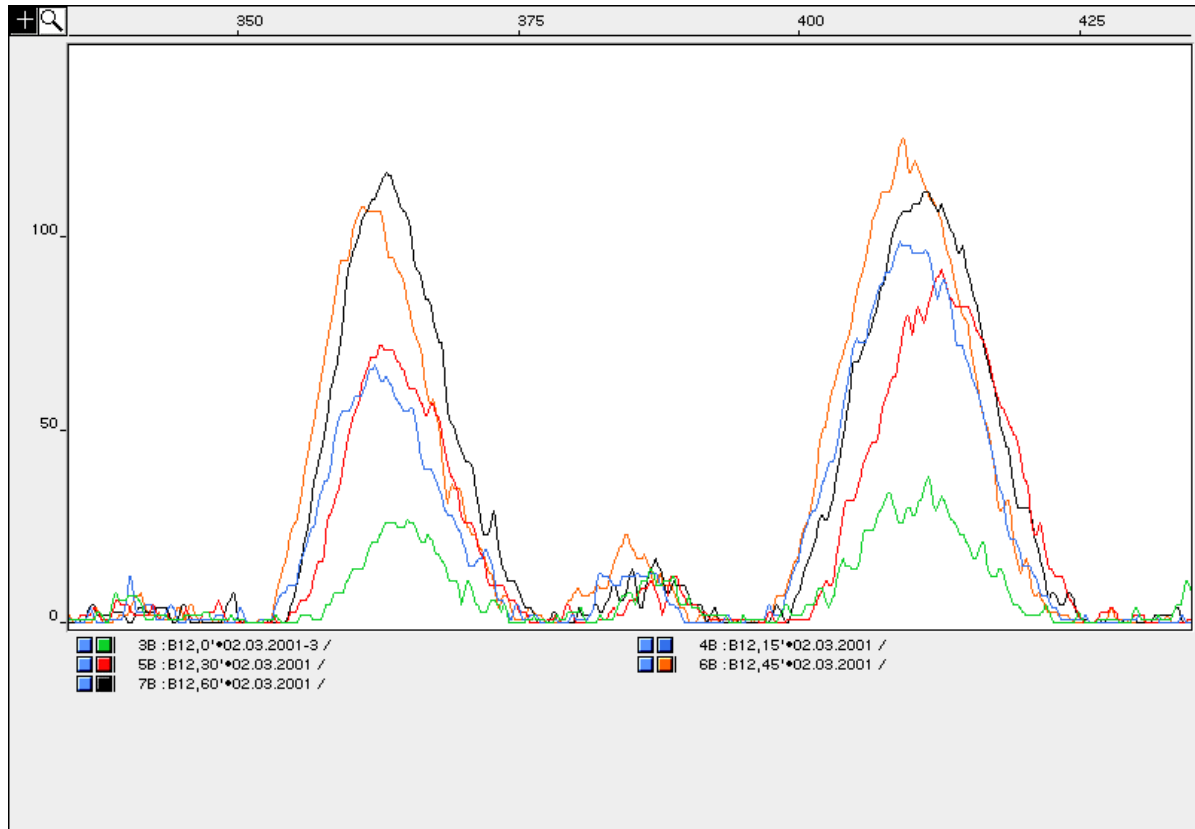


Abb. 10: Differential Display nach Gravistimulation mit Primer B12-Mod: differentielle Banden bei 365 bp und bei 415 bp

Primer B-12-Mod liefert zwei differentielle Peaks (Abb. 10), die sich sehr ähnlich im zeitlichen Verlauf darstellen: nach einem sehr schnellen Anstieg der Expressionsrate innerhalb der ersten 15 Minuten, geht die Steigerung (beinahe) stetig bis 45 Minuten weiter, um dann zu stagnieren.

3.1.1.4. Differentielle Peaks mit Primer B-15-Mod

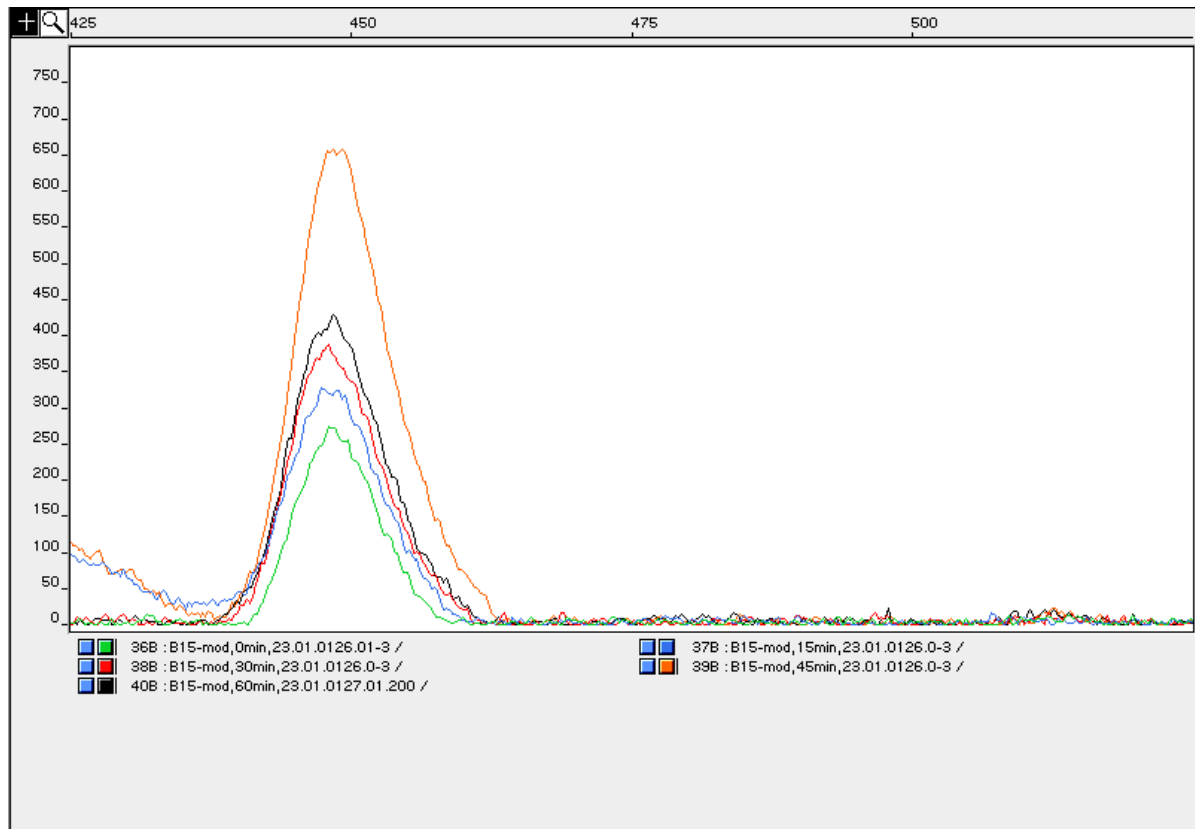


Abb. 11: Differential Display nach Gravistimulation mit Primer B15-Mod: differentielle Bande bei 448 bp

Primer B-15-Mod liefert bei 448 bp einen Peak (Abb. 11), der sich ähnlich verhält wie der von Primer B-10-Mod bei 666 bp amplifizierte: eine stetige Zunahme der Expressionsrate bis 45 Minuten, die dann wieder zurückgeht.

3.1.1.5. Differentielle Peaks mit Primer B-16-Mod

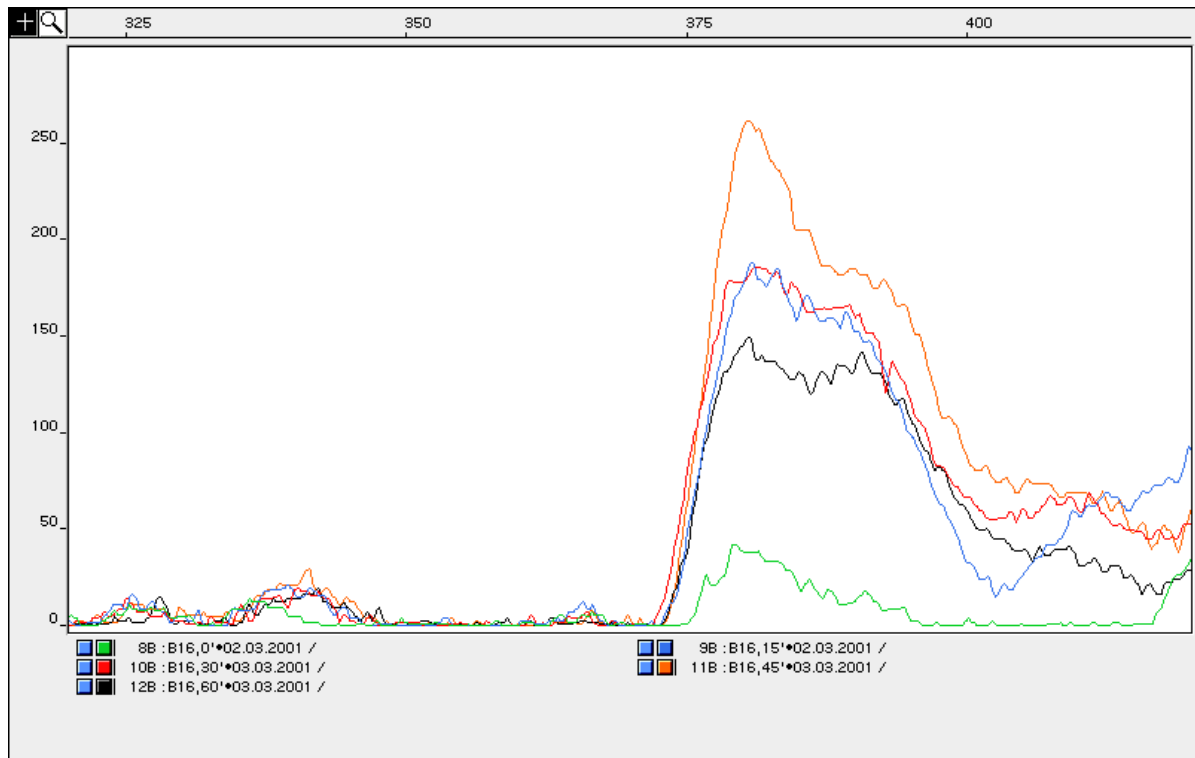


Abb. 12: Differential Display nach Gravistimulation mit Primer B16-Mod: differentielle Bande bei 384 bp

Auch Primer B-16-Mod liefert bei 384 bp einen Peak (Abb. 12), der eine stetige Expressions-Steigerung bis 45 Minuten darstellt, die dann wieder stark abfällt.

3.1.1.6. Differentielle Peaks mit Primer B-18-Mod

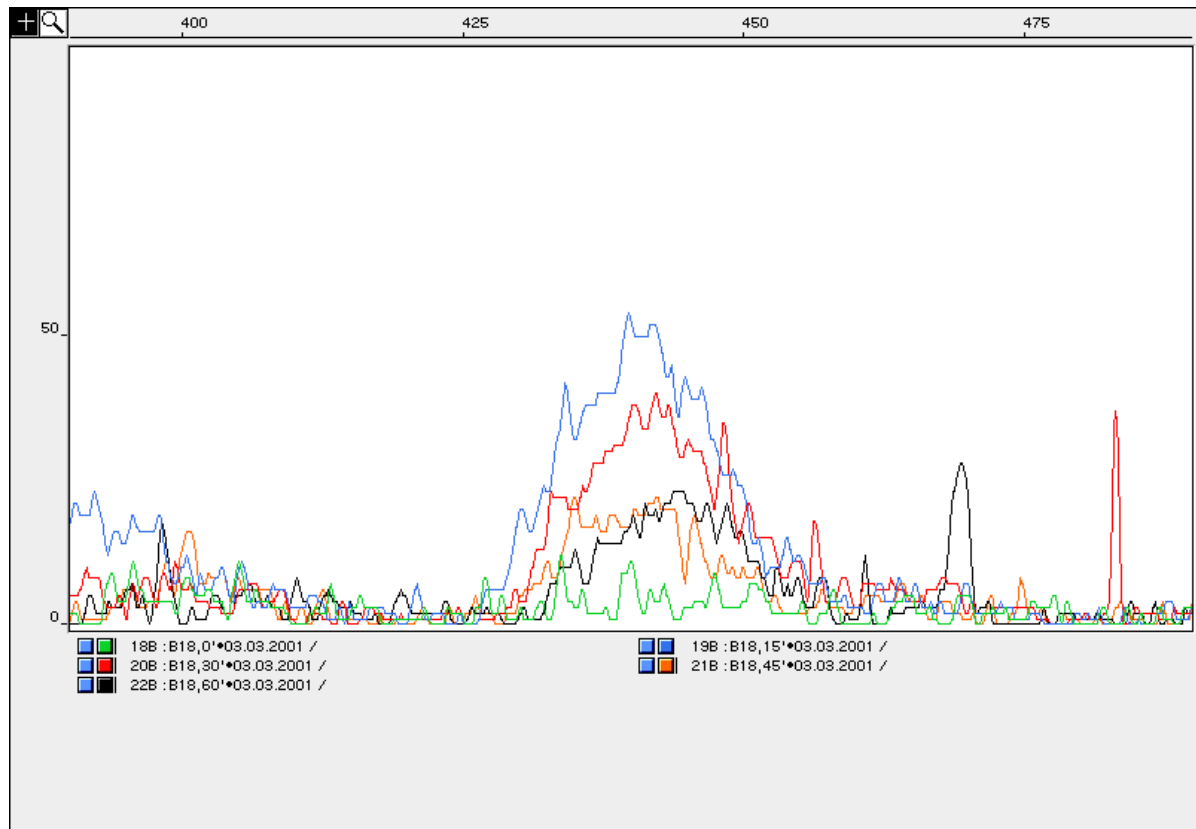


Abb. 13: Differential Display nach Gravistimulation mit Primer B18-Mod: differentielle Bande bei 443 bp

Primer B-18-Mod liefert den am schnellsten ansteigenden Peak (Abb. 13) mit einer Vervielfachung der Expressionsrate innerhalb der ersten 15 Minuten, die dann stetig wieder abfällt. Das sind starke Indizien für eine sehr frühe und starke gravitrope Reaktion dieses spezifischen Gens.

3.1.2. Licht-induzierte Kontrollen

In den Fällen, wo eine differentielle Genexpression nach Gravistimulation beobachtet wurde (siehe vorheriger Abschnitt 3.1.1.), wurden auch die phototropen Expressionsmuster nach 60 Minuten Lichteinwirkung ohne Gravistimulation bestimmt, um damit auszuschliessen, dass das unvermeidbare Licht im Umgang mit den gravitrop stimulierten Pflanzen der eigentliche Stimulus für die jeweilige spezifische Genexpression war. Als Referenz dienten dabei jeweils benachbarte Peaks, die auch aus den gravitrop induzierten cDNAs amplifiziert worden waren.

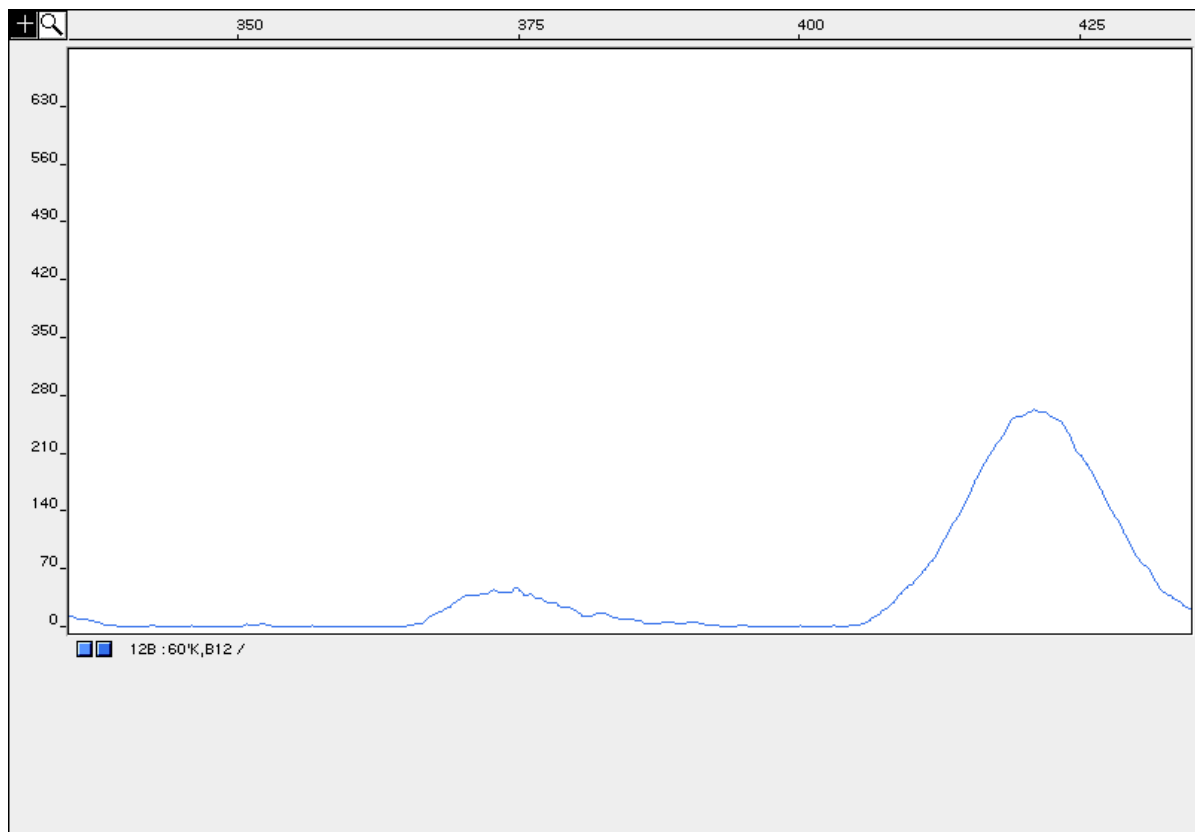


Abb. 14: Lichtinduziertes Expressionsmuster mit Primer B12-Mod nach 60 Minuten. Die differentielle Bande bei 365 bp ist anders als bei Gravistimulation wesentlich niedriger als die nächste Bande bei 415 bp. Deshalb kann die Bande bei 365 bp als gravitrop gelten, während die Bande bei 415 bp wahrscheinlich phototrop ist.

Insgesamt wurde nur eine der im vorigen Abschnitt als differentiell exprimiert identifizierten cDNAs als phototrop induziert festgestellt: das 415 bp-Amplifikat von Primer B-12-Mod (Abb. 10). Alle anderen differentiell exprimierten cDNAs müssen demnach als gravitrop exprimiert gelten.

3.1.3. Gravitrope Peaks

Die in den beiden vorangegangenen Abschnitten als differentiell, aber nicht phototrop exprimiert beschriebenen cDNA-Amplifikate waren alle so lang, dass mit hinreichender Sicherheit davon ausgegangen werden kann, dass eine Sequenzierung in jedem Fall genügend Daten ergeben würde, um eine Identifikation der jeweiligen Sequenz zu erlauben.

Differential Display in	Primer	Amplifikat	max. Expr.-rate	sequenziert	homolog zu
Abb. 7	B-08-Mod	192 bp	bei 60 Minuten		
Abb. 8	B-10-Mod	480 bp	bei 60 Minuten		
Abb. 9	B-10-Mod	666 bp	bei 45 Minuten	X	Ran (G-Protein)
Abb. 10	B-12-Mod	365 bp	bei 60 Minuten	X	?
Abb. 11	B-15-Mod	448 bp	bei 45 Minuten		
Abb. 12	B-16-Mod	384 bp	bei 45 Minuten	X	Ran (G-Protein)
Abb. 13	B-18-Mod	443 bp	bei 15 Minuten	X	plastid. ATPase

Tabelle 4: Mit sechs verschiedenen modifizierten Random Primern wurden sieben verschiedene gravitrop exprimierte cDNAs amplifiziert. Aus dem Zeitpunkt der maximalen Expression kann man Rückschlüsse auf die Stellung des jeweiligen Genprodukts im zeitlichen Ablauf der gravitropen Reaktion ziehen.

3.2. Reamplifikation der gravitropen cDNAs

Die als gravitrop exprimiert identifizierten Amplifikate wurden (gemäß Abschnitt 2.6 und Abschnitt 2.7.) aus präparativen Agarosegelen (Abb.15) extrahiert, ihre Identität über die Kapillarelektrophorese bestimmt und dann mit M13-Sequenzierungs-Primern reamplifiziert, bevor sie in die pGEM-Easy-T-Vektoren (Promega) ligiert wurden.

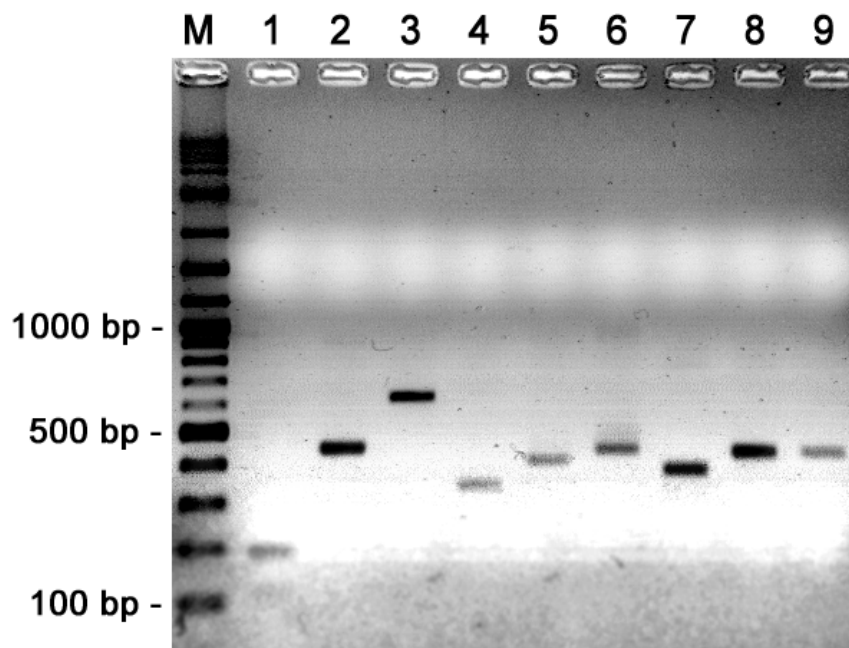


Abb. 15: Agarosegel mit Re-Amplifikaten. M=DNA-Längenmarker, 1= Bande aus Primer B08-Mod, 192 bp; 2= Bande aus Primer B10-Mod, 480 bp; 3= Bande aus Primer B10-Mod, 666 bp; 4= Bande aus Primer B12-Mod, 365 bp; 5= Bande aus Primer B12-Mod, 415 bp; 6= Bande aus Primer B15-Mod, 448 bp; 7= Bande aus Primer B16-Mod, 384 bp; 8+9= Bande aus Primer B18-Mod, 443 bp

3.3. Klon-Analysen

Die gemäß Abschnitt 2.8. und Abschnitt 2.9. hergestellten und mittels Kapillarelektrophorese identifizierten Plasmid-Klone (Abb.16) wurden mit Hilfe eines Plasmid-Isolierungs-Kits der Firma Qiagen gereinigt.

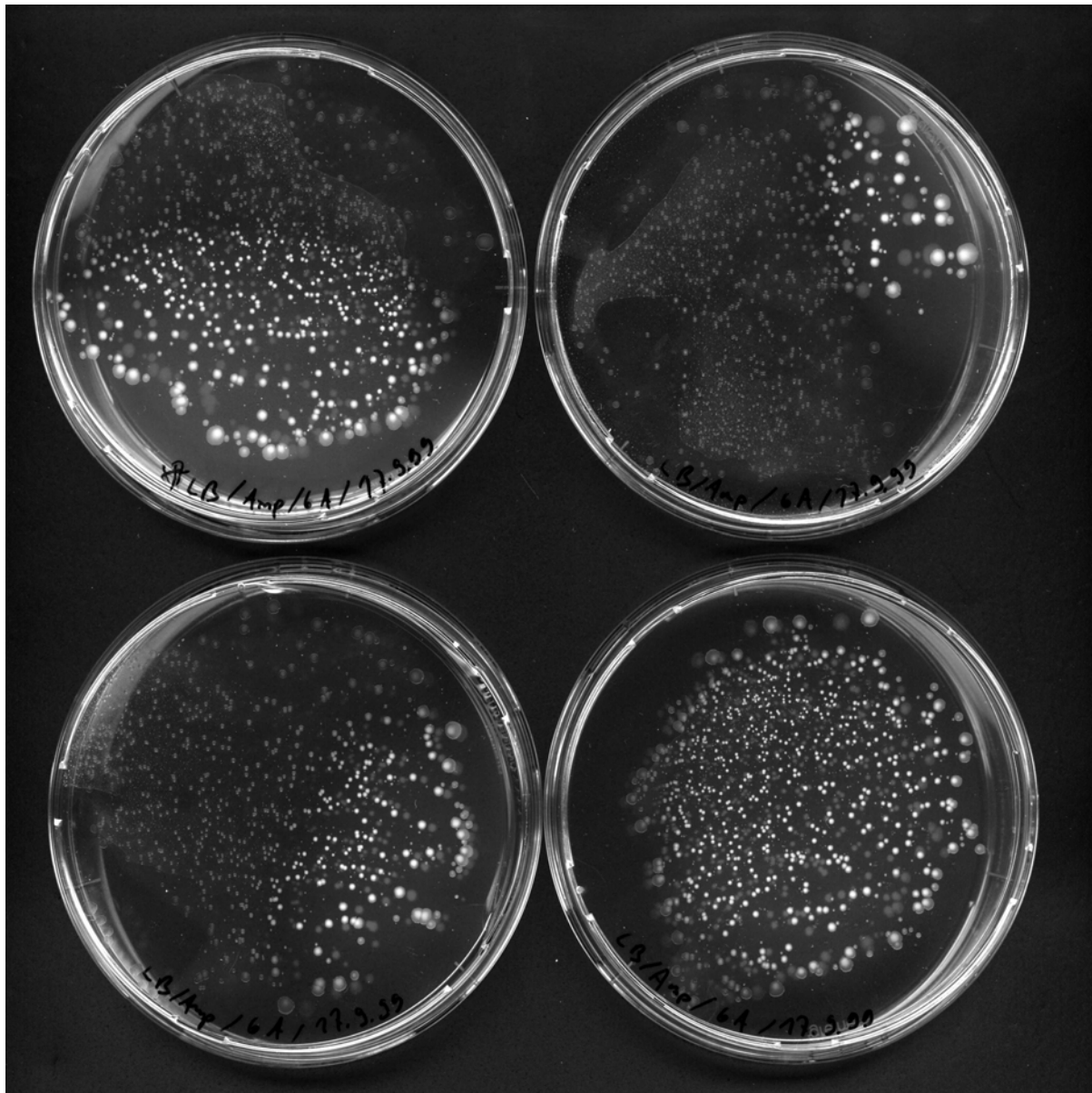


Abb. 16: Auf den über Nacht inkubierten Petrischalen mit Ampicillin haben sich jeweils hunderte Bakterien-Klone entwickelt, die jeweils einheitliche (klonale) Plasmide enthalten.

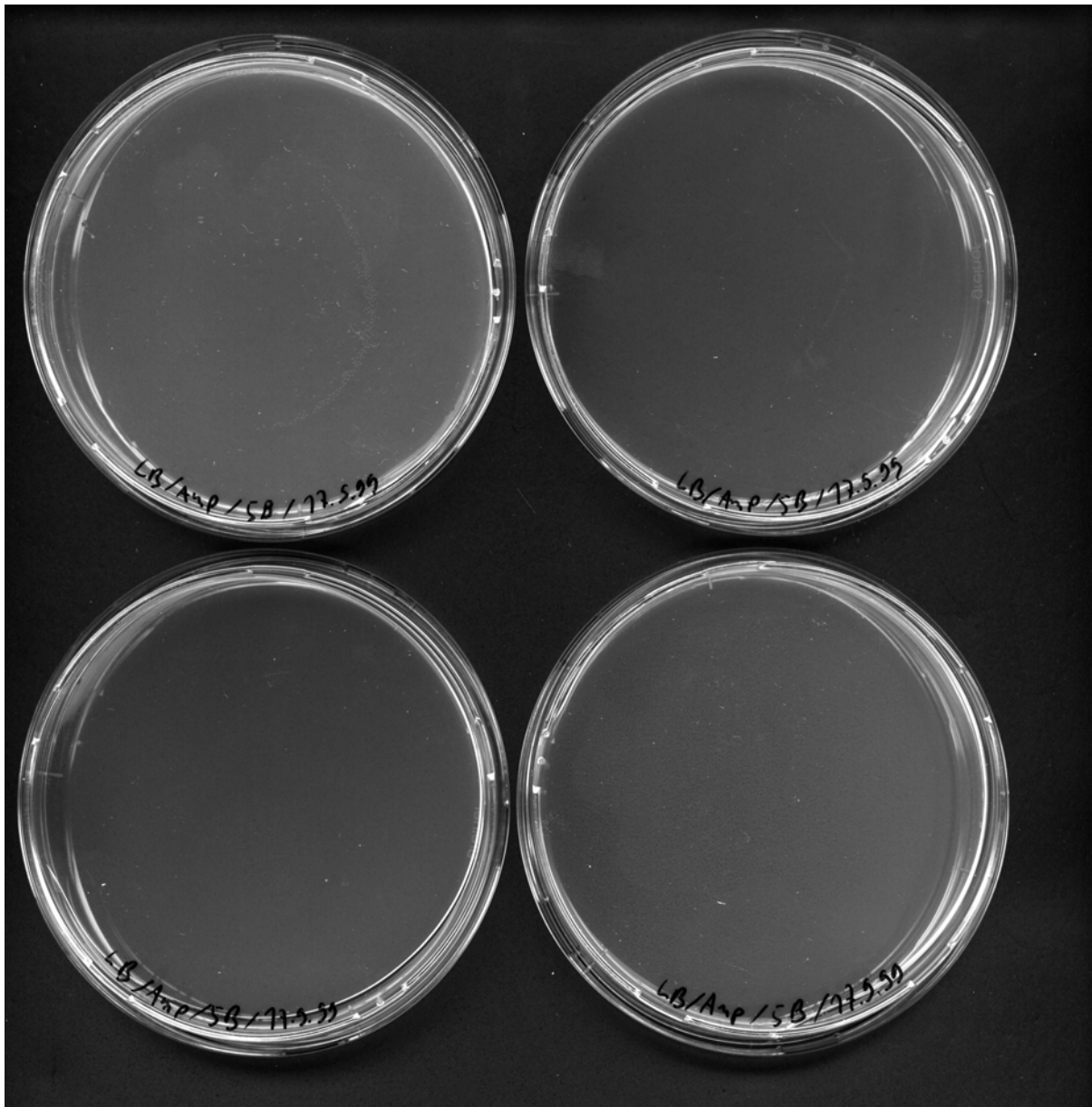


Abb. 17: Die Ligationsansätze ohne DNA-Insert (RT-PCR-Produkt) hätten auf Grund der 3'-Adenylierung der Insert-DNAs und der Dephosphorylierung der Vektor-Enden keine Ligation und damit auch keine Ampicillin-resistenten Bakterienklone zeigen dürfen. Dass die genannten Modifikationen der Vektoren- und Insert-DNAs regelmässig zu einem gewissen Grad fehlen, zeigt dieses Beispiel, in dem einige wenige Bakterienklone auf den Religations-Kontrollplatten gewachsen sind. Im Vergleich zu den eigentlichen Ligationsansätzen lässt sich aber auch feststellen, dass diese mit sehr

hoher Wahrscheinlichkeit tatsächlich Plasmide enthalten, in die eine Insert-DNA ligiert wurde.

Bei der Klon-Analyse traten keine Komplikationen auf, was darauf hindeutet, dass die benutzten Vektoren der Firma Promega, wie erwartet, funktionierten. Die gelegentlich vorkommenden Religationen der Plasmide wurden schnell durch die Größenbestimmung der Plasmid-Inserts auf der Kapillarelektrophorese identifiziert.

3.4. Sequenzen

Die gereinigten Plasmid-DNAs bzw. die gereinigten PCR-Produkte aus der Klon-Analyse wurden zur Sequenzierung zur Firma MWG-Biotech gesandt.

Die Sequenzierungen waren in 4 Fällen erfolgreich.

Für das 666 bp-Amplifikat von Primer B-10-Mod wurde folgende Sequenz gefunden:

```
>b10-666      71..614 of trace file
CATGTTTGATGTAACCGCAAGATTGACTTACAAGAATGTTCCCACATGGCATCGTGATCT
TTGCCGTGTGTGTGAAAACATCCCAATCGTGCTTGTGCGGTAACAAGGTTGATGTAAAGA
ACCGTCAAGTGAAGGCAAAACAGGTTACTTTCCATAGAAAGAAGAACCTGCAGTATTATG
AGATCTCAGCCAAGAGCAATTACAACCTTTGAGAAGCCATTTCTTTATCTCGCCCGGAAAC
TTGCTGGAGACCCCAATTTGCATTTTGTGCGAGTCTCCTGCCCTTGCTCCTCCAGAAGTGC
AAATAGACATGGCCGCACAACAACAGCATGAAGCAGAGCTTGCTGCAGCTGCTAGCCAGC
CGCTTCCAGATGATGATGATGATGCTTTTGAATAGGGTCCAAAAGTTGAAGCGGATTTTA
TGAGGGTTTGTGTCTGTTGAGTTTTGGATTGTTGAATGGTTTTATTATAAACGTTTGTA
GGATGCAGTGAGGTTTGTGTTTGCAAAAAAAAAAAAAAAAAAATAGCTAAGAGGGGGGGGG
GGGG
```

Diese Sequenz hat weitgehende Homologien mit einem G-Protein aus zahlreichen Spezies. Diese Homologie wird im Abschnitt 4.2. näher erörtert.

Für das 365 bp-Amplifikat von Primer B-12-Mod wurde folgende Sequenz gefunden:

```
>b12-365      29..365 of trace file
TGGTACAGTGAGATGAAAAAGCTGAACAATGGTGTACGGTTGAGTTTGATGGATACATG
AGGGCTTCTGTTGACACCGAGGTTTTCTGAGGGGCAAAAAGCAAATCGAGACTTTTAAT
GATCTCACCAGAGACTGGTAAGGATGGTATCAACACTTTGCAGTTCTTGAGGTTTTTGAG
TTCTCTCATGTTTGTATGTTAAGTTAAAGTCACTTGTTACAAGTTTTGTTGTTTAAACA
GATAATTTGACATTAAGTAGCACTGTCTTATTTATTTTTTCCAATGTGTTTGTATCAA
TAGTAAGTTATGCTTTGTCTCTCAAAAAAAAAAAAAA
```

Für das 384 bp-Amplifikat des Primers B-16-Mod wurde folgende Sequenz gefunden:

```
>b16-384      27..320 of trace file
TTGTTCGAGTCTCCTGCCCTTGCTCCTCCAGAAGTGCAAATAGACATGGCCGCACAACAAC
AGCATGAAGCAGAGCTTGCTGCAGCTGCTAGCCAGCCGCTTCCAGATGATGATGATGATG
CTTTTGAATAGGGTCCAAAAGTTGAAGCGGATTTTATGAGGGTTTGTGTCTGTTGAGTTT
TGGATTGTTGAATGGTTTTATTATAAACGTTTGGTAGGATGCAGTGAGGTTTGTGTTTGT
ATTTTTGGTGTGTGAAGCAATGTTTGGGTGTTGAGTTTCAAAAAAAAAAAAAA
```

Auch diese Sequenz hat weitgehende Homologie mit dem gleichen G-Protein wie das 666 bp-Amplifikat von Primer B-10-Mod (siehe Abschnitt 4.2.)

Für das 443 bp-Amplifikat des Primers B-18-Mod wurde folgende Sequenz gefunden:

```
>b18-443      8..396 of trace file
TAGGTATTTTGAGATACGCCTTAACGACCAATGGCTAACGATGGCTCTGATGGGCGGTTT
TGCTAGAATAGGTAATAATGAAATCACTGTTTTAGTAAATGATGCAGAGAAAAGTAGTGA
CATTGATCCACAAGAAGCTCAGCAAACCTTGAAATAGCAGAAGCTTGCTTTGAGAAAAG
CTTGAAGGAAAGAGACAAACAATCGAGGCAAATCTAGCTCTCCGACGGGCTAGGACACGA
GTAGAGGCTATCAATGCCATTTTATAACCAGTCGGTGCGTCCAAATAAGCATCGATTTAT
ACTTTGGTTGTTTTGTTTACTTGATGCTGTTCGATTAAAAACAATCAAGCGCAATCATAT
TTTGATGCAACAAAAAAAAAAAAAAAAAAT
```

Diese Sequenz hat weitgehende Homologie mit einem Chloroplasten-Gen für eine plastidäre ATPase-Untereinheit.

4. Diskussion

4.1. Differential Display

Es gibt mittlerweile eine ganze Reihe Methoden, die die vergleichende Analyse der Genexpression zulassen (z.B. Kozian und Kirschbaum, 1999). Prinzipiell werden dabei immer die Analysen von cDNA-Synthese (mittels reverser Transkription = RT) und anschließender PCR (zusammengefasst als "RT-PCR" bezeichnet) von zwei oder mehr zu analysierenden Geweben miteinander verglichen (Liang und Pardee, 1992). Bei diesem Vergleich fallen Unterschiede besonders gut ins Auge. Z.B. in einem Autoradiogramm von einem Polyacrylamidgel, in dem die radioaktiv markierten RT-PCR-Produkte unterschiedlicher Gewebe aufgetrennt wurden, sind Unterschiede in den Expressionsmustern dieser Gewebe leicht zu erkennen. Weil gerade diese Unterschiede das eigentliche Ziel dieser Betrachtungsweise sind, spricht man von differentieller Darstellung ("differential display"). Die Extraktion und weitere Analyse differentieller Banden erfolgt dann wieder mit etablierten molekulargenetischen Methoden, so dass man schliesslich die Sequenzen der differentiell exprimierten Gene erhält.

4.2. Homologien identifizierter RT-PCR-Produkte und ihrer Sequenzen

4.2.1. Homologie-Betrachtungen und Alignments

Wenn man mit den ermittelten Sequenzen in der GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) nach homologen Sequenzen sucht, die dort bereits publiziert wurden, erhält man eine Reihe von Sequenzen anderer Spezies mit ähnlicher Sequenz, die man in einem sogenannten multiplen Alignment darstellen kann, das mit dem Programm CLUSTALW erstellt wird (Abschnitt 6.1.). Dabei werden identische Sequenzabschnitte homologer Sequenzen so nebeneinander gestellt und, wenn nötig, gestreckt, dass übereinstimmende ("Consensus"-) Sequenzen direkt

übereinander liegen und markiert werden.

Bei Alignments von Nukleotidsequenzen sollte man immer beachten, dass man die Orientierung der Sequenz einheitlich handhabt, d.h. die Poly-A-Sequenz in allen zu vergleichenden Sequenzen am 3'-Ende belässt. In Fällen, in denen nicht sicher ist, in welcher Orientierung eine Teilsequenz der cDNA kloniert wurde, weil z.B. in dieser Teilsequenz die Poly-A-Sequenz fehlt, muss man auch die komplementäre Sequenz für die Homologie-Analysen benutzen, um die eigentliche cDNA-Sequenz über die Homologie zu bereits publizierten Sequenzen von ihrer komplementären Sequenz zu unterscheiden.

Durch die Redundanz des genetischen Codes können die Nukleotid-Sequenzen zweier Gene an sehr vielen Stellen differieren, während die Aminosäure-Sequenz der codierten Proteine identisch ist (als Beispiel sei das in dieser Arbeit gefundene Ran von *Helianthus annuus* im Vergleich zum Ran von *Lotus japonicus* genannt; siehe Abschnitt 6.1.3.). Konservierte Protein-Strukturen sind dank der dadurch konservierten Proteinfunktion für die Organismen physiologisch sinnvoll und werden deshalb in der Evolution bevorzugt. Um diese konservierten Protein-Strukturen genetisch zu kodieren, gibt es aber verschiedene Möglichkeiten, auf die der gleiche Evolutionsdruck ausgeübt wird, so dass die Nukleotidsequenzen mit kleinerer phylogenetischer Nähe der Organismen immer weiter differieren, und sich gleichzeitig in den Aminosäuresequenzen nur kleine Unterschiede zeigen.

Viel deutlichere Homologien zeigen sich also im Vergleich von Aminosäuresequenzen. Der Nachteil dieser Analysen liegt in der Vielzahl an Möglichkeiten begründet, wie ein Gen in einer doppelsträngigen, klonierten cDNA-Sequenz enthalten sein kann: Die drei möglichen Leseraster der Nukleotidsequenz, in denen das fragliche Gen kodiert sein kann, und beide möglichen Orientierungen, ergeben zusammengenommen sechs verschiedene Aminosäuresequenzen, von denen aber nur eine tatsächlich exprimiert wird. Gelegentlich müssen also Homologie-Suchen mit mehreren Aminosäuresequenzen, die von einer einzigen Nukleotidsequenz abgeleitet wurden, gemacht werden (z.B. bei B-12-Mod-365; Abschnitt 6.1.2.b)).

Schliesslich gibt es auch Sequenzabschnitte in der cDNA, die nicht translatiert werden. Sofern diese Sequenzen 5' vom Start-Codon liegen, sind sie z.B. als Promotor-Sequenzen zu einem großen Grad konserviert und lassen über Homologie-Suchen

entsprechende Promotoren anderer Gene finden. In der Regel erhält man bei der RT-PCR diese Sequenzen aber erst nach den translatierten Sequenzen, so dass die Identität des Gens dann schon festgestellt wurde. Für die Analyse der Genexpressions-Steuerung sind diese Sequenzen in jedem Fall äusserst bedeutend. Wenn aber durch die RT-PCR zunächst nur eine 3'-nicht-translatierte Sequenz ermittelt wird, die durch den geringen Evolutionsdruck sehr stark von Art zu Art differiert, hat man kaum genügend Informationen, um mit einer solchen Sequenz ein Gen identifizieren zu können (z.B. bei B-12-Mod-365; Abschnitt 6.1.2.b)).

4.2.2. Homologien der gravitrop exprimierten Sequenzen

Wie in Tabelle 4 (Abschnitt 3.1.3.) gezeigt wurde, konnten mit sechs verschiedenen Primern sieben gravitrop exprimierte cDNAs amplifiziert werden, von denen letztlich vier erfolgreich sequenziert werden konnten. Diese Sequenzen (Abschnitt 3.4.) gravitrop exprimierter Gene stellen das wichtigste Ergebnis der vorliegenden Arbeit dar.

Die Nukleotid-Sequenz von B-10-Mod-666 weist einen sehr hohen Homologiegrad mit pflanzlichen GTP-bindenden Proteinen, sogenannten Ran-Proteinen auf (Abschnitt 6.1.1.a)). Die sieben GenBank-Einträge mit der höchsten Homologie zu B-10-Mod-666 sind im Abschnitt 6.2.1. aufgeführt. Die Aminosäuresequenz, die man von einem der *reading frames* von B-10-Mod-666 ableiten kann, ist zu 100% identisch mit der Aminosäuresequenz von Ran1B von *Lotus japonicus* (Abschnitt 6.1.1.b).

Nach diesem Vergleich kann man davon ausgehen, dass das 666 bp-Amplifikat von Primer B-10-Mod ein Teil der Ran-cDNA von *Helianthus annuus* ist.

Ran (Merkle, 2004) ist ein regulatives Protein, das GTP im Kern bindet und in dieser Konformation an Proteine (Transportrezeptoren) bindet, die nur so den Export von mRNA, tRNA und ribosomaler RNA durch die Kernporen bewerkstelligen können. Im Cytosol wird das gebundene GTP dann zu GDP hydrolysiert, nachdem die transportierten Moleküle freigegeben wurden. In dieser Form bindet Ran an Transportfaktoren, die Proteine (z.B. Transkriptionsfaktoren oder Chromatin-Proteine) in den Kern transportieren. Auf diese Weise wird die Transkription räumlich von der

Translation getrennt. Vermutlich ist diese Trennung notwendig, um die Translation der primären Transkripte, die noch Introns enthalten, und ihrer unreifen, heterogenen Folgeformen (heterogene nukleäre RNA = hnRNA) zu verhindern. Ausserdem ist Ran an der mitotischen Kernhüllenbildung und dem Aufbau der Spindelfasern beteiligt, spielt also auch eine wichtige Rolle beim Auf- und Umbau des Cytoskeletts.

Nach der Homologie-Analyse (Abschnitt 6.1.3.) handelt es sich bei dem 384 bp großen Amplifikat von Primer B-16-Mod ebenfalls um einen Teil der *Helianthus annuus*-cDNA für Ran. Die fünf GenBank-Einträge mit der höchsten Homologie zu B-16-Mod-384 sind im Abschnitt 6.2.3. aufgeführt.

Das Alignment der Sequenzen mit CLUSTALW zeigt eindeutig die Homologie (Abschnitt 6.1.3.). Beim Vergleich der Aminosäuresequenzen fällt allerdings auf, dass in der Sequenz für B-16-Mod-384 offenbar ein Stop-Codon fehlt, das in den homologen Sequenzen an gleicher Stelle vorhanden ist. Das könnte in einer Sequenzveränderung in *Helianthus annuus* im Vergleich zu den homologen Sequenzen begründet sein. Dagegen spricht aber die ansonsten doch sehr hohe Homologie und auch, dass bis zum Beginn der Poly-A-Sequenz überhaupt kein Stop-Codon mehr in diesem *reading frame* enthalten ist. Diese Umstände lassen eine Sequenz-Änderung durch die angewandte RT-PCR-Strategie oder einen Lesefehler beim Sequenzieren als wahrscheinlichere Gründe für diese Sequenz-Abweichung erscheinen.

Im Verlauf der an diese Arbeit anschliessenden Promotions-Arbeiten von Bettina Kriegs stellte sich heraus, dass es sich tatsächlich um eine Sequenzänderung während der RT-PCR gehandelt hatte, bei der durch den Verlust eines Nukleotids ein Stop-Codon aus der ursprünglichen Sequenz entfernt wurde.

Dazu wurden von den in dieser Arbeit ermittelten Sequenzen spezifische Primer für die PCR-Amplifikation abgeleitet, die zusammen mit den M13-Sequenzen, die durch die modifizierten Ankerprimer (siehe Abschnitt 2.3.1., Abb. 3) in die cDNA eingebaut waren, eine fehlerfreie Amplifikation und Bestimmung der Sequenz ermöglichten. Mittlerweile ist die gesamte kodierende cDNA-Sequenz von *Helianthus annuus*-Ran gefunden und in der GenBank publiziert (Theisen,R., Kriegs,B. and Schnabl,H.: Gravitropically-Expressed Ran-Protein in *Helianthus annuus* (L.) Hypocotyls, GenBank Accession Number AF495716). Mittlerweile ist durch die in dieser Arbeit beschriebene Methode mit spezifischen Primern die Ran-Expression auch in sehr wenigen Zellen (<10)

differentiell nachweisbar (Arbeiten von Bettina Kriegs, noch nicht publiziert). Dabei hat das Kapillarelektrophorese-Verfahren gegenüber vergleichbar empfindlichen Methoden den Vorteil, dass die Identität der PCR-Produkte im selben Arbeitsschritt durch die basengenaue Grössenbestimmung überprüft wird. Bei Publikationen, die z.B. mit der Real-Time-PCR zu ihren Ergebnissen kommen, wird üblicherweise nicht mit den identischen Proben - prinzipbedingt zumindest nicht in der gleichen Analyse - kontrolliert, ob diese Real-Time-PCR-Produkte tatsächlich spezifisch sind.

Das 443 bp-Amplifikat von Primer B-18-Mod ist homolog zu einem Chloroplasten-kodierten Gen für die plastidäre ATPase-Untereinheit Epsilon. Die Homologie -Analyse (Abschnitt 6.1.4.) mit den gefundenen Genbank-Einträgen ähnlicher Sequenzen anderer Gattungen (Abschnitt 6.2.4.) zeigt das deutlich.

Dadurch scheint diese cDNA eher phototrop als gravitrop induziert, was aber den Befunden in dieser Arbeit (Abschnitt 3.1.2.) widerspricht. Wie bereits im Abschnitt 1.1.1. erwähnt, ist aber bekannt, dass die gravitropen Effekte durch andere Tropismen beeinflusst werden, weil sich die Signaltransduktionswege der verschiedenen Tropismen an vielen Stellen überschneiden. Demnach muss die Tatsache, dass B-18-Mod-443 im Plastiden-Genom kodiert ist, einer gravitropen Gen-Aktivierung nicht widersprechen. Es wäre nur ein weiteres Beispiel für den Einfluss des Phototropismus auf den Gravitropismus (vgl. Abschnitt 1.1.).

Für das 365 bp-Amplifikat von Primer B-12-Mod ergab die Homologie-Suche in der Genbank kein Gen mit bekannter Funktion, aber dennoch die Nukleotid-Sequenz zweier cDNA-Klone aus *Arabidopsis* mit unbekannter Funktion (Abschnitt 6.2.2.).

Im Alignment mit CLUSTALW (Abschnitt 6.1.2.) zeigt sich aber, dass die Homologie auf Nukleotid-Ebene derart unzusammenhängende Sequenzen betrifft und auf Aminosäure-Eben in keinem der drei möglichen Leseraster mehr vorhanden ist, dass wahrscheinlich doch kein Protein mit ähnlichen Funktionen durch die zunächst zum 365 bp-Amplifikat von Primer B-12-Mod homolog scheinenden Sequenzen kodiert wird (Abschnitt 6.1.2.). Da diese Sequenz aber bis auf diesen Homologie-Befund als gravitrop exprimiert gilt, muss man schliessen, dass es sich um die 3'-nicht-translatierte Sequenz eines gravitrop exprimierten Gens von *Helianthus annuus* handelt.

4.3. Zusammenhang der gravitropen Genexpression mit der Signal-Transduktion

Wie bereits in Abschnitt 1.1. erwähnt, sind die Signaltransduktions-Schritte verschiedener Tropismen weitgehend deckungsgleich. Aber kaum ein anderes Protein als das in dieser Arbeit als gravitrop exprimiert identifizierte Ran-Protein (Görlich et al., 1997; Merkle et al., 1994) von *Helianthus annuus* (siehe Abschnitt 4.1. und 4.2.2.) passt besser in dieses Bild von einer zentralen Schaltstelle für viele unterschiedliche Signaltransduktionswege und Tropismen.

In einem 2004 erschienenen Review (Merkle, 2004) beschreibt Merkle die Kontrolle des Exports von Proteinen und daran gebundenen Molekülen aus dem Kern und des Protein-Imports durch die Kernporen, die durch Ran-Protein geregelt werden, als den zentralen Punkt der Signaltransduktion in den Kern. Die Proteine, die alleine mit Hilfe des Ran durch die Kernporen gelangen können, sind zum grössten Teil Transportrezeptoren (z.B. Importin β -ähnliche Rezeptoren oder Exportin 1). Auf dem gleichen Weg (an Ran gekoppelt) gelangen auch Ran-regulierende Faktoren durch die Kernhülle. Ran reguliert dabei die Affinität der Transportrezeptoren für ihre jeweilige „Fracht“. Wenn z.B. nach einem Export-Vorgang das Ran-gebundene GTP hydrolysiert wird, verliert nicht nur Ran seine Affinität zu dem Transport-Rezeptor, sondern auch dieser Transportrezeptor seine Affinität für das exportierte Molekül (z.B. mRNA). Über die Steuerung des Im- und Exports von Transkriptionsfaktoren, die auch spezifisch (durch die Signaltransduktion spezifischer Tropismen) modifiziert werden, wird z.B. die Transkription und damit die Anpassung an Umweltsignale, Wachstum, Entwicklung und Differenzierung der Zellen reguliert. Ein Beispiel ist Phytochrom B, das im Verlauf der phototropen Reaktion und nach einer Licht-induzierten Modifikation mit Hilfe von Ran in den Kern transportiert wird, und dort zu spezifisch phototropen Effekten führt. Bemerkenswert ist aber, dass die Expression vom Ran trotz dieser Beteiligung am Phototropismus nicht durch Licht-Einwirkung gesteigert wird. Soweit bisher bekannt, wird die Ran-Expression nur durch einen Tropismus, nämlich den Gravitropismus verstärkt.

Wie die Änderung der Expressionsrate des Ran ausgelöst wird, ist noch nicht geklärt.

Der zeitliche Verlauf der Expressions-Steigerung von Ran nach gravitroper Stimulation schliesst aber die Induktion der Genexpression über Inositolphosphat aus. Frühere Arbeiten von Georg Müller (Müller und Schnabl, 2001) und eigene Arbeiten über die gravitrope Expression von Inositoltrisphosphat in gravitrop stimulierten Protoplasten der Sonnenblume zeigen einen langsameren Anstieg des Inositoltrisphosphats als die Expressions-Steigerung von Ran. Die Unabhängigkeit der Ran-Aktivierung von der Inositolphosphat-abhängigen Signaltransduktion zeigt sich auch darin, dass die Ran-Expression nicht durch Auxin induziert werden kann, sehr deutlich aber die Expression von Inositolphosphat (Theisen et al, 2002).

Ein möglicher Einwand gegen die gravitrope Expression von Ran-Protein könnte in der Vermutung begründet sein, dass eine derart wichtige Funktion präformiert vorliegen muss, um bei Bedarf sofort für ihre Aufgaben bereit zu sein. Abgesehen von dem Widerspruch zu den experimentellen Befunden, die in dieser Arbeit erläutert wurden, wäre es auch schwierig zu begründen, wieso sich dieser Grundbedarf nicht auch mit einer minimalen Expression der betreffenden Proteine decken liesse. Eine konstitutiv hohe Expression wäre physiologisch nicht nötig.

Genauso wenig physiologische Vorteile hätte eine schnellere gravitrope Reaktion: Es wäre ein wirklicher Nachteil für den zellulären Energie-Haushalt, wenn bei jedem Windstoss, der für die Pflanze natürlich eine Änderung des Gravitationsvektors bedeutet, eine gravitrope Krümmung eingeleitet würde. Denn diese zu schnelle gravitrope Anpassung würde sehr schnell und immer wieder in schneller Folge korrigiert werden müssen.

Eine differentielle Expression von Ran-Protein ist also auch deswegen naheliegend, um der Zelle eine angemessen schnelle Anpassung an einen erhöhten Regulierungsbedarf, der unter Stress oder unter einem Tropismus auftritt, zu ermöglichen.

Es ist bereits bei humanen Zellen belegt worden, dass auch präformierte Strukturen in der Signaltransduktion beim Gravitropismus eine Änderung in der Expressionsrate erfahren. Hammond (Hammond et al., 2000) konnte beispielsweise zeigen, dass humanes GTP-bindendes Protein (G-Protein) zu den Genen gehört, deren Expression sich unter veränderten Schwerkraft-Bedingungen am stärksten ändert. Dazu wird aber die G-Protein-Synthese nicht erst begonnen, sondern wesentlich verstärkt. Dieses Membran-assoziierte humane G-Protein steht im Zusammenhang mit diversen

Signaltransduktions-Mechanismen ständig bereit, um die Weiterleitung der extrazellulären Signale, die über Rezeptoren auf der Zellmembran aufgenommen werden, an das Zell-Innere zu ermöglichen.

Ran ist schliesslich auch ein G-Protein (Ma, 1994; Obrdlik et al., 2000;) und wie wir aus Experimenten mit Protoplasten der Sonnenblume auf dem schnelldrehenden Klinostaten (DLR, Microgravity User Support Center, Köln-Porz; bisher nicht-publizierte eigene Daten) und unserem TEXUS40-Raketen-Experiment (ESRANGE, Schweden, 2003) wissen, vervielfacht sich die Expressionsrate von Ran auch unter realer Schwerelosigkeit innerhalb von 6 Minuten (bisher nicht-publizierte Daten des TEXUS40-Fluges).

Das in dieser Arbeit gefundene Ran-Protein von *Helianthus annuus* scheint also - neben seinen schon an anderer Stelle (Merkle, 2004) dargelegten Funktionen im Zusammenhang mit Tropismen und Stress - eine zentrale Stellung in der gravitropen Signaltransduktion einzunehmen.

4.4. Zusammenfassung

Mit der vorliegenden Arbeit ist es gelungen, die gravitrope Expression von mehreren Genen in *Helianthus annuus* nachzuweisen. Die dazu entwickelte Methode ist im Gegensatz zu alternativen Verfahren (Real-Time-PCR, subtractive Hybridization, Northern Blot) geeignet, die differentielle Expression von vorher unbekanntem Genen hinreichend sensitiv und sicher nachzuweisen. Zumindest die Genauigkeit der Grössenbestimmung der untersuchten cDNA-Amplifikate und damit die Identifizierung der Sequenz im gleichen Arbeitsschritt wie die Mengenbestimmung kann von keiner der anderen Methoden geleistet werden. Der Ansatz, über eine limitierte Kapazität der mRNA-Präparation die Vergleichbarkeit der mRNA-Präparationen herzustellen, hat sich ebenfalls bewährt.

Insbesondere die Beteiligung des Ran-Proteins an der gravitropen Reaktion von *Helianthus annuus* konnte mit dieser Arbeit gezeigt werden.

5. Literaturverzeichnis

(1)

Akiyama H; Kanai S; Hirano M; Kumei Y; Shimokawa H; Katano H; Hara E; Song S; Mukai C; Nagaoka S (1996): " An improved quantitative RT-PCR flurescent method for analysis of gene transcripts in the STS-65 space shuttle experiment", Journal of Biotechnology, 47: 325-333

(2)

Alwine JC; Kemp DJ; Stark GR (1977): "Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diabenzyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes", Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 74 (12): 5350-5354

(3)

Ascenzi R; Gantt JS (1997): "A drought-stress-inducible histone gene in *Arabidopsis thaliana* is a member of a distinct class of plant linker histone variants", Plant Molecular Biology, 34: 629-641

(4)

Atanassov I; Masuta C; Tabaka H; Kataoka J; Kuwata S (1996): "Comparative study of screening with subtracted probe and differential screening on isolation of flower-specific cDNA clones from *Nicotiana sylvestris*", Plant Science, 118: 185-194

(5)

Audus LJ (1962): "The mechanism of the perception of gravity by plants", Symp. Soc. Exp. Biol., 16: 196–228

(6)

Bachem CWB; van der Hoeven RS; de Bruijn SM; Vreugdenhil D; Zabeau M; Visser RGF (1996): "Visualization of differential gene expression using a novel method of RNA fingerprinting based on AFLP: Analysis of gene expression during potato tuber development", The Plant Journal, 9 (5): 745-753

(7)

Bao Y ; Kost B ; Chua NH (2001): "Reduced expression of alpha-tubulin genes in *Arabidopsis thaliana* specifically affects root growth and morphology, root hair development and root gravitropism", Plant Journal, 28(2): 145-157

(8)

Barlow PW (1995): "Gravi perception in Plants: a multiplicity of systems derived by evolution?", Plant Cell Environment, 18: 951-962

(9)

Behringer FJ ; Lomax TL (1999): "Genetic analysis of the roles of phytochromes A and B1 in the reversed gravitropic response of the lz-2 tomato mutant", Plant, Cell & Environment, 22(5): 551-558

(10)

Berdy SE; Kudla J; Gruissem W; Gillaspay GE (2001): "Molecular Characterization of At5PTase1, an Inositol Phosphate Capable of Terminating Inositol Trisphosphate Signaling", *Plant Physiology*, 126: 801-810

(11)

Berg AR; Peacock K (1992): "Growth Patterns In Nutating And Nonnutating Sunflower (*Helianthus annuus*) Hypocotyls", *American Journal of Botany*, 79 (1): 77-85

(12)

Blancaflor EB (2002): "The Cytoskeleton and Gravitropism in Higher Plants", *Journal of Plant Growth Regulation*, 21 (2): 120-136

(13)

Braam J; Sistrunk ML; Polisensky DH; Xu W; Purugganan MM; Antosiewicz DM; Campbell P; Johnson KA (1996): "Life in a changing world: TCH gene regulation of expression and responses to environmental signals", *Physiologie Plantarum*, 98: 909-916

(14)

Braun M (1997): "Gravitropism in tip-growing cells", *Planta*, 203 (5, supplement): S11-S19

(15)

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 (1): 39-50

(16)

Braun M (2001): "Association of spectrin-like proteins with the actin-organized aggregate of endoplasmic reticulum in the Spitzenkorper of gravitropically tip-growing plant cells", *Plant Physiology*, 125(4): 1611-1619

(17)

Brosche M; Strid A (1999): "Cloning, Expression, and Molecular Characterization of a Small Pea Gene Family Regulated by Low Levels of Ultraviolet B Radiation and Other Stresses", *Plant Physiology*, 121: 479-487

(18)

Brown AH; Johnsson A; Chapman DK; Heathcote D (1996): "Gravitropic responses of the *Avena* coleoptile in space and on clinostats. IV. The clinostat as a substitute for space experiments" *Physiologia Plantarum*, 98: 210-214

(19)

Bullen BL ; Best TR ; Gregg MM ; Barsel S-E ; Poff KL (1990): "A direct screening procedure for gravitropism mutants in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh", Plant Physiology, 93: 525-31

(20)

Bush DS (1995): "Calcium regulation in plant cells and its role in signalling", Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 46: 95-122

(21)

Caderas; D; Muster M; Vogler H; Mandel T; Rose JKC; McQueen-Manson S; Kuhlmeier C (2000): "Limited Correlation between Expansion Gene Expression and Elongation Growth Rate", Plant Physiology, 123: 1399-1413

(23)

Carpin S; Crevecoeur M; Greppin H; Penel C (1999): "Molecular Cloning and Tissue-Specific Expression of an Anionic Peroxidase in Zucchini", Plant Physiology, 120: 799-810

(24)

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

(25)

Chang SC ; Cho MH ; Kang BG ; Kaufman PB (2001): "Changes in starch content in oat (*Avena sativa*) shoot pulvini during the gravitropic response", Journal of Experimental Botany, 52 (358): 1029-40

(26)

Chen R; Hilson P; Sedbrook J; Rosen E; Caspar T; Masson PH (1998): "The *Arabidopsis thaliana* AGRVITROPIC 1 gene encodes a component of the polar-auxin-transport efflux carrier", Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 95: 15112-15117

(27)

Chen R; Rosen E; Masson PH (1999): "Gravitropism in higher plants", Plant Physiology, 120: 343-50

(28)

Chen C; Chen Z (2000): "Isolation and characterization of two pathogen- and salicylic acid-induced genes encoding WRKY DNA-binding proteins from tobacco", Plant Molecular Biology, 42: 387-396

(29)

Chen R; Guan C; Boonsirichai K; Masson PH (2002): "Complex physiological and molecular processes underlying root gravitropism", Plant Molecular Biology, 49 (3/4): 305-317

(30)

Coenen C; Lomax TL (1998): "The Diageotropica Gene Differentially Affects Auxin and Cytokinin Responses throughout Development in Tomato", *Plant Physiology*, 117: 63-72

(31)

Correll MJ; Kiss JZ (2002): "Interactions Between Gravitropism and Phototropism in Plants", *Journal of Plant Growth Regulation*, 21 (2): 89-101

(32)

Cosgrove DJ (1993): "How Do Plant Cell Walls Extend?", *Plant Physiology*, 102: 1-6

(33)

Cosgrove DJ (1997): "Cellular mechanisms underlying growth asymmetry during stem gravitropism", *Planta*, 203 (5, supplement): S130-S135

(34)

Digby J; Firn RD (2002): "Light modulation of the gravitropic set-point angle (GSA)", *Journal of Experimental Botany*, 53 (367): 377-381

(35)

Evans ML (1991): "Gravitropism: Interaction of Sensitivity Modulation and Effector Redistribution", *Plant Physiology*, 95: 1-5

(36)

Evans ML; Ishikawa H (1997): "Cellular specificity of the gravitropic motor response in roots", *Planta*, 203 (5, supplement): S115-S122

(37)

Fasano JM; Swanson SJ; Blancaflor EB; Dowd PE; Kao T; Gilroy S (2001): "Changes in Root Cap pH Are Required for the Gravity Response of the *Arabidopsis* Root", *The Plant Cell*, 13: 907-921

(38)

Firn RD; Digby J (1980): "The Establishment Of Tropic Curvatures In Plants", *Annual Review of Plant Physiology*, 31: 131-148

(39)

Firn RD; Digby J (1997): "Solving the puzzle of gravitropism - has a lost piece been found?", *Planta*, 203 (5, supplement): S159-S163

(40)

Firn RD ; Wagstaff C ; Digby J (2000): "The use of mutants to probe models of gravitropism", *Journal of Experimental Botany*, 51(349): 1323-40

(41)

Fisher JB; Tomlinson PB (2002): "Tension wood fibers are related to gravitropic movement of red mangrove (*Rhizophora mangle*) seedlings", *Journal of Plant Research*, 115 (1117): 39-46

(42)

Fitzelle KJ ; Kiss JZ (2001): "Restoration of gravitropic sensitivity in starch-deficient mutants of *Arabidopsis* by hypergravity", *Journal of Experimental Botany*, 52(355): 265-275

(43)

Friedman H; Meir S; Rosenberger I; Halevy AH; Kaufman PB; Philosoph-Hadas S (1998): "Inhibition of the gravitropic response of snapdragon spikes by the calcium-channel blocker lanthanum chloride", *Plant Physiology*, 118(2): 483-492

(44)

Fuglsang AT; Vsiconti S; Drumm K; Jahn T; Stensballe A; Mattei B; Jensen ON; Aducci P; Palmgren MG (1999): "Binding of 14-3-3 Protein to the Plasma Membrane H⁺-ATPase AHA2 Involves the Three C-terminal Residues Tyr946-Thr-Val and Requires Phosphorylation of Thr947", *The Journal of Biological Chemistry*, 274 (51): 36774-36780

(45)

Fuji N; Kamada M; Yamasaki S; Takahashi H (2000): "Differential accumulation of Aux/IAA mRNA during seedling development and gravity response in cucumber (*Cucumis sativus* L.)", *Plant Molecular Biology*, 42: 731-740

(46)

Fukaki H; Fujisawa H; Tasaka M (1996a): "Gravitropic response of inflorescence stems in *Arabidopsis thaliana*", *Plant Physiology*, 110 (3): 933-943

(47)

Fukaki H; Fujisawa H; Tasaka M (1996b): "SGR1, SGR2, SGR3: novel genetic loci involved in shoot gravitropism in *Arabidopsis thaliana*", *Plant Physiology*, 110 (3): 945-955

(48)

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 Journal*, 14 (4): 425-430

(49)

Gaiser JC ; Lomax TL (1993): "The altered gravitropic response of the lazy-2 mutant of tomato is phytochrome regulated", *Plant Physiology*, 102 (2): 339-344

(50)

Galland P; Wallacher Y; Finger H; Hannappel M; Troster S; Bold E; Grolig F (2002): "Tropisms in *Phycomyces*: sine law for gravitropism, exponential law for photogravitropic equilibrium", *Planta*, 214 (6): 931-938

(51)

Ge Z; Rubio G; Lynch JP (2000): "The importance of root gravitropism for inter-root competition and phosphorus acquisition efficiency: results from a geometric simulation model", *Plant and Soil*, 218 (1/2): 159-171

(52)

Gendreau E; Traas J; Desnos T; Grandjean O; Caboche M; Höfte H (1997): "Cellular Basis of Hypocotyl Growth in *Arabidopsis thaliana*", *Plant Physiology*, 114: 295-305

(53)

Görlich D; Dabrowski M; Bischoff FR; Kutay U; Bork P; Hartmann E; Prehn S; Izaurrealde E (1997): "A Novel Class of RanGTP Binding Proteins", *The Journal of Cell Biology*, 138 (1): 65-80

(54)

Golan A ; Tepper M ; Soudry E ; Horwitz BA ; Gepstein S (1996): "Cytokinin, acting through ethylene, restores gravitropism to *Arabidopsis* seedlings grown under red light", *Plant Physiology*, 112(3): 901-904

(55)

Gordon DC; MacDonald IR; Hart JW; Berg A (1984): "Image Analysis of Geo-Induced Inhibition, Compression, and Promotion of Growth in an Inverted *Helianthus annuus* L. Seedling", *Plant Physiology*, 76: 589-594

(56)

Guilfoyle T; Hagen G; Ulmasov T; Murfett J (1998): "How Does Auxin Turn On Genes?", *Plant Physiology*, 118: 341-347

(57)

Haberlandt G (1900): "Über die Perzeption des geotropischen Reizes", *Ber. Dtsch. Bot. Ge.*, 18: 261-272

(58)

Hammond TG; Benes E; O'Reilly KC; Wolf DA; Linnehan RM; Taher A; Kaysen JH; Allen PL; Goodwin TJ (2000): "Mechanical culture conditions effect gene expression: gravity-induced changes on the space shuttle", *Physiological Genomics*, 3: 163-173

(59)

Hejnowicz Z; Sievers A (1996): "Tissue stresses in organs of herbaceous plants III. Elastic properties of the tissues of sunflower hypocotyl and origin of tissue stresses", *Journal of Experimental Botany*, 47 (297): 519-528

(60)

Hemmersbach R; Häder D-P (1999): "Graviresponses of certain ciliates and flagellates", The FASEB Journal, 13 (supplement): S69-S75

(61)

Hensel W (1990): "Gravitropismus der Pflanzen", Naturwissenschaftliche Rundschau, 4: 135-140

(62)

Himmelspach R; Wymer CL; Lloyd CW; Nick P (1999): "Gravity-induced reorientation of cortical microtubules observed in vivo", The Plant Journal, 18 (4): 449-453

(63)

Himmelspach R; Nick P (2001): "Gravitropic microtubule reorientation can be uncoupled from growth", Planta, 212 (2): 184-189

(64)

Hong Y-K; Sohn CH; Polne-Fuller M; Gibor A (1995): "Differential Display Of Tissue-Specific RNAs In Porphyra Perforata (Rhodophyta) Thallus", Journal of Phycology, 31: 640-643

(65)

Hunte C; Schulz M; Schnabl H (1993): "Influence of Clinostat Rotation on Plant Proteins: 2. Effects on Membrane Bound Enzyme Activities and Ubiquitin-Protein-Conjugates in Leaves of Vicia faba L.", Journal of Plant Physiology, 142: 31-36

(66)

Iino M ; Tarui Y ; Uematsu C (1996): "Gravitropism of maize and rice coleoptiles: dependence on the stimulation angle", Plant, Cell & Environment, 19(10):1160-1168

(67)

Ingber D (1999): "How cells (might) sense microgravity", The FASEB Journal, 13 (Supplement): S3-S15

(68)

Ishikawa H; Evans ML (1997): "Novel software for analysis of root gravitropism: comparative response patterns of *Arabidopsis* wild-type and *axr1* seedlings", Plant, Cell & Environment, 20 (7): 919-928

(69)

Ito T; Sakaki Y (1997): "Fluorescent Differential Display", Methods in Molecular Biology, 85: 37-44

(70)

Johnsson A; Karlsson C; Iversen T-H; Chapman DK (1996): "Random root movements in weightlessness", Physiologia Plantarum, 96: 169-178

(71)

Jones DR; Sanjuan A; Merida I (2000): "Type I alpha phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase is a putative target for increased intracellular phosphatidic acid", *FEBS Letters*, 476: 160-165

(72)

Jourdan C; Michaux-Ferriere N; Perbal G (2000): "Root system architecture and gravitropism in the oil palm", *Annals of Botany*, 85 (6): 861-8

(73)

Kato T ; Morita MT ; Fukaki H ; Yamauchi Y ; Uehara M ; Niihama M ; Tasaka M (2002a): "SGR2, a phospholipase-like protein, and ZIG/SGR4, a SNARE, are involved in the shoot gravitropism of *Arabidopsis*", *Plant Cell*, 14 (1): 33-46

(74)

Kato T; Morita MT; Tasaka M (2002b): "Role of Endodermal Cell Vacuoles in Shoot Gravitropism", *Journal of Plant Growth Regulation*, 21 (2): 113-119

(75)

Kern VD; Sack FD (1999): "Irradiance-dependent regulation of gravitropism by red light in protonemata of the moss *Ceratodon purpureus*", *Planta*, 209 (3): 299-307

(76)

Kim SK; Chang SC; Lee EJ; Chung WS; Kim YS; Hwang S; Lee JS (2000): "Involvement of brassinosteroids in the gravitropic response of primary root of maize", *Plant Physiology*, 123(3): 997-1004

(77)

Kiss JZ; Hertel R; Sack FD (1989): "Amyloplasts are necessary for full gravitropic sensitivity in roots of *Arabidopsis thaliana*", *Planta*, 117: 198-206

(78)

Kiss JZ; Wright JB; Caspar T (1996): "Gravitropism in roots of intermediate-starch mutants of *Arabidopsis*", *Physiologia Plantarum*, 97(2): 237-244

(79)

Kiss JZ (1997): "Gravitropism in the rhizoids of the alga *Chara*: a model system for microgravity research", *Biological Bulletin*, 192(1): 134-136

(80)

Kiss JZ; Katembe WJ; Edelmann RE (1998): "Gravitropism and development of wild-type and starch-deficient mutants of *Arabidopsis* during spaceflight", *Physiologia Plantarum*, 102 (4): 493-502

(81)

Kiss JZ; Edelmann RE; Wood PC (1999): "Gravitropism of hypocotyls of wild-type and starch-deficient *Arabidopsis* seedlings in spaceflight studies", *Planta*, 209 (1): 96-103

(82)

Kozian DH; Kirschbaum BJ (1999): "Comparative gene-expression analysis", Trends in Biotechnology, 17 (2): 73-78

(83)

Kuno N; Muramatsu T; Hamazato F; Furuya M (2000): "Identification by Large-Scale Screening of Phytochrome-Regulated Genes in Etiolated Seedlings of *Arabidopsis* Using a Fluorescent Differential Display Technique", Plant Physiology, 122: 15-24

(84)

Kutschera U (1990): "Cell-wall synthesis and elongation growth in hypocotyls of *Helianthus annuus* L.", Planta, 181: 316-323

(85)

Lamparter T; Hughes J; Hartmann E (1998): "Blue light- and genetically-reversed gravitropic response in protonemata of the moss *Ceratodon purpureus*", Planta, 206 (1): 95-102

(86)

Liang P; Pardee AB (1992): "Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction" Science, 257: 967-971

(87)

Lu YT; Hidaka H; Feldman LJ (1996): "Characterization of a calcium/calmodulin-dependent protein kinase homolog from maize roots showing light-regulated gravitropism", Planta, 199 (1): 18-24

(88)

Lu YT; Feldman LJ (1997): "Light-regulated root gravitropism: a role for, and characterization of, a calcium/calmodulin-dependent protein kinase homolog", Planta, 203 (5, supplement): S91-S97

(89)

Lund ST; Smith AG; Hackett WP (1997): "Differential Gene Expression in response to Auxin Treatment in the Wild Type and *rac*, an Adventitious Rooting-Incompetent Mutant of Tobacco", Plant Physiology, 114: 1197-1206

(90)

Ma H (1994): "GTP-binding proteins in plants: new members of an old family", Plant Molecular Biology, 26: 1611-1636

(91)

MacCleery SA; Kiss JZ (1999): "Plastid Sedimentation Kinetics in Roots of Wild-Type and Starch-Deficient Mutants of *Arabidopsis*", Plant Physiology, 120: 183-192

(92)

Maksimov G; Darginavicienė Y; Jurkoniene S; Merkys A (2001): "Role of the Plasmalemma in Controlling the Gravitropic Response of Wheat Coleoptiles", Russian Journal of Plant Physiology, 48(4): 426-430

(93)

Mazeyrat F; Mouzeyar S; Nicolas P; Tourvieille de Labrouhe D; Ledoigt G (1998): "Cloning, sequence and characterization of a sunflower (*Helianthus annuus* L.) pathogen-induced gene showing sequence homology with auxin-induced genes from plants", Plant Molecular Biology, 38: 899-903

(94)

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", The Plant Journal, 6 (4): 555-565

(95)

Merkle T (2004): "Nucleo-cytoplasmic partitioning of proteins in plants: implications for the regulation of environmental and developmental signalling", Current Genetics, 44: 231-260

(96)

Meskauskas A; Maksimov G (2001): "Role of Calcium Channels in Phytochrome-Mediated Regulation of Gravitropic Response", Russian Journal of Plant Physiology, 48 (2): 231-237

(97)

Montague MJ (1995): "Hormonal and gravitropic specificity in the regulation of growth and cell wall synthesis in pulvini and internodes from shoots of *Avena sativa* L. (oat)", Plant Physiology, 107 (2): 553-564

(98)

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 (1): 47-56

(99)

Müller G, Schnabl H (2001): Signaltransduction during Gravitropism in sunflower hypocotyls, 2nd Pan Pacific Basin Workshop on Microgravity Sciences, Paper BT-10-23, 1-11

(100)

Mueller WJ; Salisbury FB; Blotter PT (1984): "Gravitropism in Higher Plant Shoots", Plant Physiology, 76: 993-999

(101)

Mullen JL ; Turk E ; Johnson K ; Wolverton C ; Ishikawa H ; Simmons C ; Soll D ; Evans ML (1998): "Root-growth behavior of the *Arabidopsis* mutant rgr1. Roles of gravitropism and circumnutation in the waving/coiling phenomenon", *Plant Physiology*, 118 (4): 1139-1145

(102)

Mullen JL ; Wolverton C ; Ishikawa H ; Evans ML (2000): "Kinetics of constant gravitropic stimulus responses in *Arabidopsis* roots using a feedback system", *Plant Physiology*, 123 (2): 665-670

(103)

Mullis KB; Faloona FA (1987): "Specific Synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction", *Methods in Enzymology*, 155: 335-350

(104)

Nemec B (1900): "Über die Art der Wahrnehmung des Schwerkraftreizes bei den Pflanzen", *Ber. Btsch. Ges.*, 18: 241-245

(105)

Newman T; deBruijin FJ; Green ,P; Keegstra K; Kende H; McIntosh L; Ohlrogge J; Raikhel N; Sommerville S; Thomashow M; Retzel E; Sommerville C (1994): "Genes galore: a summary of methods for accessing results from large-scale partial sequencing of anonymous *Arabidopsis* cDNA clones", *Plant Physiology*, 106 (4): 1241-1255

(106)

Newton CR (1997): "PCR, Second Edition", BIOS Scientific Publishers Limited, Oxford

(107)

Nick P ; Godbole R ; Wang QY (1997): "Probing rice gravitropism with cytoskeletal drugs and cytoskeletal mutants", *Biological Bulletin*, 192 (1): 141-143

(108)

Obrdlik P; Neuhaus G; Merkle T (2000): "Plant heterotrimeric G protein beta subunit is associated with membranes via protein interactions involving coiled-coil formation", *FEBS Letters*, 476: 208-212

(109)

Ogawa M; Kusano T; Koizumi N; Katsumi M; Sano H (1999): "Gibberellin-responsive genes: high level of transcript accumulation in leaf sheath meristematic tissue from *Zea mays* L.", *Plant Molecular Biology*, 40: 645-657

(110)

Orbovic V; Poff KL (1997): "Interaction of light and gravitropism with nutation of hypocotyls of *Arabidopsis thaliana* seedlings", *Plant Growth Regulation*, 23 (3): 141-146

(111)

Paul A-L; Daugherty CJ; Bihn EA; Chapman DK; Norwood KLL; Ferl RJ (2001): "Transgene Expression Patterns Indicate That Spaceflight Affects Stress Signal Perception and Transduction in *Arabidopsis*", *Plant Physiology*, 126: 613-621

(112)

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 Physiology*, 125 (3): 1499-1507

(113)

Peters WS; Tomos AD (1996): "The History of Tissue Tension", *Annals of Botany*, 77: 657-665

(114)

Pickard BG (1985): "Early Events In Geotropism Of Seedling Shoots", *Annual Review of Plant Physiology*, 36: 55-75

(115)

Poff KL; Janoudi AK; Rose ES; Orbovic V; Konjevic R; Fortin MC; Scott TK (1994): "The physiology of tropisms" In: Meyerowitz EM and Sommerville CR (eds.): *Arabidopsis*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, NY, 639-664

(116)

Rahman A; Ahamed A; Amakawa T; Goto N; Tsurumi S (2001): "Chromosaponin I Specifically Interacts with AUX1 Protein in Regulating the Gravitropic Response of *Arabidopsis* Roots", *Plant Physiology*, 125 (2): 990-1000

(117)

Ramahaleo T; Alexandre J; Lassalles J-P (1996): "Stretch activated channels in plant cells. A new model for osmoelastic coupling", *Plant Physiology Biochem.*, 34 (3): 327-334

(118)

Ranjeva R ; Graziana A ; Mazars C (1999): "Plant graviperception and gravitropism: a newcomer's view", *FASEB Journal*, 13 (supplement): S135-S141

(119)

Redhead CR; Palme K (1996): "The Genes of Plant Signal Transduction", *Critical Reviews in Plant Sciences*, 15 (5&6): 425-454

(120)

Reid JB; Howell SH (1995): "G. The Functioning Of Hormones In Plant Growth And Development" in: Davies PJ (ed.), *Plant Hormones*, 448-485, Kluwer Academic Publishers

(121)

Richert J; Kranz E; Lörz H; Dresselhaus T (1996): "A reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay for gene expression studies at the single cell level", *Plant Science*, 114: 93-99

(122)

Robson PR ; Smith H (1996): "Genetic and transgenic evidence that phytochromes A and B act to modulate the gravitropic orientation of *Arabidopsis thaliana* hypocotyls", *Plant Physiology*, 110 (1): 211-216

(123)

Rorat T; Sadowski J; Irzykowski W; Ziegler P; Daussant J (1995): "Differential expression of two β -amylase genes of rye during seed development", *Physiologia Plantarum*, 94: 19-24

(124)

Roux C; Perrot-Rechenmann C (1997): "Isolation by differential display and characterization of a tobacco auxin-responsive cDNA Nt-gh3, related to GH3", *FEBS Letters*, 419: 131-136

(125)

Roux C; Bilang J; Theunissen BH; Perrot-Rechenmann C (1998): "Identification of new early auxin markers in tobacco by mRNA differential display", *Plant Molecular Biology*, 37: 385-389

(126)

Rubio G; Walk T; Ge Z; Yan X; Liao H; Lynch JP (2001): "Root Gravitropism and Below-ground Competition among Neighbouring Plants: A Modelling Approach", *Annals of Botany*, 88 (5): 929-940

(127)

Sack FD (1991): "Plant Gravity Sensing", *International Review of Cytology*, 127: 193-252

(128)

Sack FD; Kim D; Stein B (1994): "Organelle sedimentation in gravitropic roots of *Limnium* is restricted to the elongation zone", *Annals of Botany*, 74: 35-41

(129)

Sack FD (1997): "Plastids and gravitropic sensing", *Planta*, 203 (5): S63-S68

(130)

Saether N; Iversen T-H (1991): "Gravitropism and starch statoliths in an *Arabidopsis* mutant", *Planta*, 184: 491-497

(131)

Sakai T; Takahashi Y; Nagata T (1996): "Analysis of the Promoter of the Auxin-Inducible Gene, parC, of Tobacco", *Plant Cell Physiology*, 37 (7): 906-913

(132)

Sakamoto K; Shiraishi H; Okada K; Shimura Y (1993): "Proteins Induced by Physical Stimuli in Root Tips of *Arabidopsis thaliana* Seedlings", *Plant Cell Physiology*, 34 (2): 297-304

(133)

Sambrook J; Russell DW (2001): "Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Thrid Edition", Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York

(134)

Schimek C; Eibel P; Grolig F; Horie T; Ootaki T; Galland P (1999): "Gravitropism in *Phycomyces*: a role for sedimenting protein crystals and floating lipid globules", *Planta*, 210 (1): 132-142

(135)

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

(136)

Schnabl H; Hunte C; Schulz M; Wolf D; Ghiena-Rahlenbeck C; Bramer M; Graab M; Janßen M; Kalweit H (1996): "Effects of fast clinostat treatment and microgravity on *Vicia faba*, L. mesophyll cell protoplasts ubiquitin pools and actin isoforms" *Microgravity Science and Technology*, IX/4: 275-280

(137)

Schramm G; Bruchhaus I; Roeder T (2000): "A simple and reliable 5'-RACE approach", *Nucleic Acids Research*, 28 (22): e96

(138)

Schumacher K; Vafeados D; McCarthy M; Sze H; Wilkins T; Chory J (1999): "The *Arabidopsis* det3 mutant reveals a central role for the vacuolar H⁺-ATPase in plant growth and development", *Genes & Development*, 13: 3259-3270

(139)

Schwuchow JM; Kern VD; White NJ; Sack FD (2002): "Conservation of the Plastid Sedimentation Zone in All Moss Genera with Known Gravitropic Protonemata", *Journal of Plant Growth Regulation*, 21 (2): 146-155

(140)

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 Physiology*, 121: 1291-1298

(141)

Sedbrook JC; Chen R; Masson PH (1999): "ARG1 (Altered Response to Gravity) encodes a DnaJ-like protein that potentially interacts with the cytoskeleton", *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 96: 1140-1145

(142)

Sheen J (1991): "Molecular Mechanisms Underlying the Differential Expression of Maize Pyruvate, Orthophosphate Dikinase Genes", *The Plant Cell*, 3: 225-245

(143)

Shinozaki K; Yamaguchi-Shinozaki K (1997): "Gene Expression and Signal Transduction in Water-Stress Response", *Plant Physiology*, 115: 327-334

(144)

Sievers A; Kruse S; Kuo-Huang L-L; Wendt M (1989): "Statoliths and microfilaments in plant cells", *Planta*, 179: 275-278

(145)

Sievers A; Buchen B; Volkmann D; Hejnowicz Z (1991): "Role of cytoskeleton in gravity perception" in: Lloyd CW (ed): "The cytoskeletal basis of plant growth and form", Academic Press, London Toronto, 169-182

(146)

Sievers A; Buchen B; Hodick D (1996): "Gravity sensing in tip-growing cells", *Trends in Plant Sciences*, 1 (8): 273-279

(147)

Sinclair W; Trewavas AJ (1997): "Calcium in gravitropism. A re-examination", *Planta*, 203 (5, supplement): S85-S90

(148)

Sitbon F; Perrot-Rechenmann C (1997): "Expression of auxin-regulated genes", *Physiologia Plantarum*, 100: 443-455

(149)

Sliwinski JE; Salisbury FB (1984): "Gravitropism in Higher Plant Shoots", *Plant Physiology*, 76: 1000-1008

(150)

Sokol DL; Zhang X; Lu P; Gewirtz AM (1998): "Real time detection of DNA-RNA hybridization in living cells", *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 95: 11538-11543

(151)

Stankovic B; Volkmann D; Sack FD (1998a): "Autonomic Straightening after Gravitropic Curvature of Cress Roots", *Plant Physiology*, 117: 893-900

(152)

Stankovic B; Volkmann D; Sack FD (1998b): "Autotropism, automorphogenesis, and gravity", *Physiologia Plantarum*, 102: 328-335

(153)

Strudwick NJ ; Phillips TJ ; Scott IM (1997): "Expression of the abnormal gravitropism phenotypes creep and ageotropum during development in pea", *Journal of Plant Physiology*, 150 (5): 588-91

(154)

Sukharev S (1999): "Mechanosensitive channels in bacteria as membrane tension reporters", *The FASEB Journal*, 13 (supplement): S55-S61

(155)

Suty L; Petitot A-S; Lecourieux D; Blein J-P; Pugin A (1996): "Isolation of partial length cDNAs corresponding to early differentially expressed genes during elicitation of tobacco cells by cryptogein: Use of differential mRNA display", *Plant Physiology Biochem.*, 34 (3): 443-451

(156)

Talbott LD ; Pickard BG (1994): "Differential changes in size distribution of xyloglucan in the cell walls of gravitropically responding *Pisum sativum* epicotyls", *Plant Physiology*, 106 (2): 755-61

(157)

Theisen R; Kriegs B; Müller G; Schnabl H (2002): "Signal transduction and gene expression during graviresponse in sunflower hypocotyls (*Helianthus annuus* L.)", *Proceedings of "Life in Space for Life on Earth", 8th European Symposium on Life Sciences Research in Space, 23rd Annual International Gravitational Physiology Meeting, Karolinska Institute, Stockholm, Sweden, 2-7 June 2002 (ESA SP-501, September 2002): 299-300*

(158)

Theologis A (1986): "Rapid Gene Regulation By Auxin", *Ann. Rev. Plant Physiology*, 37: 407-438

(159)

Timpte C; Lincoln C; Pickett FB; Turner J; Estelle M (1995): "The AXR1 and AUX1 genes of *Arabidopsis* function in separate auxin-responsive pathways", *The Plant Journal*, 8 (4): 561-569

(160)

Trewavas AJ; Malho R (1997): "Signal Perception and Transduction: The Origin of the Phenotype", *The Plant Cell*, 9: 1181-1195

(161)

Vitha S ; Zhao L ; Sack FD (2000): "Interaction of root gravitropism and phototropism in *Arabidopsis* wild-type and starchless mutants", *Plant Physiology*, 122 (2): 453-62

(162)

Wagner TA; Cove DJ; Sack FD (1997): "A positively gravitropic mutant mirrors the wild-type protonemal response in the moss *Ceratodon purpureu*", *Planta*, 202 (2): 149-154

(163)

Wagner TA; Sack FD (1998): "Gravitropism and gravimorphism during regeneration from protoplasts of the moss *Ceratodon purpureus* (Hedw.) Brid.", *Planta*, 205 (3): 352-358

(164)

Wolverton, C. Ishikawa, H. Evans, M. L. (2002a): "The Kinetics of Root Gravitropism: Dual Motors and Sensors", *Journal of Plant Growth Regulation*, 21 (2): 102-112

(165)

Wolverton C; Mullen JL; Ishikawa H; Evans ML (2002b): "Original Article: Root gravitropism in response to a signal originating outside of the cap", *Planta*, 215: 153-157

(166)

Wu L; Ueda T; Messing J (1995): "The formation of mRNA 3'-ends in plants", *The Plant Journal*, 8 (3): 323-329

(167)

Yamamoto K; Kiss JZ (2002): "Disruption of the Actin Cytoskeleton Results in the Promotion of Gravitropism in Inflorescence Stems and Hypocotyls of *Arabidopsis*", *Plant Physiology*, 128 (2): 669-681

6. Anhang

6.1. Anhang, Teil 1: Alignment mit homologen GenBank-Einträgen

6.1.1. Alignment von B-10-Mod-666 mit homologen GenBank-Einträgen

a) Alignment der Nukleotid-Sequenzen

```

Lotus      -----
Vicia      ---CAAATTCGAAAACCCCTTGTGAAATATAAAACCCCTCGCTCTCTCTTTTTTCTTTCTCTCC
Cicer      -----
Nicotiana  AGAGCTTGAACCTAAAGCTTTTTCTTGAACAGCAGACCATATGTCTGAATCGGAGCTCTCA
Arabidopsis -----
B10-666   -----
Consensus  -----
    
```

```

Lotus      -----
Vicia      TCAACCCCTCTGAAACCAACGACTGCATTTTCATGGCGTTGCCGAATCAGCAAACCGTTGAT
Cicer      -----TACTCTCTTCCATGGCGTTGCCAATCAGCAAACCTGTTGAT
Nicotiana  AAACCCCTCGCAGCATTCTCCTCAAAACAACATGGCTCTTCCAGGTCAGCAAGCCGTGGAT
Arabidopsis -----AACATGGCTCTACCTAACCCAGCAAACCGTAGAT
B10-666   -----
Consensus  -----
    
```

```

Lotus      ----CTAATTTCAAGCTCGTCATCGTCGGTGATGGTGGCACAGGAAAGACAACCTTCGTG
Vicia      TACCCTAGCTTCAAGCTTGTATCGTCGGGAGACGGTGGCACAGGAAAGACGACGTTTGTG
Cicer      TACCCTAGTTTTCAAGCTTGTATCGTCGGTGACGGTGGCACAGGAAAGACTACATTCGTG
Nicotiana  TATCCCAGTTTTAAACTTGTATTGTTGGCGATGGTGGAACTGGAAAAACTACATTTGTG
Arabidopsis TATCCCAGCTTCAAGCTTGTCAATTGTTGGTGATGGAGGCACAGGGAAGACTACTTTTTGTT
B10-666   -----
Consensus  -----
    
```

```

Lotus      AAGAGGCATCTCACCGGTGAATTCGAGAAGAAAATATGAACCTACCATTGGTGTGGAGGTC
Vicia      AAGAGGCATCTTACTGGAGAATTTGAGAAGAAAATATGAACCAACTATTGGTGTGGAAGTG
Cicer      AAGAGGCATCTTACTGGTGAATTTGAGAAGAAAATATGAACCAACTATTGGGGTGGAGGTT
Nicotiana  AAGAGGCATCTTACTGGTGAATTTGAAAAGAAAATATGAACCCACCATTGGAGTGGAGGTT
Arabidopsis AAGAGACATCTTACTGGGGAGTTTGAAGAAGATATGAACCTACTATTGGTGTGGAGGTT
B10-666   -----
Consensus  -----
    
```

```

Lotus      CATCCTTTGGATTTCTTCACAAACTGTGGCAAGATCCGATTCTACTGCTGGGATACTGCT
Vicia      CATCCATTGGATTTCTTCACAAACTGTGGAAAGATCCGTTTCTACTGCTGGGATACTGCT
Cicer      CATCCATTGGATTTCTTCACAAACTGTGGAAAGATTCGTTTCTACTGTTGGGACACTGCT
Nicotiana  CATCCATTGGATTTCTTCACAAACTGTGGAAAGATTAGGTTTTACTGCTGGGATACAGCT
Arabidopsis CATCCATTAGATTTCTTCACAAACTGTGGCAAGATCCGTTTTTACTGCTGGGACACTGCT
B10-666   -----
Consensus  -----
    
```

```

Lotus      GGACAAGAGAAGTTTGGGGTCTCAGAGATGGTTACTATATCCATGGGCAATGCGCCATT
Vicia      GGTCAAGAGAAGTTTGGTGGTCTTAGAGATGGATACTATATCCATGGGCAGTGTGCAATT
Cicer      GGACAAGAGAAGTTTCGGCGGACTCAGAGACGGATATTATATCCATGGGCAGTGTGCTATT
Nicotiana  GGTCAAGAGAAGTTTGGTGGCCTTAGGGATGGATACTATATTCATGGTCAATGTGCTATC
Arabidopsis GGACAAGAGAAGTTTGGTGGCCTTAGGGATGGATACTACATCCATGGTCAATGTGCTATA
B10-666   -----
Consensus  -----
    
```

Lotus	ATAATGTTTGTATGTTACTGCCCGACTGACATACAAGAATGTCCCTACCTGGCACCCTGAT
Vicia	ATAATGTTTGTATGTTACTGCCCGACTGACATACAAAAATGTTCCCTACCTGGCATCGAGAT
Cicer	ATAATGTTTGTATGTTACTGCCCGACTAACTTACAAGAATGTACCTACCTGGCACCCTGAT
Nicotiana	ATCATGTTTGTATGTGACAGCCCGATTGACATACAAGAATGTCCCCACATGGCATAGGGAT
Arabidopsis	ATAATGTTTGTACGTACAGCACCGCTCACATACAAGAATGTTCCGACATGGCACCCTGAT
B10-666	--CATGTTTGTATGTAACCGCAAGATTGACTTACAAGAATGTTCCACATGGCATCGTGAT
Consensus	***** ** ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
Lotus	CTTTGCCGGGTCTGCGAGAACATCCCCATTGTTCTT-TGTGGCAACAAGGTTGATGTGAA
Vicia	CTTTGTGCGGGTTTGTGAAAAACATCCCAATTGTTCTT-TGTGGAAACAAGGTTGATGTGAA
Cicer	CTTTGCCGGGTGTGAAAAACATCCCGATTGTTCTT-TGCGGTAACAAGGTTGATGTGAA
Nicotiana	CTTTGCCGTGTCTGTGAAAAATATTTCCATTGTTCTT-TGCGGAAACAAGGTTGATGTGAA
Arabidopsis	CTCTGCAGGGTGTGTGAAAAACATCCCGATTGTTCTG-TGTGGGAACAAAGTTGATGTGAA
B10-666	CTTTGCCGTGTGTGTGAAAAACATCCCAATCGTGCTTGTGCGGTAACAAGGTTGATGTAAA
Consensus	** ** * ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
Lotus	GAACAGACAGGTGAAGGCCAAGCAGGTTACTTTCCACAGGAAGAAGAATCTGCAGTACTA
Vicia	GAACAGGCAAGTGAAGGCCAAGCAGGTTACTTTCCACAGGAAGAAGAATTTGCAGTACTA
Cicer	GAACAGACAAGTGAAGGCCAAGCAGGTTACATTTCCATAGAAAGAAGAATTTGCAGTACTA
Nicotiana	GAACCGTCAAGTGAAGGCTAAGCAGGTTACTTTCCACCGGAAGAAGAATTTGCAATACTA
Arabidopsis	GAACAGGCAAGTGAAGGCCAAGCAGGTTACATTTCCACAGGAAGAAGAATCTGCAGTACTA
B10-666	GAACCGTCAAGTGAAGGCCAAAACAGGTTACTTTCCATAGAAAGAAGAACCCTGCAGTATTA
Consensus	**** * ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
Lotus	TGAGATCTCAGCCAAGAGTAACATAACTTTGAGAAGCCTTTCCTTTATCTTGCCAGGAA
Vicia	TGAGATTTTACGCTAAGAGCAATTACAACCTTTGAGAAGCCTTTCCTGTATCTTGCCAGGAA
Cicer	TGAAATTTTACGCCAAGAGCAACTATAACTTTGAGAAGCCTTTCCTGTATCTTGCCCGGAA
Nicotiana	TGAGATATCAGCAAAGAGTAACATAACTTTGAGAAGCCTTTCCTTTACCTTGCCAGGAA
Arabidopsis	TGAGATATCAGCAAAGAGCAACTACAACCTTTGAGAAGCCTTTCCTGTACCTTGCTAGAAA
B10-666	TGAGATCTCAGCCAAGAGCAATTACAACCTTTGAGAAGCCTTTCCTTTATCTCGCCCGGAA
Consensus	*** ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
Lotus	ACTTGCAAGTGATCCTAACTTGCACCTTTGTTGAATCTCCTGCATTGGCTCCACCTGAAGT
Vicia	ACTTGCAAGTGATGCTAATTTGCACCTTTGTCGAATCTCCTGCCTGGCTCCACCAGAAGT
Cicer	ACTTGCAAGTGATCCTAACTTGCACCTTTGTTGAATCTCCTGCCTGGCTCCACAGAGT
Nicotiana	ACTTGCCGGGGATCCTAACTTGCACCTTTGTTGGAGTCTCCTGCCCTTGCTCCTCCTGAAGT
Arabidopsis	ACTGGCTGGAGACCAAAACCTTCACTTTGTGGAGACACCAGCGCTTGCTCCACCAGAGT
B10-666	ACTTGCTGGAGACCCCAATTTGCATTTTGTGAGTCTCCTGCCCTTGCTCCTCAGAAGT
Consensus	*** ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
Lotus	TCAAATTGATTTAGCTGCACAACAACAGCATGAGGCTGAGCTTGCTGCGGCTGCTAGTCA
Vicia	TCAAATTGATATTGCCTTACAACAAGGCATGAAAATGAAATTTGAAGCTGCTAATCA
Cicer	TCAGATCGATTTAGTTGCACAACAACAGCATGAGGCTGAGATTGCCAAGCTGCTAATCA
Nicotiana	ACAGATCGACTTGGCTGCACAACAACAACATGAGGCTGAGCTTGCTGCTGCTGCCAGTCA
Arabidopsis	TCACATTGACATTGCTGATCAGCAGAAGAACGAGGCCGAGCTTTACAGGCTGCAGCTCA
B10-666	GCAAATAGACATGGCCGCACAACAACAGCATGAAGCAGAGCTTGCTGCAGCTGCTAGCCA
Consensus	** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
Lotus	GCCCTTCTGATGATGATGATGATGCATTTGATTAAAA-----ATCTGCGTGTCTG
Vicia	ACCCCTTCTGATGACGATGATGATGCATTTGAGTAGAAG---AAGGACCTTGGGATTG
Cicer	GCCCTTCTGATGATGATGATGATGCATTTGAGTAGAA-----CCTGTGTGTGTG
Nicotiana	ACCCCTCCCAGATGATGATGATGAGACCTTTGATTAAGAGGTAATCAACCTTCTCGGACA
Arabidopsis	ACCCCTCCCCGATGACGATGATGATATCTTTGAGTAA-----ATCATCTTCTAGAATG
B10-666	GCCCTTCCAGATGATGATGATGATGCTTTTGAATAGGG-----TCCAAAAGTT
Consensus	** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

Gravitrope Genexpression in *Helianthus annuus*

```

Lotus      TTGATCATCTTT----CTGAGTTGCTTCTTCTGTCTTAAGCTAAGCTAAGCTACACTATG
Vicia     ATGGCTTTTGTGTC----TTGAACTGGCACTTTTGTGT-AATCTATA--AAATTA---TGTG
Cicer     GTGACAATCTTC----TTGAGTGTATGCTTACTGTT-----TGTT
Nicotiana GCTTTTGTGGATGCGGTTATGATTTTTCTTTTTTCCCTATGTACTGGTGTCCATTTTTTTT
Arabidopsis TCTGCCGTGGG-----AAGCTCTTGCTTGTTCCTTTTGGTTTTCTCTATGTTGTTTTG
B10-666   GAAGCGGATTTT----ATGAGGGTTTGTGTCTGTTG-----AGTTTTGGATTG
Consensus                               *                               *

Lotus     TTG--TGGGGTTGTATTAT-GGCATTTTTTG-GTGTGGATTTGAGT----ATCTGAAATTT
Vicia     TT---TGAGGTTGAACTGTTAACATTTTTTT-ATATAGATTTGGG-----GTTTTTGATTT
Cicer     TT---GGAGGTTGTAATATTCACCTTTTTTGGATGTGGATTTGAGG----ATCT-AAATTC
Nicotiana CCACCATTGATGGGCTTCTGAGGACTCTCTGTTCCAGAAATATGTAGGCTTTTTTGAACCTCT
Arabidopsis GTGTTACATATAAATCAATCGGCTTTCTTATAACAAAA-----TTAGGTATGT
B10-666   TTG--AATGGTTTTATTATAAACGTTTGGTAGGATGCAGTGAGG-----TTTGTGTTTT
Consensus           *           *           *           *           *

Lotus     AATCAT-----TTAT-AAGATGTTTTACTTAAAATTGGAAGCCTCACTTTATGGTTAAA
Vicia     ATTCGTGGT--GTGATTGAGATGTCTTACTTTTA-TGCCAACCTCACT--ATGGCTGCC
Cicer     AACCAG-----TAT-GAAATATTTACTTGAAAAAAAAAAAAAAAA-----
Nicotiana GTTCTTGTTCTATTTCTTCTGTTTTGTGAGAACGATATGAAGTTTTTATTCATATCTT
Arabidopsis ATTTTTGGACGGTCTTCTGATGGTATCC---AAAGCTAAGTTGTTTCTTCGCAAAAAAA
B10-666   GCAAAAAAA--AAAAAAAAAATAGCTAAGAGGGGGGGGGGG-----
Consensus                               *

Lotus     AAAAAAAAAAAAAAAAA-----
Vicia     AGTTGACCTTCGTTGCC-----
Cicer     -----
Nicotiana CTGAATGTGGACCTCTATTTGTTTGGATGGACCGATTTGGATAGATGAAGCTAGTTTGGT
Arabidopsis AAAAAAAAAAAAAAAAA-----
B10-666   -----
Consensus

Lotus     -----
Vicia     -----
Cicer     -----
Nicotiana TGCTTAAAAAAAAAAAAAAGG
Arabidopsis -----
B10-666   -----
Consensus

```

b) Alignment der Aminosäure-Sequenzen

```

Lotus      -----NFKLVIVGDGGTGKTTFVKRHLTGFEFEKKYEPTIGVEVHPLDFFTNCG
B-10-Mod666 -----
Nicotiana MALPGQQAVDYPSFKLVIVGDGGTGKTTFVKRHLTGFEFEKKYEPTIGVEVHPLDFFTNCG
Arabidopsis MALPNQQTVDYPSFKLVIVGDGGTGKTTFVKRHLTGFEFEKKYEPTIGVEVHPLDFFTNCG
Cicer     MALPNQQTVDYPSFKLVIVGDGGTGKTTFVKRHLTGFEFEKKYEPTIGVEVHPLDFFTNCG
Vicia     MALPNQQTVDYPSFKLVIVGDGGTGKTTFVKRHLTGFEFEKKYEPTIGVEVHPLDFFTNCG
Consensus

Lotus     KIRFYCWDTAGQEKFGGLRDGYIYHGQCAIIMFDVTARLTYKNVPTWHRDLRCVCENIPI
B-10-Mod666 -----MFDVTARLTYKNVPTWHRDLRCVCENIPI
Nicotiana KIRFYCWDTAGQEKFGGLRDGYIYHGQCAIIMFDVTARLTYKNVPTWHRDLRCVCENIPI
Arabidopsis KIRFYCWDTAGQEKFGGLRDGYIYHGQCAIIMFDVTARLTYKNVPTWHRDLRCVCENIPI
Cicer     KIRFYCWDTAGQEKFGGLRDGYIYHGQCAIIMFDVTARLTYKNVPTWHRDLRCVCENIPI
Vicia     KIRFYCWDTAGQEKFGGLRDGYIYHGQCAIIMFDVTARLTYKNVPTWHRDLRCVCENIPI
Consensus                               *****

```

Lotus	VLCGNKVDVKNRQVKAKQVTFHRKKNLQYYEISAKSNYNFEKPFLYLARKLAGDPNLHFV
B-10-Mod666	VLCGNKVDVKNRQVKAKQVTFHRKKNLQYYEISAKSNYNFEKPFLYLARKLAGDPNLHFV
Nicotiana	VLCGNKVDVKNRQVKAKQVTFHRKKNLQYYEISAKSNYNFEKPFLYLARKLAGDPNLHFV
Arabidopsis	VLCGNKVDVKNRQVKAKQVTFHRKKNLQYYEISAKSNYNFEKPFLYLARKLAGDANLHFV
Cicer	VLCGNKVDVKNRQVKAKQVTFHRKKNLQYYEISAKSNYNFEKPFLYLARKLAGDPNLHFV
Vicia	VLCGNKVDVKNRQVKAKQVTFHRKKNLQYYEISAKSNYNFEKPFLYLARKLAGDANLHFV
Consensus	*****
Lotus	ESPALAPPEVQIDLAAQQQHEAEIAAAAASQPLPDDDDDAFD
B-10-Mod666	ESPALAPPEVQIDMAAQQQHEAEIAAAAASQPLPDDDDDAFE
Nicotiana	ESPALAPPEVQIDLAAQQQHEAEIAAAAASQPLPDDDDDETFD
Arabidopsis	ESPALAPPEVQIDLAAQQQHEAEIAAAAASQPLPDDDDDDTFE
Cicer	ESPALAPPEVQIDLVAQQQHEAEIAQAANQPLPDDDDDAFE
Vicia	ESPALAPPEVQIDIALQQRHENEILEAANQPLPDDDDDAFE
Consensus	*:*****:*. . *:.* *: ** *****: *:

6.1.2. Alignment von B-12-Mod-365 mit homologen GenBank-Einträgen

a) Alignment der Nukleotid-Sequenzen

A.t.BT010366	-----ATGTCAGGAAGATCTGCATTTTCCA
A.t.BX826589	CTGAGAATGACATTCATCGAATCTTGAAGACAAAGATGTCAGGTAGATCTGCATTTTCCA
B12-365	-----
Consensus	
A.t.BT010366	GAACCGGAGGTTTCCGACCTGAGAATCTAGGGCAAAACGCAGTATCCTTAATCGGAAGCA
A.t.BX826589	GAACCGGAG-TTTCCGACCTGAGAATCTAGGGCAAAACGCAGTATCCTTAATCGGAAGCA
B12-365	-----
Consensus	
A.t.BT010366	TAGGCTTCTCTGTACTCGTAATCGGAGTCGTAGTTTTTACCATTATCGCTGCTACATATG
A.t.BX826589	TAGGCTTCTCTGTACTCGTAATCGGAGTCGTAGTTTTTACCATTATCGCTGCTACATATG
B12-365	-----
Consensus	
A.t.BT010366	AACCAGAAGATCCACTATTTACCCATCTGACAAAATCACAACTTTCCTCACATCCAATT
A.t.BX826589	AACCAGAAGATCCACTATTTACCCATCTGACAAAATCACAACTTTCCTCACATCCAATT
B12-365	-----
Consensus	
A.t.BT010366	CAAACGCTACTCTTAAATCCGACGACAGTATTGTCAAACCGGTGAAGATTTTCATGGCGG
A.t.BX826589	CAAACGCTACTCTTAAATCCGACGACAGTATTGTCAAACCGGTGAAGATTTTCATGGCGG
B12-365	-----
Consensus	
A.t.BT010366	CGAACCAAACCGCGTTTTGGCGGATTCATCAATATAGCTGATGTTGAAACATCTGAGAATG
A.t.BX826589	CGAACCAAACCGCGTTTTGGCGGATTCATCAATATAGCTGATGTTGAAACATCTGAGAATG
B12-365	-----
Consensus	
A.t.BT010366	ACTCTGATGGTAATCAATTGGATTGTGATACCAATATCCCAATTGATTGCAAAGATCCTG
A.t.BX826589	ACTCTGATGGTAATCAATTGGATTGTGATACCAATATCCCAATTGATTGCAAAGATCCTG
B12-365	-----
Consensus	

Gravitrope Genexpression in *Helianthus annuus*

A.t.BT010366	AAGTTTTTCACTTGATGATGAAAAGCTACTATGGAGAAGTTTAAAGACAGTCACTTTTATA
A.t.BX826589	AAGTTTTTCACTTGATGATGAAAAGCTACTATGGAGAAGTTTAAAGACAGTCACTTTTATA
B12-365	-----TGGTACAGTGAGATGAAAA--AGCTGAACA
Consensus	*** *** * * * * * * * *
A.t.BT010366	AGTTTGGTAAACCTGTGATTGTGGAAGGTAGTAGTAGTTCTTGTGATATGGCTTGGCGTT
A.t.BX826589	AGTTTGGTAAACCTGTGATTGTGGAAGGTAGTAGTAGTTCTTGTGATATGGCTTGGCGTT
B12-365	ATGGTGTACGGTTGAGTTTGATGGATACATGAGGGCTTCTGTTGACAC----CGAGGTT
Consensus	* ** ** ** * ** * * * * **** *** * * **
A.t.BT010366	ATAGACCTAAGGATGGTAAAGCGGCT-GCGTTTTATAAGGATTATAGGAGGTTTGTGATT
A.t.BX826589	ATAGACCTAAGGATGGTAAAGCGGCT-GCGTTTTATAAGGATTATAGGAGGTTTGTGATT
B12-365	TT---CCTGAGGGGCAAAAAGCAAATCGAGACTTTTAATGATCTCACCAGA-----GACT
Consensus	* *** ** ***** * * * * * * ** ** * ** ** *
A.t.BT010366	GAAAAGTCTGGGAATTGTAGTGTAGTGTGATGGGGATTGGTGAGTATCATTCGGGTGTG
A.t.BX826589	GAAAAGTCTGGGAATTGTAGTGTAGTGTGATGGGGATTGGTGAGTATCATTCGGGTGTG
B12-365	GGTAAGGATGGTATCAACACT-TTGCAGTTCTTGAGGTTTTTGAGT-TCTCTCATGTTTG
Consensus	* *** *** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
A.t.BT010366	AATGCGAGGAAGCGGAAGAGGCCCGGTTTCGAAATTCGAGTGGTGGTAAGGTTGATGAT
A.t.BX826589	AATGCGAGGAAGCGGAAGAGGCCCGGTTTCGAAATTCGAGTGGTGGTAAGGTTGATGAT
B12-365	TATGT---TAAGTTAAAGTCACTTG---TTACAAGTTTTGTTGTT--TAAAACAGATAAT
Consensus	*** *** *** * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
A.t.BT010366	TTTCGCATTGCCTGTAGTTGGTGAAGCAGTGAATGATTCACCTTCTGTTGTTGAGTCTGAA
A.t.BX826589	TTTCGCATTGCCTGTAGTTGGTGAAGCAGTGAATGATTCACCTTCTGTTGTTGAGTCTGAA
B12-365	TTGACATTA-----AGT-----AGCACTGTCTTATTTATTTTTT-CCAATGTGTTTG--
Consensus	** **** *** **** * * * * * * * * * * * * * *
A.t.BT010366	AATGTGTTTAAAGAAGGTCATTACTTGGTTTTATCTGGTGGAGGAGATAGGTGTAAGAGT
A.t.BX826589	AATGTGTTTAAAGAAGGTCATTACTTGGTTTTATCTGGTGGAGGAGATAGGTGTAAGAGT
B12-365	--TTTATCAATAGTAAGTTAT-GCTTTGTCT-CTCAAAAAAAAAAAAA-----
Consensus	* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
A.t.BT010366	ATGAACCATTTCTTGTGGAGTTTCTTGTGTGCTTTAGGGGAAGCTCAGTATTTGAATAGA
A.t.BX826589	ATGAACCATTTCTTGTGGAGTTTCTTGTGTGCTTTAGGGGAAGCTCAGTATTTGAATAGA
B12-365	-----
Consensus	-----
A.t.BT010366	ACATTAGTGATGGATTTGACTCTTTGTTTGTCTTCTGTTTATACATTGTCTGGTCAAAAC
A.t.BX826589	ACATTAGTGATGGATTTGACTCTTTGTTTGTCTTCTGTTTATACATTGTCTGGTCAAAAC
B12-365	-----
Consensus	-----
A.t.BT010366	GAGGAAGGAAGGACTTTAGGTTTTACTTTGATTTTCGAGCATTGAAAGAGGCTGCTTCT
A.t.BX826589	GAGGAAGGAAGGACTTTAGGTTTTACTTTGATTTTCGAGCATTGAAAGAGGCTGCTTCT
B12-365	-----
Consensus	-----
A.t.BT010366	ATGTTAGACCAGGTGCAGTTTTGGGCTGATTGGGGGAAATGGTATAAGAAGAATGGATTA
A.t.BX826589	ATGTTAGACCAGGTGCAGTTTTGGGCTGATTGGGGGAAATGGTATAAGAAGAATGGATTA
B12-365	-----
Consensus	-----
A.t.BT010366	AAGCTTCATCTTGTGGAAGATTTTCGGGTCACACCGATGAAGCTTGTGATGTGAAGGAC
A.t.BX826589	AAGCTTCATCTTGTGGAAGATTTTCGGGTCACACCGATGAAGCTTGTGATGTGAAGGAC
B12-365	-----
Consensus	-----

A.t.BT010366	ACGTTGATAATGAGGAAGTTCGGGACAGTAGAACCAGATAACTATTGGTATAGAGTATGC
A.t.BX826589	ACGTTGATAATGAGGAAGTTCGGGACAGTAGAACCAGATAACTATTGGTATAGAGTATGC
B12-365	-----
Consensus	
A.t.BT010366	GAAGGGGAGACAGAATCTGTTGTGCAAAGGCCTTGGAATCTATTGTGGAAATCTAAACGA
A.t.BX826589	GAAGGGGAGACAGAATCTGTTGTGCAAAGGCCTTGGAATCTATTGTGGAAATCTAAACGA
B12-365	-----
Consensus	
A.t.BT010366	CTGATGGAGATTGTTTCTGCGATTGCTTCGAGGTTAAACTGGGATTATGATGCTATTTCAC
A.t.BX826589	CTGATGGAGATTGTTTCTGCGATTGCTTCGAGGTTAAACTGGGATTATGATGCTATTTCAC
B12-365	-----
Consensus	
A.t.BT010366	ATTGAGAGAGGAGACAAGGCGAGAAACAAGGAAGTTTGGCCTAATCTTGAAAAGGATACT
A.t.BX826589	ATTGAGAGAGGAGACAAGGCGAGAAACAAGGAAGTTTGGCCTAATCTTGAAAAGGATACT
B12-365	-----
Consensus	
A.t.BT010366	TCACCAAGCTCCATTTTATCTACCCCTCCAGGACAAAATCGAACAAGGAAGGAATCTTTAT
A.t.BX826589	TCACCAAGCTCCATTTTATCTACCCCTCCAGGACAAAATCGAACAAGGAAGGAATCTTTAT
B12-365	-----
Consensus	
A.t.BT010366	ATTGCAACAAAATGAACCAGAGTTATCTTTCTTTAACCCCTTGAAAGACAAGTACAAACCC
A.t.BX826589	ATTGCAACAAAATGAACCAGAGTTATCTTTCTTTAACCCCTTGAAAGACAAGTACAAACCC
B12-365	-----
Consensus	
A.t.BT010366	CATTTTCTGGATGAGTTTAAGGATCTCTGGGACGAGAGCAGCGAATGGTATTCAGAGACA
A.t.BX826589	CATTTTCTGGATGAGTTTAAGGATCTCTGGGACGAGAGCAGCGAATGGTATTCAGAGACA
B12-365	-----
Consensus	
A.t.BT010366	ACGAAGCTTAATGGAGGAAACCCAGTTGAGTTTGACGGTTACATGAGAGCGTCTGTTGAT
A.t.BX826589	ACGAAGCTTAATGGAGGAAACCCAGTTGAGTTTGACGGTTACATGAGAGCGTCTGTTGAT
B12-365	-----
Consensus	
A.t.BT010366	ACAGAGGTGTTCTTGAGAGGGAAGAAGCAGATTGAAACATTCAATGATCTTACCAATGAC
A.t.BX826589	ACAGAGGTGTTCTTGAGAGGGAAGAAGCAGATTGAAACATTCAATGATCTTACCAATGAC
B12-365	-----
Consensus	
A.t.BT010366	TGTAGAGATGGAATCGGCACTTGCAACGTAGCAGCAAGCTGA-----
A.t.BX826589	TGTAGAGATGGAATCGGCACTTGCAACGTAGCAGCAAGCTGATCGCTCTGGTAAGTATTT
B12-365	-----
Consensus	
A.t.BT010366	-----
A.t.BX826589	CAAAAGCTTGTTATCAGAGACAGTTGTTTGTGGTTAGGTTGATAGAAAACCTTGAACCGTC
B12-365	-----
Consensus	
A.t.BT010366	-----
A.t.BX826589	TTGTTCCACTTGTTTCCACTTTGGTACCTATAGAATAGCTGTTTGTATGTTCAATCAC
B12-365	-----
Consensus	

b) Alignment der Aminosäure-Sequenzen

```

A.t.BT010366  MSGRSAFSRTGGFRPENLGQNAVSLIGSIGFSVLVIGVVVFTIIAATYEPEDPLFHPSDK
A.t.BX826589  ----ICIFQNRSFRRPENLGQNAVSLIGSIGFSVLVIGVVVFTIIAATYEPEDPLFHPSDK
b12-365_1    -----
b12-365_2    -----
b12-365_3    -----
Consensus

A.t.BT010366  ITTFLTSNSNATLKSDDSIVKTGEDFMAANQTAFGGFINIADVETSENDSDGNQLDCDTS
A.t.BX826589  ITTFLTSNSNATLKSDDSIVKTGEDFMAANQTAFGGFINIADVETSENDSDGNQLDCDTS
b12-365_1    -----WYSEMKKLNNNGVT
b12-365_2    -----GTVRKSTMVLRLS
b12-365_3    -----VQDEKAEQWCYGV
Consensus

A.t.BT010366  IPIDCKDPEVFHLMMKATMEKFKDSHFYKFGKPVIVEGSSSSCDMAWRYRPKDGKAAAFY
A.t.BX826589  IPIDCKDPEVFHLMMKATMEKFKDSHFYKFGKPVIVEGSSSSCDMAWRYRPKDGKAAAFY
b12-365_1    VFDG-----YMRASVDTEVFLRGKKQIETFNDLTRDWG-----
b12-365_2    LMDTG-----LLLTPRFSGAKSKSRLLMISPETGKDGINT-----
b12-365_3    WIHEG-----FCHRGFPEGQKANR--DFSHQRLVRMVST-----
Consensus
                :      .      .:      .

A.t.BT010366  KDYRRFVIEKSGNCSVSVMGIGEYHSGVNAKRKRKRPGFRNSSGGKVDDFALPVVGEAVND
A.t.BX826589  KDYRRFVIEKSGNCSVSVMGIGEYHSGVNAKRKRKRPGFRNSSGGKVDDFALPVVGEAVND
b12-365_1    --YQHFAV-----LEVFESHVCMLSSH
b12-365_2    -----LQFLRFLSSLMFVCV
b12-365_3    -----LCSSGFVLSCLYVKL
Consensus
                :      :

A.t.BT010366  SLPVVESENVFKEGHYLVYSGGDRCKSMNHFLWSFLCALGEAQYLNRTLVMDLTLCLSS
A.t.BX826589  SLPVVESENVFKEGHYLVYSGGDRCKSMNHFLWSFLCALGEAQYLNRTLVMDLTLCLSS
b12-365_1    LLQVL----LFKTDNLTLS-----TVLFIFS-----NVFVYQVMLCCLK
b12-365_2    KVTCTYKFCCLKQIIHVALSY-----LFFP-----MCLFINSKLCFVS
b12-365_3    KSLVTSFVVNRFDIKHCLII-----FFQ-----CVCLSIIVSYALS
Consensus
                :      :      :      .      .      .

A.t.BT010366  VYTLSGQNEEGKDFRFYDFEHLKEAASMLDQVQFWADWGKWKYKKNGLKLHLVEDFRVTP
A.t.BX826589  VYTLSGQNEEGKDFRFYDFEHLKEAASMLDQVQFWADWGKWKYKKNGLKLHLVEDFRVTP
b12-365_1    KKKK-----
b12-365_2    QKKKK-----
b12-365_3    LKKKK-----
Consensus
                .

A.t.BT010366  MKLVDVKDTLIMRKFGTVEPDNYWYRVCEGETESVVQRPWNLLWKSRLMEIVSAIASRL
A.t.BX826589  MKLVDVKDTLIMRKFGTVEPDNYWYRVCEGETESVVQRPWNLLWKSRLMEIVSAIASRL
b12-365_1    -----
b12-365_2    -----
b12-365_3    -----
Consensus

A.t.BT010366  NWDYDAIHIERGDKARNKEVWPNLEKDTSPSSILSTLQDKIEQGRNLYIATNEPELSFFN
A.t.BX826589  NWDYDAIHIERGDKARNKEVWPNLEKDTSPSSILSTLQDKIEQGRNLYIATNEPELSFFN
b12-365_1    -----
b12-365_2    -----
b12-365_3    -----
Consensus
    
```

```

A.t.BT010366   PLKDKYKPHFLDEFKDLWDESSEWYSETTKLNGGNPVEFDGYMRASVDTEVFLRGKKQIE
A.t.BX826589   PLKDKYKPHFLDEFKDLWDESS-----
b12-365_1      -----
b12-365_2      -----
b12-365_3      -----
Consensus      -----

```

```

A.t.BT010366   TFNDLTNDCRDGIGTCNVAAS
A.t.BX826589   -----
b12-365_1      -----
b12-365_2      -----
b12-365_3      -----
Consensus      -----

```

6.1.3. Alignment von B-16-Mod-384 mit homologen GenBank-Einträgen

a) Alignment der Nukleotid-Sequenzen

```

Lotus           -----
Capsicum        -----
Nicotiana       AGAGCTTGAACATAAAGCTTTTTCTTGAACAGCAGACCATATGTCTGAATCGGAGCTCTCA
Arabidopsis     -----
Malus           -----
B16-384        -----
Consensus       -----

```

```

Lotus           -----
Capsicum        -----GGCACGAGTATGGTTTTACCAAATCAACAAACTGTAGAT
Nicotiana       AAACCCTCGCAGCATTCTCCTCAAAACAACATGGCTCTTCCAGGTCAGCAAGCCGTGGAT
Arabidopsis     ---TCTTCGCATAGCTTCACTTTCGCCG--ATGGCTCTACCTAACCAGCAAACCGTGGAT
Malus           -----
B16-384        -----
Consensus       -----

```

```

Lotus           ----CTAATTTCAAGCTCGTCATCGTCGGTGATGGTGGCACAGGAAAGACAACCTTCGTG
Capsicum       TATCCGAGTTTCAAGCTTGTATTTGTGGGCGATGGAGGAACTGGGAAGACAACTTTTGTC
Nicotiana      TATCCCAGTTTTAAACTTGTATTTGTGGCGATGGTGGAACTGGAAAAACTACATTTGTG
Arabidopsis    TACCCTAGCTTCAAGCTCGTTATCGTTGGCGATGGAGGCACAGGGAAGACCACATTTGTA
Malus          -----
B16-384       -----
Consensus      -----

```

```

Lotus           AAGAGGCATCTCACCAGTGAATTCGAGAAGAAATATGAACCTACCATTGGTGTGGAGGTC
Capsicum       AAAAGGCATCTCACTGGTGAATTTGAGAAAAAATACGAACCCACTATTGGTGTGGAGGTT
Nicotiana      AAGAGGCATCTTACTGGTGAATTTGAAAAGAAATATGAACCCACCATTGGAGTGGAGGTT
Arabidopsis    AAGAGACATCTTACTGGAGAGTTTGAAGAAGATATGAACCCACTATTGGTGTGGAGGTT
Malus          -----GAGAAGAAATACGAACCAACCATTGGTGTGGAGGTT
B16-384       -----
Consensus      -----

```


Gravitrope Genexpression in *Helianthus annuus*

Lotus	CATCCTTTGGATTTCCTTCACAAACTGTGGCAAGATCCGATTCTACTGCTGGGATACTGCT
Capsicum	CATCCACTAGACTTNTTNACAAATTTGTGGGAAAATTCGCTTTTATTGCTGGGATACAGCT
Nicotiana	CATCCATTGGATTTCCTTCACAAACTGTGGGAAGATTAGGTTTTACTGCTGGGATACTGCT
Arabidopsis	CATCCTCTTGATTTCCTTCACAAACTGTGGCAAGATCCGTTTCTACTGTTGGGATACTGCT
Malus	CATCCACTGGACTTCTTCACAAATTTGTGGAAAGATCCGCTTTTACTGCTGGGACTGCT
B16-384	-----
Consensus	
Lotus	GGACAAGAGAAGTTTGGGGGTCTCAGAGATGGTTACTATATC-CATGGGCAATGCGCCAT
Capsicum	GGACAAGAGAAGTTTGGAGGGCTCCGAGATGGTTACTACANTTCATGGGCAATGTGCAAT
Nicotiana	GGTCAGGAGAAAATTTGGTGGCCTTAGGGATGGATACTATATT-CATGGTCAATGTGCTAT
Arabidopsis	GGCCAAGAGAAGTTTGGTGGTCTTAGGGATGGTTACTACATC-CATGGACAATGTGCTAT
Malus	GGGCAAGAGAAGTTTGGCGGTCTTCGTGATGGTTACTACATT-CATGGGCAATGTGCAAT
B16-384	-----
Consensus	
Lotus	TATAATGTTTGATGTTACTGCCCGACTGACATACAAGAATGTCCCTACCTGGCACCGTGA
Capsicum	TATCATGTTTGATGTAACGGCCCGTTTGACCTACAAGAAATGTTCCCTACATGGCATAGAGA
Nicotiana	CATCATGTTTGATGTGACAGCCCGATTGACATACAAGAAATGTCCCCACATGGCATAGGGA
Arabidopsis	CATCATGTTTGATGTGACAGCAGACTGACATACAAGAAATGTTCCAACATGGCACCGTGA
Malus	CATCATGTTTGATGTTACCGCTAGGTTGACATACAAGAAATGCTCCTACATGGCACCGTGA
B16-384	-----
Consensus	
Lotus	TCTTTGCCGGGTCTGCGAGAACATCCCCATTGTTCTTTGTGGCAACAAGGTTGATGTGAA
Capsicum	TCTTTGCAGGGTTTGTGAAAACATCCCCATTGTTCTCTGTGGAAACAAAGTGGATGTCAA
Nicotiana	TCTTTGCCGTGTCTGTGAAAATATTCCCATTGTTCTTTGCGGAAACAAGGTTGATGTGAA
Arabidopsis	TCTTTGCAGGGTTTGTGAAAACATCCCAATTGTTCTTTGTGGGAATAAAGTGTGATGTGAA
Malus	TCTATGCCGTGTTTGTGAGAACATCCCTATTGTTCTCTGTGGCAACAAGGTTGATGTGAA
B16-384	-----
Consensus	
Lotus	GAACAGACAGGTGAAGGCCAAAGCAGGTTACTTTCCACAGGAAGAAGAATCTGCAGTACTA
Capsicum	GAACAGGCAGGTTAAGGCCAAAGCAAGTGACCTTCCACAGGAAGAAAAATTTGCAGTACTA
Nicotiana	GAACCGTCAAGTTAAGGCTAAGCAGGTTACTTTCCACCGGAAGAAGAATTTGCAATACTA
Arabidopsis	GAACAGGCAAGTCAAGGCCAAAGCAGGTTAACAATCCACAGGAAGAAGAACCCTCCAGTATTA
Malus	GAACAGGCAGGTCAAAGGCCAAGCAGGTTACCTTCCACAGAAAGAAGAATCTGCAGTACTA
B16-384	-----
Consensus	
Lotus	TGAGATCTCAGCCAAGAGTAACTATAACTTTGAGAAGCCTTTCCCTTTATCTTGCCAGGAA
Capsicum	TGAGATCTCGGCCAAAGAGTAACTACAACCTTTGAGAAGCCTTTTCTGTACCTTGCTAGAAA
Nicotiana	TGAGATATCAGCAAAGAGTAACTACAACCTTTGAGAAGCCTTTCCCTTTACCTTGCCAGGAA
Arabidopsis	CGAGATATCTGCCAAGAGCAACTACAACCTTCGAGAAGCCATTCTTGTTACCTTGCTAGAAA
Malus	TGAGATATCAGCAAAGAGCAACTACAACCTTTGAGAAACCCTTCCCTACTTTGGCGAGGAA
B16-384	-----
Consensus	
Lotus	ACTTGCAGGTGATCCTAACTTGCACCTTTGTTGAATCTCCTGCATTGGCTCCACCTGAAGT
Capsicum	GCTTGTGGGGATGGAAATCTTCACTTTGTGGAATCACCTGCACCTTGCTCCCCAGAAGT
Nicotiana	ACTTGCAGGGATCCTAACTTGCACCTTTGTGGAATCACCTGCACCTTGCTCCCCAGAAGT
Arabidopsis	GCTCGCCGGGGACGCTAATCTTCACTTTGTGGAATCACCTGCACCTTGCTCCCCGGAAGT
Malus	GCTTGCAGGTGATGCAAATCTTCACTTTGTTGAGTCTCCGGCCCTTGCTCCTCCAGAAGT
B16-384	-----TTGTGAGTCTCCTGCCCTTGCTCCTCCAGAAGT
Consensus	***** ** ** ** ** * ***** ** *****

Lotus	TCAAATTGATTTAGCTGCACAACAACAGCATGAGGCTGAGCTTGCTGCGGCTGCTAGTCA
Capsicum	ACAAATTGACTTAACTGCACAAGCACAGCATGAAAAGGAGCTTGCTGAAGCTGCTATTCA
Nicotiana	ACAGATCGACTTGGCTGCACAACAACAACATGAGGCTGAGCTTGCTGCTGCTGCCAGTCA
Arabidopsis	TCAAATCGACTTGGCTGCTCAGCAGCAGCATGAGGCGGAGCTTGCTGAGCAGCAGCAAGTCA
Malus	GCACTTTGACATGGCTGCCCAACAACAGCATGAAGCCGAGCTTGCTCAGCGGCTGCCCA
B16-384	GCAAATAGACATGGCCGCACAACAACAGCATGAAGCAGAGCTTGCTGCAGCTGCTAGCCA
Consensus	** * ** * * ** ** ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *
Lotus	GCCCTTCCCTGATGATGATGATGATGCATTTGATTAAAAA-TCTGCGTGTCTGTTGATCA
Capsicum	GCCACTTCCCTGATGATGATGATGAAGTATTTGAATAGAAGGCCCTAGCTCAGTGCCGATCA
Nicotiana	ACCCCTCCCAGATGATGATGATGAGACCTTTGATTAAGAGGTAATCAACCTTCTCGGACA
Arabidopsis	GCCACTTCCCTGATGACGATGATGACACCTTCGAGTAGAGAAAGAGAGATGTGATCTGTCA
Malus	GCCTCTTCCCTGATGACGATGATGAGGCATTTGAATAGACTGGGAGATGACATTTCAATAG
B16-384	GCCGCTTCCAGATGATGATGATGATGCTTTTGAATAGGGTCCAAAAGTTGAAGCGGATTT
Consensus	** ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *
Lotus	TCTTTCTGAGTTGCTTCTTCTGTCTTAAGCTAAGCTACACTATGTTG-TGGGGTT
Capsicum	G-TTTCACCATTGCACCTTTTCTTATGCTTCGNCCCTAAATTTCTTATAT-----
Nicotiana	GCTTTTGTGGATGCGGTTATGATTTTCTTTTCTTCTA-----TGTACTG-GTGTCCC
Arabidopsis	C-----TGATTACCCGTTAGGGCTTGTCTGAACCTTTTTTTTGTTCATGGTG-CTATTTT
Malus	AAAGTGGCTTATATCTGCTAGGACATGGCTTTCATTCTGCTGGGAAACGGGACTTGTTTT
B16-384	T-ATGAGGGTTTGTGTCTGTTGAGTTTGGATTGTTGAATGGTTTTATTATAAACGTTTT
Consensus	* * * * *
Lotus	GTATTATGGCATTTTTGGTGTGGATTTGAG-TATCTGAAATTTAATCATTTATAAGATGT
Capsicum	-----
Nicotiana	ATTTTTTCCACCATTGATGGGCTTCTGAG-GACTCTCTGTTCCAGAATATGTAGGCTTT
Arabidopsis	TATGTGTCCGTACTTTGAAATGAATC-GAT-GACATTAGTAATTTTCATTTTTTAAGTT--
Malus	TCAAAATGTCATGTTTGAACACAATGACTCGGTTTTAGTTAGATTCAACTATAGCTATT
B16-384	GTAGGATGCAGTGAGGTTTGTGTTTGTATTTTTGGTGTGTGAAGCAATGTTTGGGTGTT
Consensus	
Lotus	TTTA--CTTAAATTTGGAAGCCTCACTTTATGGTTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA-----
Capsicum	-----
Nicotiana	TTGAACTCTGTTCTTGTCTTATTTTTCTTTCTGGTTTGTGAGAACGATATGAAGTTTTTAT
Arabidopsis	-----
Malus	ATTAGCTATTGTTTCTCATTGGTGTGCCGGTAGT-----
B16-384	GAGTTTCAAAAAAAAAAAAAA-----
Consensus	
Lotus	-----
Capsicum	-----
Nicotiana	TCATATCTTCTGAATGTGGACCTCTATTTGTTTGGATGGACCGATTTGGATAGATGAAGC
Arabidopsis	-----
Malus	-----
B16-384	-----
Consensus	
Lotus	-----
Capsicum	-----
Nicotiana	TAGTTTGGTTGCTTAAAAAAAAAAAAAAGG
Arabidopsis	-----
Malus	-----
B16-384	-----
Consensus	

Gravitrope Genexpression in *Helianthus annuus*

b) Alignment der Aminosäure-Sequenzen

```

Nicotiana      -----MALPGQQAVDYPSFKLVIVGDGGTGKTTFVKRHLTGFEFEKKYEPTIGVEVHP
L.japonicus   -----NFKLVIVGDGGTGKTTFVKRHLTGFEFEKKYEPTIGVEVHP
Malus         -----EKKYEPTIGVEVHP
Arabidopsis   LRIASLSPMALPNQQTVDYPSFKLVIVGDGGTGKTTFVKRHLTGFEFEKKYEPTIGVEVHP
b16-384      -----
Consensus

Nicotiana      LDFFTNCGKIRFYCWDTAGQEKFGGLRDGYI IHGQCAIIMFDVTARLTYK NVP TWHRDLC
L.japonicus   LDFFTNCGKIRFYCWDTAGQEKFGGLRDGYI IHGQCAIIMFDVTARLTYK NVP TWHRDLC
Malus         LDFFTNCGKIRFYCWDTAGQEKFGGLRDGYI IHGQCAIIMFDVTARLTYK NVP TWHRDLC
Arabidopsis   LDFFTNCGKIRFYCWDTAGQEKFGGLRDGYI IHGQCAIIMFDVTARLTYK NVP TWHRDLC
b16-384      -----
Consensus

Nicotiana      RVCENIPIVLCGNKVDVKNRQVKAKQVTFHRKKNLQYYEISAKSNYNFEKPF FLYLARKLA
L.japonicus   RVCENIPIVLCGNKVDVKNRQVKAKQVTFHRKKNLQYYEISAKSNYNFEKPF FLYLARKLA
Malus         RVCENIPIVLCGNKVDVKNRQVKAKQVTFHRKKNLQYYEISAKSNYNFEKPF FLYLARKLA
Arabidopsis   RVCENIPIVLCGNKVDVKNRQVKAKQVTFHRKKNLQYYEISAKSNYNFEKPF FLYLARKLA
b16-384      -----
Consensus

Nicotiana      GDPNLHFVESPALAPPEVQIDLAAQQQHEAE LAAAASQPLPDDDDDETFD-----
L.japonicus   GDPNLHFVESPALAPPEVQIDLAAQQQHEAE LAAAASQPLPDDDDDAFD-----
Malus         GDANLHFVESPALAPPEVHFDMAAQQQHEAE LAAAASQPLPDDDDDEAFE-----
Arabidopsis   GDANLHFVESPALAPPEVQIDLAAQQQHEAE LAAAASQPLPDDDDDFE-----
b16-384      -----VESPALAPPEVQIDMAAQQQHEAE LAAAASQPLPDDDDDAFEGPKVEADFMRV
Consensus
*****:.*:*****.*:*****:.*:
Nicotiana      -----
L.japonicus   -----
Malus         -----
Arabidopsis   -----
b16-384      CVCVLDLDCMVLTLTFGRMQGLCLYFWCCEAMFGCVSKKKK
Consensus

```

6.1.4. Alignment von B-18-Mod-443 mit homologen GenBank-Einträgen

a) Alignment der Nukleotid-Sequenzen

```

Menyanthes    TAGACCTTCTCGGTAAAAACAGATCAAAC TTATTATTATCAAAATGATCTGAACTGTTTCA
Griselinia    TAGACCTTCTCGGTAAAAACAGATCAAAC TTATTATTATCAAAATGATCTGAACTGTTTCA
Boopis        TAGACCTTCTCGGTAAAAACAGATCAWACTTATTATTATCAAAATGATCTGAACTGTTTCA
Acicarpha     TAGACTTTCTCGGTAAAAACAGATCAAAC TTATTATTATCAAAATGATCTGAACTGTTTCA
Lactuca       -----
b18-443      -----
Consensus

```

Menyanthes	AAGACCCAACATGCATTTTTTTGTGCATTGGGCTCTTTCATTAACCTGATATAAAATATCAGC
Griselinia	AAGACCCAACATGCATTTTTT-GTGCATTGGGCTCTTTCATTAACCTGATATAAAATATCAGC
Boopis	AAGACCCAACATGCATTTTTTTGTGCATTGGGCTCTTTCATTAACCTGATAAAAAATATCAGC
Acicarpha	AAGACCCAACATGCATTTTTTTGTGCATTGGGCTCTTTCATTAACCTGATATAAAATATCAGC
Lactuca	-----
b18-443	-----
Consensus	-----
Menyanthes	CAGTCCGCCATATTTTTTTTT---GACAGAAAAATAAGGAGATGGCTCCATGTGCTCTGAG
Griselinia	CAGTCCGCCATCTTTTTTTTT---TACAGAAAAATAAGGAGATGGCTCCATGTGCTCTGAG
Boopis	TAGTCCGCCATTTTTTTTT---GACAGAAAAATAAGGAGATGGCTCCATGTGCTCTGAG
Acicarpha	TAGTCCGCCATTTTTTTTTTTTTTGGACAGAAAAATAAGTAGATGGCTCCATGTGCTCTGAG
Lactuca	-----
b18-443	-----
Consensus	-----
Menyanthes	TCATTATTTGGATTTCAGATTCAGGAACACTACCAAAGTTTTTCAAGGGGGTTTATCTTGA
Griselinia	TCATTATTTGAATTCTGATCCAGGAACACTACCAAAGTGTTCAAAGGGGGTTTATCTTGA
Boopis	TCATTATGTGGATTTCAGATTCAGGAACACTACCAAAGTTTTTCAAGGGGGTTTATCTTGA
Acicarpha	TCATTATGTGGATTTCAGATTCAGGAACACTACCAAAGTTTTTCAAGGGGGTTTATCTTGA
Lactuca	-----
b18-443	-----
Consensus	-----
Menyanthes	CGTAGGTCTGCCTCTGGCCTAGATTAACCTAAGTGAATGAAGTCTCTATCGCTCTACTT
Griselinia	CGTAGGTCTGCCTCTGGCCTAGATTAACCTAAGTACATGAAGTCTCTATCGCTCTGCTT
Boopis	CGTAGGTCTGCCTCTGGCCTAGATTAACCTAAGTGAATGAAGTCTCTATCGCTTTACTT
Acicarpha	CGTAGGTCTGCCTCTGGCCTAGATTAACCTAAGTGAATGAAGTCTCTATCGCTTTACTT
Lactuca	-----
b18-443	-----
Consensus	-----
Menyanthes	AAAAATAAAATATGAAACTTCATACACCTTAAAGTTCATAGGACGAAAAGAGATTTTTTTT
Griselinia	AAAAATAAAATATGAAACTTCATACACCTTAAAGTTCATAGGACGAAAAGAGATTTTTTTT
Boopis	AAAAATCAAATATGAAACTTCATACACCTTAAAGTTCATAGGACGAAAAGAGATTTTTTTT
Acicarpha	AAAAATCAAATATGAAACTTCATACACCTTAAAGTTCATAGGACGAAAAGAGATTTTTTTT
Lactuca	-----
b18-443	-----
Consensus	-----
Menyanthes	GAGGTCCTTAATACTCAT-ATGCCTAGCATTGAATAGACTGGGTATTTACCTTATCAATA
Griselinia	GAGGTCCTTA-TACTCATTATGCCTAGCATTGAATAGACTGGGTATTTACCTTATCAATA
Boopis	GAGGTCCTTA-TACTCATTATGCCTAGCATTGAATAGACTGGGTATTTACCTTATCAATA
Acicarpha	GAGGTCCTTA-TACTCATTATGCCTAGCATTGAATAGACTGGATATTTACCTTATCAATA
Lactuca	-----
b18-443	-----
Consensus	-----
Menyanthes	TATCAAATCAATGATGGGGTCTGTTTGGCACCTAAATGGGCACCTGAATCGGACCGAACC
Griselinia	TCTCAAATCAACGATGGGGTCTGTTTGGCACCTAAATGGGTACCCGAATCGGACCGAACC
Boopis	TATCAAATCAATGATGGGGCTTTTTGGCACCTAACTGGGCACCTAAATCGGACCGAACC
Acicarpha	TATCAAATCAATGATGAGGTCTGTTTGGCACCTAACTGGGCACCTAAATCGGACCGAACC
Lactuca	-----
b18-443	-----
Consensus	-----

Gravitrope Genexpression in *Helianthus annuus*

Menyanthes	TTT-GTCAGGCTATTGTTCTCTTGTTCCTCAWAGTTATGGAGTAAGACATCGATTTCTC
Griselinia	TTTTGTCAGGCTATTGTTCTCTTGTTCCTCAAAGTTATGGAGTAAGACATCGATTTCTC
Boopis	CTT-GTCAGGCTATTGTTCTCTTCTTCCCTCAAAGTTCTGGAGTAAGACATCGATTTATC
Acicarpha	CTT-GTCAGGCTATTGTTCTCTTCTTCCCTCAAAGTTATGGAGTAAGACATCGATTTCTC
Lactuca	-----ACTGACCCTAATCGAATAGTTTGGGATTCAGAAGTGAAAGAAAT
b18-443	-----
Consensus	
Menyanthes	AATAAGATCAATTCTTTTGATTGCATGATGGACTCCCCTGAAAAACATTGGCGCGCGTGT
Griselinia	AATAGGATCAATTCTTTTGATTGCATGATGGACTCCCCTGAAAAACATTGGCGCGCGTGT
Boopis	AATAGGATCAATTCTTTTGATTGCATGATGGACTCCCCTGAAAAACATTGGCGCGCGTGT
Acicarpha	AATAGGATCAATTCTTTTGATTGCATGATGGACTCCCCTGAAAAACATTGGCGCGCGTGT
Lactuca	CATTTTATCTA--CTAATAGTGGACAAATTGGCGTATTACCAAATCACGCTCCTATTGCC
b18-443	-----
Consensus	
Menyanthes	AAACGAGGTGCTCTACC-AACTGAGCTATAACCCCTTAGTG-CTTATGATACATATTTTAT
Griselinia	AAACGAGGTGCTCTACCTAACTGAGCTATAGCCCTTAGTG-CTTGTGATACATATTTTAT
Boopis	AAACGAGGTGCTCTACC-AACTGAGCTATAGCCCTTAGTG-CTTGTAAATACATATTTTAT
Acicarpha	AAACGAGGTGCTCTACC-AACTGAGCTATAGCCCTTAGTG-CTTGTAAATACATATTTTAT
Lactuca	ACATCAGTAGATATAGGTATTTTGAAGAATACGCCCTAACGACCAATGGCTAACGATGGCT
b18-443	-----TAGGTATTTTGAAGA-TACGCCCTAACGACCAATGGCTAACGATGGCT
Consensus	* * * * * * * * *
Menyanthes	CATGTAGATAATTTCTTGTCAAGATTAATATTTCTCAAGATGACTATTGCATGATCCAAGA
Griselinia	CATGTAGATAATTTCTTGTCAAGATGAATATTTCCATAG-----ATCCAAGA
Boopis	CATGTAGATAATTTCTTGTCAAGATGAATATTTCTCAAGATGACTATTCCATGATCCAAGA
Acicarpha	TATGTAGATAATTTCTTGTCAAGATGAATATTTCTCAAGATGACTATTCCATGATCCAAGA
Lactuca	CTGATGGGCGGTTT--TGCTAGAATAGGTAATAATGAGATCACT-----GTTTTAGT
b18-443	CTGATGGGCGGTTT--TGCTAGAATAGGTAATAATGAAATCACT-----GTTTTAGT
Consensus	* * * * * * * *
Menyanthes	TCATAGCTCTTTGATCGGTATTGCTTAAATTTGGTATTGCTTCTAAGTAATATGATATTTA
Griselinia	TCATAGCTCTTTGATC-----TGTTTGAGT-GGTATTGCTTATAAGTAATATGATATTTA
Boopis	TCATAGCTCTTTGATC-----GGTATTGCTTCTAAGTAATATGATATTTA
Acicarpha	TCATAGCTCTTTGATC-----GGTATTGCTTCTAAGTAATATGATATTTA
Lactuca	AAATGATGCAGAGAAA-----AGTGGTGACATTGATCCACAAGAAGCTCA
b18-443	AAATGATGCAGAGAAA-----AGTAGTGACATTGATCCACAAGAAGCTCA
Consensus	* * * * * * * *
Menyanthes	-TAATCCATCGAGGGGATGAGTCCCATTTGGTTTTCTTTGTAAAGAT---AAATGACCTA
Griselinia	-TAATCCATCGATGGGATGGGTCCCATTTGGTTCTCTTTGTGATGAT---AAATGACCTA
Boopis	-TAATCCATCGATGGGATGAGTCCCATTTGGTTTTCTTTGTGAAGAT---AAATGACCTA
Acicarpha	-TAATCCATCGATGGGATGAGTCCCATTTGGTTTTCTTTGTGAAGAT---AAATGACCTA
Lactuca	GCAAACCTTTGAAATAGCGGA-----AGCT-GCTTTGAGAAAAGCT-GAAGGAAAGA
b18-443	GCAAACCTTTGAAATAGCAGA-----AGCTTGCTTTGAGAAAAGCTTGAAGGAAAGA
Consensus	* * * * * * * *
Menyanthes	CTTAACTCAGCGGTTAGAGTATTGCTTTTCATACGGCGGGAGTCATTGGTTCAAATCCAAT
Griselinia	CTTAACTCAGTGGTTAGAGTATTGCTTTTCATACGGCGGGAGTCATTGGTTCAAATCCAAT
Boopis	CTTAACTCAGCGGTTAGAGTATTGCTTTTCATACGGCGGGAGTCATTGGTTCAAATCCAAT
Acicarpha	CTTAACTCAGCGGTTAGAGTATTGCTTKWCATACGGNNGGAGTCATTGGTTCAAATYCAAT
Lactuca	GACAAACAATTGAGGCAAATCTAGCTCTCCGACGGGCTAGGACACGGGTAGAGGCT----
b18-443	GACAAACAATCGAGGCAAATCTAGCTCTCCGACGGGCTAGGACACGAGTAGAGGCT----
Consensus	* * * * * * * *

Menyanthes	AGTAGGTAGAACTTATTAGATACCATTGACCCCGGTATCTAATAAGTTTTTATACCCATC
Griselinia	AGTAGGTAGAACTTATTAGATACCATTGACCCCGGTATCTAATAAGTTTTTATACCCATC
Boopis	AGTAGGTAGAACTTATTAGATACCATTGAGCGCGGTATCTAATAAGTTTTTATACCCAGT
Acicarpha	AGTAGGTAGAACTTATTAGATACCATTGACCGCGGTATCTAATAAGTTTTTATACCCATT
Lactuca	-ATCAATGCGATTTTCATA---ACCAGTAGGTGCGTC--CGAATAATCATCGAT--TTATA
b18-443	-ATCAATGCCATTTTCATA---ACCAGTCGGTGCGTC--CAAATAAGCATCGAT--TTATA
Consensus	* * * ** ** ***** ** * ***** * ** *
Menyanthes	CTCTTTTATTGATATTGATTGTTTATCTTTTCTATTTCTTTTTTTTTTTTTTTCGTTGCATC
Griselinia	TTCTTTTATTGATATTGATTTTCTATCTTTTCTATTTTCATTTTTTTT---TCGTTGCATC
Boopis	TTCTTTTATTGATTATATTGATTTTGTATCTTTTCTATTTCTTTTGT-----CGTTGCATC
Acicarpha	TTCTTTTATTGATTATATTGATTTTGTATCTTTTCTATTTCTTTTT-----CGTTGCATC
Lactuca	CACTTATACACCCTTTGGGTGT---TTTGTTTGACTTGATTCT-----GTTCGAGT-
b18-443	-----CTTTGGTTGT---TTTGTTTGACTTGATGCT-----GTTCGATT-
Consensus	*** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
Menyanthes	AAAAATGATTCCGCTTGATTGTATTTGATTGTATTTACTCGACAGAATCAAACAAAACA
Griselinia	AAAAATCTGATTCCGCTTGATTGTATTTGATTGTATTTACTCGACAGAATCAAATCAAACA
Boopis	AAAAATCTGATTGCGCTTGATTGGATTT-----ACTCGACAGAATCAAACAAAACA
Acicarpha	AAAAATCTGATTGCGCTTGATTGTATTT-----ACTCGACAGAATCAAACAAAACA
Lactuca	-AAATACAATCAAGCAAAATCAGATTT-----TGATGCAACGAAAAAAAAAAAAAAAA
b18-443	-AAAAACAATCAAGCGCAATCATATTT-----TGATGCAACGAAAAAAAAAAAAAAAA
Consensus	*** ** ** ** ***** * * ** ** *** ** * *
Menyanthes	AACAAATA--TAGGGTGTATAAAATCGAACTTCATTTGATTATTCGGACGCACCAACTAGT
Griselinia	AAAAAAAAAATAGGGTGTATAAAACCGAACTTCTTTTGATTATTCGGACGCACCAACTAGT
Boopis	ACCAAATCTATAGGGTGTATAAAATCGA-----TGATTATTCGGACGCACCGACTGGT
Acicarpha	CCCAAATATATAGGGTGTATAAAATCGA-----TGATTATTCGGACGCACCGACTGGT
Lactuca	AAAAAAAAAAAAA-----
b18-443	AT-----
Consensus	
Menyanthes	TACGAAATCGCATTGATAGCCTCTACTCGTGTCCCTAGCCCGTCGGAGAGCTAGATTTGCC
Griselinia	TACGAAATCGCATTGATAGTCTCTACTCGTGTCCCTAGCTCGTTCGGAGAGCTAGATTTGCC
Boopis	TATGAAATCGCATTGATAGCCTCTACTCGTGTCTAGCCCGTCGGAGAGCTAGATTTGCC
Acicarpha	TATGAAATCGCATTGATAGCCTCTACTCGTGTCTAGCCCGTCGGAGAGCTAGATTTGCC
Lactuca	-----
b18-443	-----
Consensus	
Menyanthes	TCAATTGTTTGTCTCTTTCCCTTCAGCTTTTCTCAAATTAGCTTCCGCTATTTCAAGAGTT
Griselinia	TCAATTGTTTGTCTCTTTCCCTTCAGCTTTTCTTAAATTAGCTTCTGCTATTTCAAGAGTT
Boopis	TCAATTGTTTGTCTCTTTCCCTTCAGCTTTTCTCAAAGCAGCTTCCGCTATTTCAAGCGTT
Acicarpha	TCAATTGTTTGTCTCTTTCCCTTCAGCTTTTCTCAAAGCAGCTTCCGCTATTTCAAGCGTT
Lactuca	-----
b18-443	-----
Consensus	
Menyanthes	TGCTGAGCTTCTTGTGGATCAATGTCACCACTTCTTCCGCATCATTTACTAAAACAGTG
Griselinia	TGCTGAGCTTCTTGTGGATCAATGTCACCACTTCTTCCGCATCATTTACTAAAACAGTG
Boopis	TGCTGAGCTTCTTGTGGATCAATGTCACCACTTTTCTTGCATCATTTACTAAAACAGTG
Acicarpha	TGCTGAGCTTCTTGTGGATCAATGTCACCACTTTTCTTGCATCATTTACTAAAACAGTG
Lactuca	-----
b18-443	-----
Consensus	

Gravitrope Genexpression in *Helianthus annuus*

Menyanthes	ATCTCATTATTACCTATTCTAGCAAAAACCACCCATCAGAGCCATCGTTAACCATTTGGTTCG
Griselinia	ATCTCATTATTACCTATTCTAGCAAAAACCACCCATCAGAGCCATCGTTAACCATTTGGTTCG
Boopis	ATCTCATTATTACCTATTCTAGCAAAAACCGCCATCAGAGCCATCGTTAACCATTTGGTTCG
Acicarpha	ATCTCATTATTACCTATTCTAGCAAAAACCGCCATCAGAGCCATCGTTAACCATTTGGTTCG
Lactuca	-----
b18-443	-----
Consensus	-----
Menyanthes	TTAAGGCGTATTCTCAAAAATACCTATATCTACAGCTGTGGCAATAGGAGCGTGACTTGGT
Griselinia	TTAAGGCGTATTCTCAAAAATACCTATATCTATAGCTGTGGCAATAGGGGCGTGATTTGGT
Boopis	TTAAGTCGTATTCTCAAAAATACCTATATCTACTGCTGTGGCAATAGGAGCGTGATTTGGT
Acicarpha	TTAAGTCGTATTCTCAAAAATACCTATATCTACTGCTGTGGCAATAGGAGCGTGATTTGGT
Lactuca	-----
b18-443	-----
Consensus	-----
Menyanthes	AATACGCCAATTTGTCCACTATTGGTAGATAAAAATGATTTCTTTCACTTCTGAATCCCAA
Griselinia	AATACGCCAATTTGGCCACTATTAGTAGATAAAAATGATTTCTTTCACTTCTGAATCCCAA
Boopis	AATACGCCAATTTGTCCACTATTAGTAGATAAAAATGATTTCTTTCACTTCTGAATCCCAA
Acicarpha	AATACGCCAATTTGTCCACTATTAGTAGATAAAAATGATTTCTTTCACTTCTGAATCCCAA
Lactuca	-----
b18-443	-----
Consensus	-----
Menyanthes	ACAATTCGATTAGGGGTCAG-----
Griselinia	ACAATTCGATTAGGGGTCAG-----
Boopis	ACTATTCGATTAGGGGTCAGTACACAAAAGATTTAAGGT
Acicarpha	ACTATTCGATTAGGGGTCAGTACACAAAAGATTTAAGGT
Lactuca	-----
b18-443	-----
Consensus	-----

b) Alignment der Aminosäure-Sequenzen

Boopis	TLNLCVLTTPNRIVWDSEVKEIILSTNSGQIGVLPNHAPIATAVDIGILRIRLNDQWLTMA
Acicarpha	TLNLCVLTTPNRIVWDSEVKEIILSTNSGQIGVLPNHAPIATAVDIGILRIRLNDQWLTMA
Lactuca	-----LTPNRIVWDSEVKEIILSTNSGQIGVLPNHAPIATSVDIGILRIRLNDQWLTMA
Menyanthes	-----LTPNRIVWDSEVKEIILSTNSGQIGVLPNHAPIATAVDIGILRIRLNDQWLTMA
Griselinia	-----LTPNRIVWDSEVKEIILSTNSGQIGVLPNHAPIATAIDIGILRIRLNDQWLTMA
b18-443	-----RYFEIRLNDQWLTMA
Consensus	: .*****
Boopis	LMGGFARIGNNEITVLVNDAEKSGDIDPQEAQQTLEIAEAALRKAEGKRQTIEANLALRR
Acicarpha	LMGGFARIGNNEITVLVNDAEKSGDIDPQEAQQTLEIAEAALRKAEGKRQTIEANLALRR
Lactuca	LMGGFARIGNNEITVLVNDAEKSGDIDPQEAQQTLEIAEAALRKAEGKRQTIEANLALRR
Menyanthes	LMGGFARIGNNEITVLVNDAEKSGDIDPQEAQQTLEIAEANLRKAEGKRQTIEANLALRR
Griselinia	LMGGFARIGNNEITVLVNDAEKSSDIDPQEAQQTLEIAEANLRKAEGKRQTIEANLALRR
b18-443	LMGGFARIGNNEITVLVNDAEKSSDIDPQEAQQTLEIAEACFEKSLKERDKQSRQILSDG
Consensus	*****.***** :.*: :*:. . ::
Boopis	ARTRVEAINAIS-----
Acicarpha	ARTRVEAINAIS-----
Lactuca	ARTRVEAINAIS-----
Menyanthes	ARTRVEAINAIS-----
Griselinia	ARTRVETINAIS-----
b18-443	LGHERLSMPFHNQSVRPNKHRFILWLFCLTCCRLKTIKRNHILMQQKKKKXX
Consensus	. : :

6.2. Anhang, Teil 2: GenBank-Einträge

6.2.1. B-10-Mod-666-homologe GenBank-Einträge

- *Nicotiana tabacum* GTP-binding protein (Ran-A1), Identities = 324/382 (84%), Merkle, T., Haizel, T., Matsumoto, T., Harter, K., Dallmann, G. and Nagy, F.: 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 (4), 555-565 (1994), GenBank Accession L16767

- *Cicer arietinum* mRNA for GTP-binding protein (ORF1), clone CanGBP-2, Identities = 328/390 (84%), Dopico, B., Esteban, R. and Labrador, E.: A Ran-related GTP-binding protein is expressed in chickpea epicotyls, unpublished, GenBank Accession AJ299064

- *Lotus japonicus* mRNA for small GTP-binding protein, RAN1B, Identities = 328/390 (84%), Borg, S., Brandstrup, B., Jensen, T.J. and Poulsen, C.: Identification of new protein species among 33 different small GTP-binding proteins encoded by cDNAs from *Lotus japonicus*, and expression of corresponding mRNAs in developing root nodules, *Plant J.* 11 (2), 237-250 (1997), GenBank Accession Z73960

- *Lotus japonicus* mRNA for small GTP-binding protein, RAN1A, Identities = 307/368 (83%), Borg, S., Brandstrup, B., Jensen, T.J. and Poulsen, C.: Identification of new protein species among 33 different small GTP-binding proteins encoded by cDNAs from *Lotus japonicus*, and expression of corresponding mRNAs in developing root nodules, *Plant J.* 11 (2), 237-250 (1997), GenBank Accession Z73959

- *Vicia faba* guanine nucleotide regulatory protein mRNA, Identities = 257/303 (84%), Saalbach, G. and Christov, V.: Sequence of a plant cDNA from *Vicia faba* encoding a novel Ran-related GTP-binding protein, *Plant Mol. Biol.* 24 (6), 969-972 (1994), GenBank Accession Z24678

- *Arabidopsis thaliana* small Ras-like GTP-binding protein (Ran3) mRNA, Identities = 311/382 (81%), Newman,T., deBruijin,F.J., Green,P., Keegstra,K., Kende,H., McIntosh,L., Ohlrogge,J., Raikhel,N., Sommerville,S., Thomashow,M., Retzel,E. and Sommerville,C.: Genes galore: a summary of methods for accessing results from large-scale partial sequencing of anonymous *Arabidopsis* cDNA clones, *Plant Physiol.* 106 (4), 1241-1255 (1994), GenBank Accession U73810

- *Arabidopsis thaliana* small Ras-like GTP-binding protein (Ran-1) mRNA, Identities = 165/189 (87%), Merkle,T., Haizel,T., Matsumoto,T., Harter,K., Dallmann,G. and Nagy,F.: 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 (1994), GenBank Accession L16789

6.2.2. B-12-Mod-365-homologe GenBank-Einträge

- *Arabidopsis thaliana* At4g12700 mRNA, complete cds, Identities = 74/91 (81%), Kim,C.J., Chen,H., Cheuk,R., Shinn,P., Bowser,L., Carninci,P., Dale,J.M., Hayashizaki,Y., Ishida,J., Jones,T., Kamiya,A., Karlin-Neumann,G., Kawai,J., Lam,B., Lin,J., Miranda,M., Narusaka,M., Nguyen,M., Onodera,C.S., Palm,C.J., Quach,H.L., Sakurai,T., Satou,M., Seki,M., Southwick,A., Toriumi,M., Wong,C., Wu,H.C., Yamada,K., Yu,G., Shinozaki,K., Davis,R.W., Theologis,A. and Ecker,J.R., unpublished, GenBank Accession BT010366

- *Arabidopsis thaliana* Full-length cDNA Complete sequence from clone GSLTFB44ZF05 of Flowers and buds of strain col-0 of *Arabidopsis thaliana* (thale cress), Identities = 74/91 (81%), Castelli,V., Aury,J.M., Jaillon,O., Wincker,P., Clepet,C., Menard,M., Cruaud,C., Quetier,F., Scarpelli,C., Schachter,V., Temple,G., Caboche,M., Weissenbach,J. and Salanoubat,M., unpublished, GenBank Accession BX826589

6.2.3. B-16-Mod-384-homologe GenBank-Einträge

- *Malus x domestica* clone 12-1 small Ras-like GTP-binding protein mRNA, partial cds., Identities = 113/131 (86%) Venisse,J.-S., Pontais,I., Paulin,J.-P. and Brisset,M.-N., unpublished, GenBank Accession AY347864

- *Nicotiana tabacum* GTP-binding protein (Ran-A1) mRNA, complete cds., Identities = 102/118 (86%), Merkle,T., Haizel,T., Matsumoto,T., Harter,K., Dallmann,G. and Nagy,F., Plant J. 6 (4), 555-565 (1994), GenBank Accession L16767

- *L.japonicus* mRNA for small GTP-binding protein, RAN1B, Identities = 70/77 (90%), Borg,S., Brandstrup,B., Jensen,T.J. and Poulsen,C., Plant J. 11 (2), 237-250 (1997), GenBank Accession Z73960

- *Capsicum annuum* Ran protein/TC4 protein mRNA, complete cds, Identities = 99/120 (82%), Kim,S. and Lee,K.-W., Unpublished, GenBank Accession AY488172

- *Arabidopsis thaliana* Full-length cDNA Complete sequence from clone GSLTSIL94ZA09 of Silique of strain col-0 of *Arabidopsis thaliana* (thale cress), Identities = 89/107 (83%), Castelli,V., Aury,J.M., Jaillon,O., Wincker,P., Clepet,C., Menard,M., Cruaud,C., Quetier,F., Scarpelli,C., Schachter,V., Temple,G., Caboche,M., Weissenbach,J. and Salanoubat,M., Unpublished, GenBank Accession BX834071

6.2.4. B-18-Mod-443-homologe GenBank-Einträge

- *Lactuca sativa* ATPase epsilon chain mRNA, partial cds;Identities = 291/303 (96%), Lee,G.P., Park,K.W., Lee,C.H. and Kim,C.S.;unpublished, GenBank Accession AF162208

- *Boopis graminea* chloroplast atpE gene (partial), Identities = 347/382 (90%), Bremer,B., Bremer,K., Heidari,N., Erixon,P., Olmstead,R.G.,Anderberg,A.A., Kallersjo,M. and Barkhordarian,E., Mol. Phylogenet. Evol. 24, 273-300 (2002), GenBank Accession AJ429729

- *Acicarpha tribuloides* chloroplast atpE gene (partial), Identities = 289/303 (95%), Bremer,B., Bremer,K., Heidari,N., Erixon,P., Olmstead,R.G., Anderberg,A.A., Kallersjo,M. and Barkhordarian,E., Mol. Phylogenet. Evol. 24, 273-300 (2002), GenBank Accession AJ429728

- *Menyanthes trifoliata* chloroplast atpE gene (partial), Identities = 271/289 (93%), Bremer,B., Bremer,K., Heidari,N., Erixon,P., Olmstead,R.G., Anderberg,A.A., Kallersjo,M. and Barkhordarian,E., Mol. Phylogenet. Evol. 24, 273-300 (2002), GenBank Accession AJ429731

- *Griselinia littoralis* chloroplast atpE gene (partial), Identities = 270/289 (93%), Bremer,B., Bremer,K., Heidari,N., Erixon,P., Olmstead,R.G., Anderberg,A.A., Kallersjo,M. and Barkhordarian,E., Mol. Phylogenet. Evol. 24, 273-300 (2002), GenBank Accession AJ429719

