

Die Rolle von Kaliumkanälen der AKT1-Unterfamilie für Kaliumaufnahme und gerichtetes Wachstum

Dissertation zur Erlangung des
naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Ines Fuchs

aus Aschaffenburg

Würzburg 2005

Eingereicht am: 13.05.2005

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. Ulrich Scheer

1. Gutachter: Prof. Dr. R. Hedrich

2. Gutachter: Prof. Dr. K. Palme

Tag des Promotionskolloquiums: 02.12.2005

Doktorurkunde ausgehändigt am:.....

Ich danke

In erster Linie Herrn Prof. Dr. R. Hedrich für die spannende und interessante Aufgabenstellung, zahlreiche Anregungen zur Bearbeitung und Weiterentwicklung des Themas und die engagierte Unterstützung meiner Arbeit, die mir unter anderem die Teilnahme an mehreren Tagungen und Forschungsaufenthalten ermöglicht hat.

Herrn Prof. Dr. K. Palme für die Bereitschaft, sich als Gutachter dieser Dissertation zur Verfügung zu stellen.

Dr. Katrin Philippar für die sorgfältige Betreuung meiner Arbeit sowie für zahlreiche Hilfestellungen sowohl im experimentellen Bereich als auch beim Zusammenschreiben und Diskutieren der Ergebnisse.

Dr. Dirk Becker für das stets offene Ohr, das er mir vor allem in den letzten Monaten oft geschenkt hat, und für seine freundliche Hilfsbereitschaft, auch dann, wenn er eigentlich keine Zeit hatte.

Dr. Christian Wiese dafür, dass er während der letzten Jahre unzählige Male eigentlich völlig undurchschaubare Probleme mit meinem Computer sowohl durchschaut als auch behoben hat.

Prof. Dr. Göran Sandberg und Dr. Karin Ljung für die Durchführung der Auxinmessungen.

Dr. Natalya Ivashikina und Dr. Sonja Stölzle für die elektrophysiologische Charakterisierung von OsAKT1.

Herrn Prof. Dr. P. Nick für die Hilfestellungen bezüglich der Reisanzucht und die Überlassung des *OsARF1*-Klons.

Allen Mitarbeitern der Werkstatt und des Gartens. Ihre Hilfe, so zum Beispiel der Bau des BLC und die engagierte Pflege meiner Reispflanzen, hat sehr häufig zum Gelingen meiner Experimente beigetragen.

Allen technischen Angestellten für ihre kompetente Unterstützung, wie beispielsweise bei der Elementanalyse oder der Sequenzierung meiner Klone.

Dr. Rosalia Deeken, Dr. Katrin Philippar, Dr. Dirk Becker und Herrn Gerhard Kreuzer für das Korrekturlesen meiner Arbeit.

Den Mitgliedern der Schafkopfruppe für die Ablenkung nach Feierabend und für bahnbrechende Erkenntnisse auf dem Gebiet der Statistik.

Allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Hedrich für vielfältige Hilfestellungen und das sehr angenehme Arbeitsklima.

Meinen Eltern und meinem Bruder, deren liebevoller Unterstützung ich mir während meiner gesamten Ausbildung immer sicher sein konnte.

Nicht zuletzt Jan, der mich die gesamte Zeit meiner Promotion über begleitet und sowohl Höhen als auch Tiefen gemeinsam mit mir erlebt hat. Vielen Dank dafür!

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Auxinreguliertes Streckungswachstum	1
1.2	Auxintransport.....	5
1.3	Perzeption des Auxinsignals	10
1.4	Regulation der Genexpression durch Auxin.....	11
1.5	Kaliumaufnahme in die Pflanze.....	17
1.6	Ziel dieser Arbeit	20
2	Material und Methoden.....	23
2.1	Anzucht von Zea mays.....	23
2.1.1	Wachstum unter phototroper Stimulation.....	23
2.1.2	Wachstum unter gravitroper Stimulation	23
2.1.3	Blue Light Cycler, BLC.....	24
2.2	Anzucht von Oryza sativa	25
2.2.1	Wachstumsexperimente an Koleoptilsegmenten	25
2.2.2	Wachstum unter Salzstress	26
2.3	Analyse des IAA-Gehalts in phototrop stimulierten Maiskoleoptilen	26
2.4	Analyse des Gehalts anorganischer Ionen in pflanzlichen Geweben.....	27
2.4.1	Kationenanalyse	27
2.4.2	Anionenanalyse	27
2.5	Verfahren mit Ribonukleinsäuren (RNA).....	27
2.5.1	Isolierung von RNA und mRNA.....	27
2.5.2	Elektrophorese von RNA	28
2.5.3	Northern Blot.....	28
2.5.4	Synthese radioaktiv markierter DNA-Sonden.....	29
2.6	Verfahren mit Desoxyribonukleinsäuren (DNA)	30
2.6.1	Analyse und Modifikation	30
2.6.1.1	DNA-Gelelektrophorese.....	30
2.6.1.2	Restriktionsanalyse.....	31
2.6.1.3	Aufreinigung von DNA	31
2.6.1.4	Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA.....	31
2.6.1.5	Plasmidpräparation.....	31
2.6.1.6	DNA-Sequenzierung und Sequenzanalyse	32
2.6.2	Klonierung von DNA-Fragmenten	32
2.6.2.1	Ligation	32
2.6.2.2	Ligation von PCR-Produkten (TA-Klonierung)	33
2.6.2.3	Gerichtete Ligation von PCR-Produkten	33
2.6.3	cDNA-Synthese	33

2.6.4	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	34
2.6.5	Quantitative Echtzeit-RT-PCR.....	35
2.6.5.1	Primerdesign	36
2.6.5.2	LightCycler-PCR	36
2.6.5.3	Auswertung der LightCycler-PCR	37
2.7	Bakterien	37
2.7.1	Verwendete Stämme und Vermehrung	37
2.7.2	Transformation chemisch kompetenter Bakterien	38
2.7.3	Transformation elektrokompeter Bakterien.....	38
2.8	Proteinanalytik.....	39
2.8.1	Aufreinigung von Gesamt -Protein aus HEK293-Zellen	39
2.8.2	Konzentrationsbestimmung von Proteinen	39
2.8.3	SDS-Page	40
2.8.4	Westernblot	41
2.8.5	Coomassie-Färbung von Polyacrylamidgelen	42
2.9	Elektrophysiologische Messungen	42
2.9.1	Heterologe Expression von OsAKT1 in HEK293 Zellen	42
2.9.1.1	Kultivierung von HEK293-Zellen	42
2.9.1.2	Transfektion von HEK293-Zellen nach der Calciumphosphat-Methode	43
2.9.1.3	Vorbereitung der HEK293-Zellen für elektrophysiologische Messungen	44
2.9.1.4	Patch-Clamp-Technik an HEK293-Zellen.....	44
2.9.2	<i>In Vivo</i> - Messungen an Wurzelprotoplasten aus <i>Oryza sativa</i>	45
2.9.2.1	Isolierung von Wurzelhaarprotoplasten	45
2.9.2.2	Patch-Clamp-Technik an Wurzelprotoplasten aus <i>Oryza sativa</i> ..	45
3	Ergebnisse.....	47
3.1	Einfluss phototroper Stimulation auf die Auxinverteilung und Expression von ZMK1 in Maiskoleoptilen	47
3.1.1	Differentielle Expression von <i>ZMK1</i> während des Phototropismus	47
3.1.2	Differentielle Expression von <i>ZMK1</i> während der Photostimulation „ohne Schwerkraft“	48
3.1.3	Zeitlich und räumlich aufgelöste IAA-Umverteilung in phototrop stimulierten Koleoptilen.....	51
3.1.4	Lokalisation der <i>ZMK1</i> -mRNA-Umverteilung innerhalb der Koleoptile	54
3.1.5	Zeitabhängige differentielle Expression von <i>ZMK1</i> unter verschiedenen Schwerkraftbedingungen.....	56
3.2	Charakterisierung von OsAKT1 aus Reis	58
3.2.1	Klonierung von <i>OsAKT1</i>	58
3.2.2	Lokalisation der <i>OsAKT1</i> -Transkripte.....	60

3.2.3	Regulation der <i>OsAKT1</i> -Expression durch Auxin	61
3.2.4	Elektrophysiologische Charakterisierung von <i>OsAKT1</i>	62
3.2.4.1	Funktionelle Expression von <i>OsAKT1</i> in HEK293-Zellen	62
3.2.4.2	<i>In vivo</i> Kaliumströme in Reis-Wurzelprotoplasten.....	65
3.2.5	Regulation des Wachstums und der <i>OsAKT1</i> -Aktivität durch Salzstress.	67
3.2.5.1	Auswirkungen von Salzstress auf das Wachstum und die Ionenhomöostase	67
3.2.5.2	Regulation der <i>OsAKT1</i> -Expression durch Salzstress.....	69
3.2.5.3	Kaliumeinwärtsströme in Protoplasten salzgestresster Wurzeln...	70
4	Diskussion.....	73
4.1	Bedeutung von <i>ZMK1</i> für die Zellstreckung während des Phototropismus .	73
4.1.1	Umverteilung von IAA und differentielle Expression von <i>ZMK1</i>	74
4.1.2	Differentielle Expression von <i>ZMK1</i> unter verschiedenen Schwerkraftbedingungen.....	75
4.1.3	Modell zur phototropen Krümmung der Maiskoleoptile	77
4.2	Charakterisierung von <i>OsAKT1</i>	79
4.2.1	Expressionsanalysen	79
4.2.2	Biophysikalische Analyse.....	80
4.2.3	Bedeutung von <i>OsAKT1</i> für die Kaliumhomöostase unter Salzstress .	81
4.2.3.1	Wege der Natriumaufnahme in die Zelle	83
4.2.3.2	Wege des Natriumexports aus dem Cytosol.....	85
4.2.3.3	Regulation der <i>OsAKT1</i> -vermittelten Kaliumaufnahme unter Salzstress	86
5	Zusammenfassung.....	89
6	Summary.....	91
7	Literaturverzeichnis	93

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
μ	Mikro-
1-NAA	1-naphthaleneacetic acid
2,4-D	2,4-Dichlorphenoxyessigsäure
ABC	ATP-binding-cassette (Transporter mit ATP-Bindemotiv)
ABP1	engl.: auxin binding protein 1
AKT1	<i>Arabidopsis thaliana</i> K⁺-transporter 1
ARF1	engl.: auxin response factor 1
ASK1	<i>Arabidopsis thaliana</i> SKP1-ähnliches Protein 1
At...	<i>Arabidopsis thaliana</i> ...
AtKC1	engl.: <i>Arabidopsis thaliana</i> K⁺ channel 1
ATP	Adenosintriphosphat
AUX/IAA	Auxin/IAA-Gen
AUX1	Auxin-Influx-Carrier 1
AuxRE	engl.: auxin-responsive element
AXR1	engl.: auxin-resistance protein 1
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-Indolylphosphat
BLC	engl.: blue light cyclor
bp	Basenpaare
BSA	engl.: bovine serum albumin
C	Cytosin
CaM	Calmodulin
cDNA	engl.: copy-DNA (DNA-Kopie einer mRNA)
CNGC	engl.: cyclic-nucleotide-gated channel
COP9	engl.: constitutive photomorphogenic
CUL1	Cullin 1
DBD	engl.: DNA-binding-domain
dCTP	Deoxycytidintriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	engl.: desoxyribonucleic acid
dNTP	Desoxy-Nukleotid-Triphosphat
dT	Deoxythymidin
DTT	Dithiothreitol
E.coli	<i>Escherichia coli</i>
ECR1	engl.: E1 C-terminus-related
EDTA	engl.: ethylendiaminetetraacetic acid
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FG	Frischgewicht
fw	engl.: forward (vorwärts, für 5'-3'-Primer)
G	Guanin

GC-MS	Gas chromatographie- Massen spektrometrie
GFP	engl.: green fluorescent protein
HAK	engl.: high-affinity-K⁺-transporter
HEK293	engl.: human embryonal kidney 293 (menschliche embryonale Nieren-zellen, Linie 293)
HKT1	engl.: high-affinity-K⁺-transporter 1
IAA	engl.: indole-3-acetic acid
ICP-OES	engl.: inductively coupled plasma optical emission spectroscopy
KAT1,2	K⁺-Kanal <i>Arabidopsis thaliana</i> 1,2
kb	Kilobasen
kD	Kilodalton
KDC1	K⁺-Transporter <i>Daucus carota</i> 1
KST1	K⁺ Kanal <i>Solanum tuberosum</i> 1
KT	K⁺-Transporter
KUP	engl.: K⁺-uptake-transporter
l	Liter
LAX	engl.: like AUX1 (AUX1-ähnliche Carrier)
LCT1	engl.: low affinity cation transporter 1
LED	Licht-emittierende Diode
LKT1	<i>Lycopersicon esculentum</i> K⁺-transporter 1
M	Molar
m	Milli-
Mc...	<i>Mesembryanthemum crystallinum</i>...
MDR1	engl.: multidrug-resistance 1
min	Minute
MR	Mittlere Region
mRNA	engl.: messenger-RNA
MRP	engl.: MDR1-related protein
MS	Murashige und Skoog
n	Nano-
NBT	Nitroblautetrazoliumchlorid
NHX	engl.: Na⁺/H⁺-exchanger (Na ⁺ /H ⁺ -Antiporter)
NPA	engl.: 1-N-naphthylphthalamic acid
Oligo (dT)	Oligo Deoxythymidin
Os...	<i>Oryza sativa</i>...
p	Piko-
PAT	Polarer Auxintransport
PCR	engl.: polymerase chain reaction
PHOT1	Phototropin 1
PIN	pin-shaped
PiPP	engl.: pulse-induced-positive phototropism
Poly (A)+	Poly-Adenin
RBX1	RING-box Protein 1

RCE1	engl.: RUB1-conjugating enzyme 1
rev	engl.: reverse (rückwärts, für 3'-5'-Primer)
RNA	engl.: ribonucleic acid
RNase	Ribonuklease
rpm	engl.: rotations per minute
RT	1. Raumtemperatur 2. Reverse Transkription / Reverse Transkriptase
RUB1	engl.: related to ubiquitin 1
s	Sekunde
SAUR	engl.: small auxin upregulated RNA
SCF	SKP1/CUL1/F-Box (multimerer Enzymkomplex aus den genannten Untereinheiten)
SDS	engl.: sodium-dodecylsulphate
SF	Standardfehler
SKP1	engl.: suppressor of kinetochore protein 1
SKT1	Solanum tuberosum K⁺-Transporter 1
SOS1,2,3	engl.: salt-overly-sensitive 1,2,3
SPIK	engl.: Shaker pollen inward K⁺ channel
T	Thymidin
TA	Thymin-Adenin
Ta...	<i>Triticum aestivum...</i>
TDP	engl.: time-dependent phototropism
TEA	Tetraethylammonium
TEMED	N,N,N,N –Tetramethyl-Ethylendiamin
TIR1	engl.: transport inhibitor response 1
U	Uracil
U (Enzyme)	engl.: unit (Einheit für Enzymaktivitäten)
V	Volt
XET	Xyloglukan-Endo-Transglykosylase
ZMK1,2	Zea mays K⁺-Kanal 1,2

1 Einleitung

1.1 Auxinreguliertes Streckungswachstum

Das Phytohormon Auxin spielt eine so entscheidende Rolle bei einer Vielzahl von pflanzlichen Wachstums- und Entwicklungsprozessen, dass bereits gemutmaßt wurde, die Abkürzung für das in Pflanzen wichtigste Auxin IAA (Indole-3-acetic acid, Indolessigsäure) bedeute in Wirklichkeit "influences almost anything" (Weijers und Jürgens, 2004). In der Tat ist die Beteiligung dieses Phytohormons an so verschiedenen Vorgängen wie der Bestimmung der Embryonalachse während der frühen pflanzlichen Entwicklung (Weijers und Jürgens, 2005), der Aufrechterhaltung der Apikaldominanz (Ward und Leyser, 2004), der Differenzierung der Leitgewebe (Fukuda, 1997), der Regulation der Zellteilungsaktivität während des Wurzelwachstums (Dörner, 2000) und der differentiellen Zellstreckung während der gravitropen Krümmung der Wurzel (Rosen, 1999) beschrieben worden.

Bereits Ende des 19. Jahrhunderts wurde durch Untersuchungen zum differentiellen Zellstreckungswachstum die Forschung an auxinregulierten Wachstumsprozessen eingeleitet: Charles Darwin und sein Sohn Francis folgerten aus den Ergebnissen ihrer Studien zum Phototropismus in Graskeimlingen, dass ein Signalmolekül in der Spitze photostimulierter Graskeimlinge gebildet und ungleichmäßig in den beiden Flanken verteilt werde und auf diese Weise das differentielle Streckungswachstum der Zellen reguliere (Darwin, 1880). Fast fünfzig Jahre später zeigten Went und Cholodny, dass es sich bei diesem Signalstoff um das Phytohormon Auxin handelt, das in Reaktion auf die einseitige Belichtung der Koleoptile verstärkt auf die Schattenseite transportiert wird und dort die Zellstreckung stimuliert, so dass sich die Pflanze zur Lichtquelle krümmt (Cholodny, 1928; Went, 1928). Sie folgerten also, dass die ungleichmäßige Verteilung des in der Spitze synthetisierten "wachstumsbeschleunigenden Stoffes" für das differentielle Zellwachstum und somit die Krümmungsbewegung sowohl während des Gravitropismus als auch des Phototropismus der Graskoleoptile verantwortlich sei (Went und Thimann, 1937). Parker und Briggs (1990) und Iino (1991) bestätigten später diese als "Cholodny-Went-Hypothese" bezeichnete Annahme. Während die Umverteilung endogenen Auxins in phototrop stimulierten Pflanzen fast ausschließlich in der Koleoptilenspitze stattfindet, wird in gravitrop gereizten Keimlingen IAA über die gesamte Länge der Koleoptile auf die Unterseite transportiert (Iino, 1995). So ist beispielsweise in

Maiskeimlingen bereits 5 min nach dem Einsetzen des Gravistimulus eine Erhöhung der Auxinkonzentration in der Sprossspitze zu beobachten. 15 min nach dem Beginn der Gravistimulation wurde bereits eine Umverteilung endogenen Auxins in der äußersten Koleoptilenspitze gemessen, die sich im weiteren Verlauf auf die gesamte Länge der Koleoptile erstreckte (Abb. 1, Philippar, 1999b).

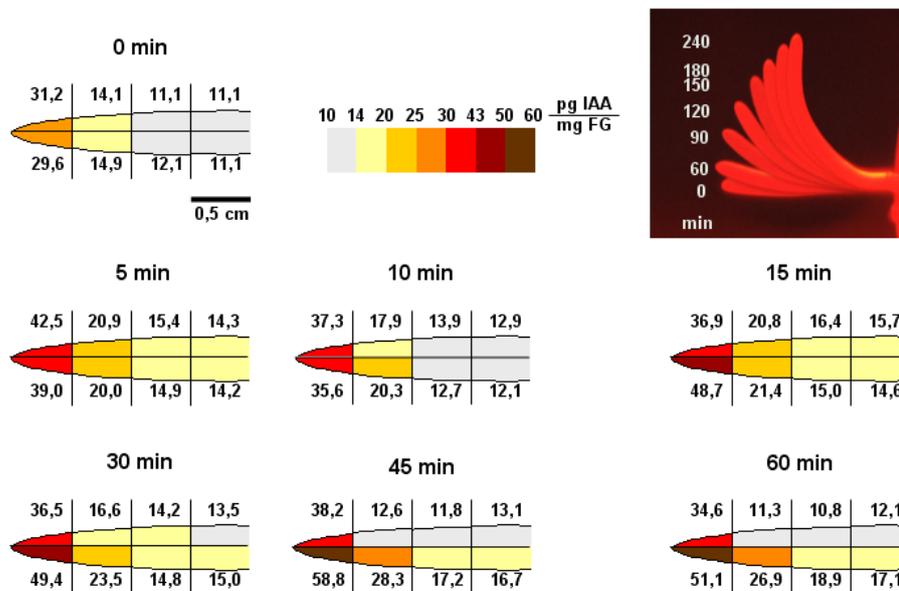


Abb. 1. Zeitlich und räumlich aufgelöste Auxinumverteilung in gravitrop stimulierten Koleoptilen, nach Philippar (1999).

IAA-Konzentration in 0,5 cm langen Segmenten halbierteter Koleoptilen 0, 5, 10, 15, 30, 45 und 60 min nach dem Einsetzen des Gravistimulus. Bereiche unterschiedlicher IAA-Konzentrationen sind farbig hervorgehoben (s. Farbverlaufsstreifen). Die Auxinkonzentration ist in $\mu\text{g IAA/mg Frischgewicht (FG)}$ angegeben.

Bereits Anfang der 80er Jahre wurde beschrieben, dass in Reaktion auf einen tropistischen Reiz einhergehend mit der Umverteilung der IAA auch pH-Änderungen im Apoplasten der gegenüberliegenden Sprosshälften auftreten. Dabei zeigte sich, dass in der stärker wachsenden, durch eine höhere Auxinkonzentration charakterisierten Koleoptilhälfte die Konzentration an apoplastischen Protonen ansteigt (Mulkey, 1981). Dies steht im Einklang mit der von Hager 1971 aufgestellten "Acid growth Hypothese" des säureinduzierten Wachstums. Diese besagt, dass als Voraussetzung für das auxininduzierte Streckungswachstum zunächst H^+ -ATPasen in der Plasmamembran aktiviert werden müssen, die Protonen in den extrazellulären Raum pumpen. Durch die Ansäuerung des Apoplasten werden dort Enzyme aktiviert, welche die Plastizität der Zellwand erhöhen. Die gesteigerte Dehnbarkeit der

Zellwand ermöglicht die Aufnahme von Kaliumsalzen und Wasser in die Zelle und führt somit über eine Erhöhung des Turgordrucks zur Streckung der Zelle. Tatsächlich wurde in Schließzellen von *Vicia faba* gezeigt, dass die Behandlung mit dem synthetischen, aber physiologisch wirksamen Auxin 2,4-D (2,4-Dichlorphenoxyessigsäure) zu einer Aktivierung der Plasmamembran- H^+ -ATPase und einer damit verbundenen Hyperpolarisation der Membranspannung führt (Lohse und Hedrich, 1992). In Maiskoleoptilen wurde ebenfalls neben einer Aktivierung der Protonenpumpe auch die Erhöhung der Dichte der H^+ -ATPasen in der Plasmamembran als Antwort auf die Zugabe von IAA festgestellt (Felle, 1991; Frias, 1996, zusammengefasst in Becker und Hedrich, 2002). Auch zellwandlockernde Enzyme, die Expansine, sind bereits gefunden worden. Es handelt sich hierbei um katalytische, säureaktivierte Proteine, die vermutlich die Bindungen zwischen Zellulose- und Hemizellulosefibrillen auflockern (zusammengefasst in Cosgrove, 2000). Interessanterweise wird auch die Expression einiger Expansine durch Auxine reguliert (Catala, 2000; Hutchison, 1999). Auch XETs (Xyloglucan-Endo-Transglykosylasen) können die Zellwand lockern, indem sie die Länge der die Zellulose vernetzenden Hemizellulosestränge verändern. Für ein XET, das im Hypokotyl von Tomaten exprimiert wird, konnte ebenfalls bereits die transkriptionelle Regulation durch das Auxin 2,4-D gezeigt werden (Catala, 1997).

Eine weitere Voraussetzung für das Streckungswachstum pflanzlicher Zellen ist die Aufnahme osmotisch aktiver Substanzen, um den Turgordruck aufrechterhalten zu können. Darüber hinaus müssen im Austausch zu nach außen gepumpten Protonen Kationen ins Zellinnere transportiert werden, um den Ladungsausgleich herzustellen. In Pflanzen kommen hierfür hauptsächlich Kaliumionen in Betracht, da sie den Hauptteil der in Pflanzen vorliegenden Kationen ausmachen (Marschner, 1995). Im Mais hängt das auxininduzierte Streckungswachstum von Koleoptilsegmenten sowohl von der Verfügbarkeit von Kaliumionen im Außenmedium als auch von deren Aufnahme in die auxin-sensitiven Zellen ab (Claussen, 1997). So konnte die durch das synthetische Auxin 1-NAA (1-Naphthalineacetic acid, 1-Naphthalinessigsäure) hervorgerufene Zellstreckung durch die Abwesenheit von Kalium oder den Einsatz von Kaliumkanalblockern wie TEA^+ (Tetra-ethyl-ammonium) und Cs^+ verhindert werden. Basierend auf diesen Erkenntnissen überprüften Philippar *et al.* (1999), ob der in der Maiskoleoptile exprimierte einwärtsgerichtete Kaliumkanal ZMK1 an der K^+ -Aufnahme

während des auxininduzierten Streckungswachstums beteiligt ist. Dabei wurde erstmals gezeigt, dass die Aktivität des ZMK1-Kanals durch extrazelluläre Protonen gesteigert wird und dass physiologisch aktive Auxine die Transkription des *ZMK1*-Gens induzieren. Letzteres führt schließlich zu einer Erhöhung der ZMK1-Kanaldichte in der Plasmamembran der Koleoptilzellen, so dass angenommen werden kann, dass dieses Transportprotein für die Kaliumaufnahme während der auxininduzierten Zellstreckung verantwortlich ist. Übereinstimmend mit der Cholodny-Went-Hypothese wurde in derselben Arbeit nachgewiesen, dass die Expression von *ZMK1* der Umverteilung endogenen Auxins während der gravitropen Krümmungsreaktion folgt und dieser Kanal somit wahrscheinlich an der Regulation des differentiellen Wachstums der beiden Koleoptilflanken beteiligt ist. Auch in der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* wird die Expression zweier einwärtsgerichteter Kaliumkanäle durch die Behandlung mit den physiologisch aktiven Auxinen IAA und 1-NAA induziert (Philippar, 2004). Während KAT1 am Streckungswachstum etiolierter Hypokotyle beteiligt ist, scheint KAT2 eher eine Rolle bei der auxinregulierten Zellteilung und der Ausbildung des Leitgewebesystems zu spielen.

Zusammenfassend lässt sich folgendes Modell zum zeitlichen Ablauf des unter anderem durch ZMK1 vermittelten auxininduzierten Streckungswachstums darstellen (Abb. 2): Während einer anfänglichen Verzögerungsphase von ca. 15 min erfolgt die Wahrnehmung und Weiterleitung des Auxinsignals, die Transkription auxinregulierter Gene beginnt. Basierend auf der Aktivierung der H^+ -ATPase kommt es zu einer Ansäuerung des Apoplasten sowie einer Hyperpolarisierung des Membranpotentials. Beide Faktoren bewirken die Aktivierung bereits in der Membran vorliegender spannungsabhängiger, protonenaktivierter K^+ -Einwärtsgleichrichter. Somit wird der initiale Anstieg der Wachstumsrate sehr wahrscheinlich durch die Aktivität der H^+ -ATPase und bereits vorhandener ZMK1-Kanalproteine bestimmt. Längerfristig gesehen ist der Einbau weiterer Membrankomponenten (Pumpen, Kanäle, Lipide) in die Plasmamembran nötig, um die erhöhte Wachstumsrate über längere Zeit aufrecht zu erhalten. Etwa 30 min nach dem Einsetzen des Auxinsignals ist beispielsweise ein Anstieg der *ZMK1*-Transkriptmenge zu verzeichnen, der im weiteren Verlauf zur Erhöhung der ZMK1-Dichte in der Plasmamembran führt. Auch die verstärkte Expression der H^+ -ATPase und die Zunahme des entsprechenden

Proteins in der Plasmamembran sind als Ausdruck der Anpassung der Zelle an verstärktes Zellstreckungswachstum zu verstehen.

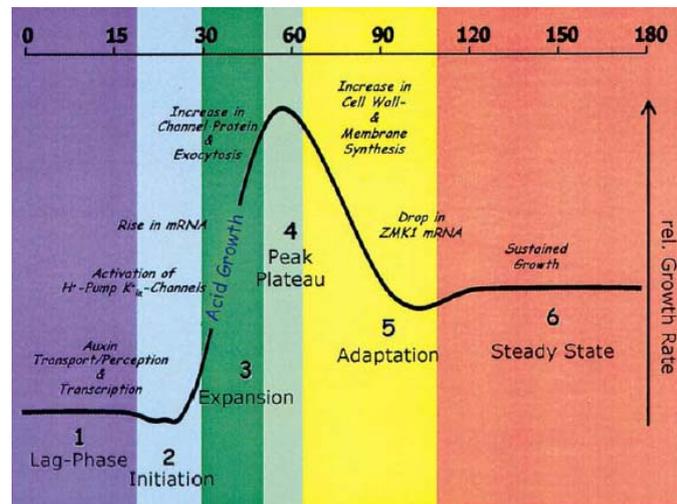


Abb. 2. Zeitlicher Ablauf der Vorgänge während des auxininduzierten Streckungswachstums von Maiskoleptilen (nach Becker und Hedrich, 2002).

Der initiale Anstieg der Wachstumsrate wird durch die Aktivierung der Plasmamembran-H⁺-ATPase, die hierdurch bedingte Hyperpolarisierung des Membranpotentials, die Ansäuerung des Apoplasten und schließlich die Aktivierung spannungsabhängiger K⁺-Einwärtsgleichrichter und somit der Kaliumaufnahme in die Zelle ausgelöst. Um auch längerfristig eine erhöhte Wachstumsrate aufrecht zu erhalten, muss die Dichte der Pumpen und Kanäle und die Synthese von Membran- und Zellwandkomponenten erhöht werden.

1.2 Auxintransport

IAA, das wichtigste in Pflanzen natürlich vorkommende Auxin wird hauptsächlich in stark wachsenden Teilen der Pflanze wie dem Sprossapex, jungen Blättern und sich entwickelnden Samen synthetisiert, obgleich bereits gezeigt wurde, dass nahezu jedes pflanzliche Gewebe prinzipiell zur IAA-Synthese in der Lage ist (Ljung, 2001b; Ljung, 2001a). Die freie Indoleessigsäure stellt das physiologisch wirksame Auxin dar. Die Kontrolle der Menge an tatsächlich zur Verfügung stehender IAA erfolgt über die Konjugierung von IAA z.B. an Aminosäuren oder Zucker und die erneute Freisetzung aus solchen Konjugaten (Campanella, 2004; Ljung, 2002 und Referenzen darin).

Der Transport von Auxinen vom Ort ihrer Synthese bzw. Freisetzung zum Ort ihrer Wirkung findet prinzipiell auf zwei Wegen statt: Der schnelle, über lange Strecken ablaufende Transport erfolgt im Leitgewebe, während der langsamere, gerichtete, sog. polare Auxintransport (PAT) hauptsächlich in nichtvaskulären Geweben wie beispielsweise der Epidermis von Maiskoleptilen beobachtet werden kann (Jones, 1990). Im Phloem werden hauptsächlich konjugierte Auxine mit einer

Geschwindigkeit von ca. 5-20 cm/h transportiert, während im PAT, der hauptsächlich vom Sprossapex zur Wurzel hin erfolgt, nur freie IAA mit einer Geschwindigkeit von ca. 5-20 mm/h von Zelle zu Zelle transportiert wird (Friml und Palme, 2002; Lomax, 1995). Untersuchungen, in denen der polare Transport von IAA mit Hilfe von Inhibitoren blockiert wurde beweisen, dass der gerichtete Auxintransport ein notwendiges Signal für Wachstums- und Entwicklungsprozesse in Pflanzen darstellt. So ist der PAT zum Beispiel wichtig für die Etablierung der Bilateralsymmetrie in sich entwickelnden Embryonen (Liu, 1993), die Bildung von Seitenwurzeln (Reed, 1998) und für die gravitrope Krümmung von Wurzeln (Parry, 2001; Rashotte, 2000).

Die Erkenntnis, dass der polare Auxintransport Energie benötigt und durch Inhibitoren der Proteinsynthese gestört werden kann, führte Mitte der 70er Jahre zur Formulierung der sog. "Chemiosmotischen Hypothese" (Raven, 1975; Rubery und Sheldrake, 1974). Da IAA im Apoplasten aufgrund der dort hohen H^+ -Konzentration (ca. pH 5,5) in der protonierten Form vorliegt, kann das Hormon als ungeladenes Molekül durch die Plasmamembran diffundieren. Im Cytoplasma (ca. pH 7) wird sie deprotoniert und als nunmehr negativ geladenes Molekül im Zellinneren festgehalten. Daher wurde im Rahmen dieser Hypothese die Existenz von Membranproteinen gefordert, welche den Export von IAA aus der Zelle vermitteln. Die Richtung des PAT sollte demzufolge durch die subzellulär asymmetrische Verteilung von Auxintransportern bestimmt werden. Neben der möglichen freien Diffusion der IAA wurde zusätzlich ein Carrier-vermittelter Auxin-Import in die Zelle postuliert (zusammengefasst in Friml und Palme, 2002). Tatsächlich wurden entsprechend polar verteilte Proteine identifiziert, die vermutlich für den Transport von IAA über die Plasmamembran zuständig sind, obgleich deren Transportaktivität bislang noch in keinem Fall zweifelsfrei nachgewiesen werden konnte. Als potentielle IAA-Influx-Carrier gelten Proteine der AUX/LAX-Familie (Bennett, 1996; Swarup, 2000), als Auswärtscarrier werden zur Zeit Proteine der PIN-Familie diskutiert (Friml, 2003; Palme und Gälweiler, 1999). Zudem wurden vor kurzem Proteine der ABC-Transporter-Familie (ATP-binding-cassette) mit dem Transport von Auxin in Verbindung gebracht.

Als Auxin-Aufnahmesysteme kommen Proteine der AUX/LAX-Familie in Frage. Das *AUX1*-Gen kodiert für ein 485 Aminosäuren langes Protein mit Homologie zu bereits bekannten Aminosäurepermeasen (Bennett, 1996). In *aux1*-Mutanten, die durch verringerte IAA-Aufnahme in die Wurzel und agravitropes Wachstum gekennzeichnet

sind, führte die Zugabe des membrangängigen Auxins 1-NAA dazu, dass die Pflanzen wieder gravitrop reagierten. Durch die schlechter membranpermeablen Auxine IAA oder 2,4-D konnte der agravitrope Phänotyp nicht komplementiert werden, was dafür spricht, dass in der *aux1*-Mutante eine für die IAA-Aufnahme in die Zelle wichtige Komponente verloren gegangen ist (Marchant, 1999). Zudem kann der Phänotyp der *aux1*-Mutante im Wildtyp dadurch kopiert werden, dass die Pflanzen mit Auxin-Influx-Inhibitoren behandelt werden, ein weiteres Indiz für die Funktion von AUX1 als IAA-Influx Carrier (Parry, 2001). Mit Hilfe von fluoreszenzmarkierten Antikörpern konnte das AUX1-Protein sowohl in der Stele, als auch in Columella und seitlicher Wurzelhaube der Wurzelspitze lokalisiert werden (Abb. 3a und 3b; Swarup, 2001). Die polare Lokalisation an der basalen Membran von Protophloemzellen (Abb. 3c), genau entgegengesetzt zum putativen IAA-Efflux Carrier PIN1 (Abb. 3d), spricht dafür, dass AUX1 an der Auxinentladung des Phloems und der Beladung des Apikalmeristems mit IAA beteiligt ist, wodurch eine Verbindung zwischen polarem und nichtpolarem Auxintransport möglich erscheint.

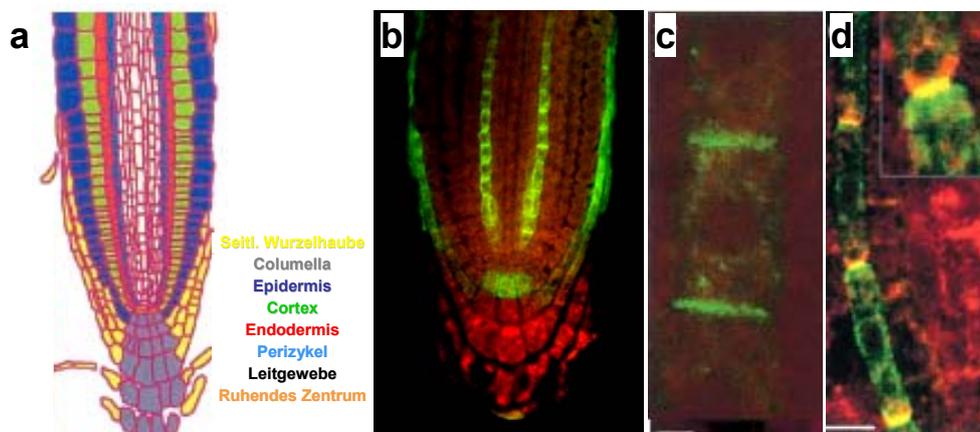


Abb. 3. Lokalisation von AUX1 in Columella, seitlicher Wurzelhaube und Leitgewebe (nach Swarup, 2001).

(a) Schematische Darstellung der Gewebe in der Wurzelspitze von *Arabidopsis*. (b) Immunolokalisation des mit Hämagglutinin (HA) markierten AUX1-Proteins mit Hilfe eines grün fluoreszierenden sek. Antikörpers. (c) Asymmetrische Lokalisation von HA-AUX1 im Protophloem. Die Immunfluoreszenz ist nur an der Oberseite der Zellen zu sehen. (d) Gleichzeitige Immunlokalisation von AUX1 (gelb) und AtPIN1(rot) in einer Zellreihe des Protophloems. Es ist deutlich zu erkennen, dass AUX1 in der Oberseite und PIN1 in der Unterseite der entsprechenden Zellen detektiert wird.

Als potentieller IAA-Efflux-Transporter wurde zunächst AtPIN1 beschrieben, der durch *in situ*-Hybridisierung in Zellen des Xylemparenchyms und im Kambium der Infloreszenzachse lokalisiert werden konnte (Gälweiler, 1998). Das entsprechende

Gen kodiert für ein 622 Aminosäuren großes Protein mit Sequenzähnlichkeiten zu bekannten bakteriellen und eukaryontischen Transportern. Punktmutationen im *PIN1*-Gen führen zu einem auffälligen "nadelförmigen" Wachstumsphänotyp der entsprechenden Pflanzen mit nackter, blattloser Infloreszenz, was dieser Carrier-Familie ihren Namen verlieh (engl. pin = Nadel). Der gleiche Phänotyp wurde in Wildtyp-Pflanzen durch die Behandlung mit dem Auxin-Transport-Inhibitor NPA hervorgerufen, ein weiterer Hinweis auf die potenzielle Funktion von PIN1 im Auxintransport. Zudem wiesen *pin1*-Mutanten eine drastische Reduktion des basipetalen IAA-Transport auf (Okada, 1991).

In Einklang mit der chemiosmotischen Hypothese konnte für PIN1 bereits die asymmetrische Lokalisation des Proteins am basalen Zellende gezeigt werden (Gälweiler, 1998). In den folgenden Jahren wurden weitere Mitglieder der PIN-Familie identifiziert (Friml, 2002a; Friml, 2002b; Müller, 1998). Im Gegensatz zu PIN1, der hauptsächlich im Leitgewebe lokalisiert ist, befinden sich PIN2, PIN3 und PIN4 in meristematischen Geweben (s. Abb. 4).

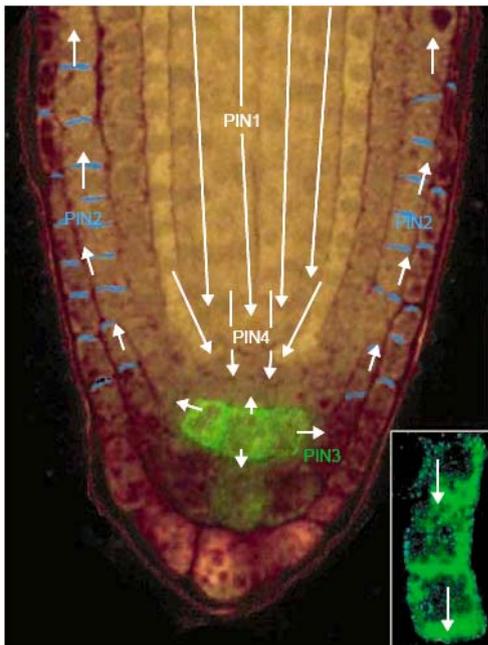


Abb 4. Immunolokalisation von PIN3 in der Wurzelspitze von Arabidopsis (Friml, 2003).

PIN3 ist in den Zellen der Columella symmetrisch angeordnet und vermittelt vermutlich den Transport von Auxin in alle Teile der Wurzelhaube. Auxin wird in der seitlichen Wurzelspitze durch PIN2 basipetal transportiert (die Lokalisation von PIN2 an der Oberseite der Zellen ist in blau dargestellt). Über PIN1 und PIN4 findet vermutlich die Versorgung der Wurzelspitze mit IAA statt. Der Auxinfluss ist durch weiße Pfeile dargestellt.

Wird die Wurzel um 90° gedreht, verlagert sich PIN3 in die untere Seite der entsprechenden Zellen (kleines Bild) und vermittelt so möglicherweise die Verschiebung von IAA in die Unterseite.

Alle bislang beschriebenen PIN-Carrier sind innerhalb der Zelle polar angeordnet: PIN2 ist am apikalen Ende von Zellen der Epidermis und seitlicher Wurzelhaube und am basalen Ende kortikaler Zellen lokalisiert (Blilou, 2005; Müller, 1998), PIN3 befindet sich an der basalen Seite vaskulärer Zellen und in Zellen des Perizykels. Außerdem wurde die symmetrische Verteilung von PIN3 in Zellen der Columella

nachgewiesen. Erst die gravitrope Stimulation der Wurzel führte zu einer sehr schnellen Umorientierung des PIN3-Proteins in die nun basale Membran der Zelle (Friml, 2002b; s. Abb 4). Es ist daher durchaus anzunehmen, dass PIN3 an der Auxinumverteilung in gravistimulierten Wurzelspitzen beteiligt ist. Die schnelle subzelluläre Relokalisation wird möglicherweise durch die Verschiebung von Membranvesikeln zwischen der Plasmamembran und endosomalen Kompartimenten entlang des Aktinzytoskeletts erreicht. Eine solcher Transport in Vesikeln wurde zumindest für PIN1 und PIN3 beschrieben (Friml, 2002b; Geldner, 2001). PIN4 befindet sich im Bereich des ruhenden Zentrums und basal in provaskulären Zellen (Friml, 2002a). PIN7 schließlich wurde in der Columella und am seitlichen und basalen Ende provaskulärer Zellen lokalisiert (Blilou, 2005). Die polare Lokalisation der PIN-Proteine innerhalb der Zelle und ihre teilweise überlappende Anordnung in der Wurzelspitze lassen den Schluss zu, dass diese Transporter gemeinsam die Richtung des Auxinflusses in der Wurzel und somit die Zellteilung und –streckung sowie das differentielle Wachstum während tropistischer Krümmungsreaktionen steuern.

In letzter Zeit werden zudem Proteine der ABC-Transporter-Familie (ATP-binding-cassette) als Auxin-Efflux-Carrier diskutiert. ABC-Proteine vermitteln sowohl in Eukaryoten als auch in Prokaryoten die ATP-abhängige, also "aktive", Beseitigung verschiedener Substanzen aus dem Cytosol, so dass ihnen in Säugetieren auch eine Rolle für die Detoxifikation der Zellen zugesprochen wird (Ambudkar, 1999). Die Überexpression bestimmter ABC-Transporter könnte in Tumorgewebe beispielsweise für das Ausschleusen von Zytostatika aus der Zelle und somit für die Resistenz gegen chemotherapeutische Maßnahmen verantwortlich sein (Gottesman, 2002). Auch in Pflanzen wurden bereits ABC-Transporter identifiziert, welche sich aufgrund ihrer Struktur in zwei Klassen einteilen lassen: MDR (multidrug resistance) und MRP-Proteine (multidrug resistance-related proteins). In Analogie zum tierischen System sorgen auch in Pflanzen bestimmte ABC-Proteine für die Entgiftung der Zelle, indem sie mit Glutathion konjugierte Xenobiotika in die Vakuole transportieren (Martinoia, 1993). Anderen pflanzlichen ABC-Transportern, AtMRP4 und AtMRP5, wurde eine Rolle in der Regulation der Aktivität von Ionenkanälen während der Stomaöffnung nachgesagt (Gädeke, 2001; Klein, 2004). Zudem wiesen *atmrp5*-Verlustmutanten ein verringertes Wurzelwachstum, gesteigerte Bildung von Seitenwurzeln und höhere Auxinkonzentrationen in der Wurzel auf, was zu der

Hypothese führte, dass AtMRP5 am Transport von Auxinkonjugaten in die Vakuole und somit an einer Reduktion des Gehalts an freier IAA im Cytosol beteiligt sein könnte (Gädeke, 2001). Ein weiterer Hinweis auf die potenzielle Funktion von ABC-Transportern im PAT ergab sich durch die Feststellung, dass der Verlust zweier eng verwandter MDR-Proteine in der *atpgp1/atmdr1*-Doppelmutante in *Arabidopsis thaliana* zu einer starken Reduktion des basipetalen Auxintransports führte (Noh, 2001). Zudem wurde in derselben Arbeit gezeigt, dass der PAT-Inhibitor NPA (1-naphthyl-phthalamic acid) von AtMDR1 gebunden wird, was ebenfalls auf eine Beteiligung dieses Proteins am gerichteten Auxintransport hindeutet. Kurze Zeit später stellte man fest, dass in der *mdr1*-Mutante die subzelluläre Lokalisation des IAA-Efflux-Carriers PIN1 (s. später) verändert scheint (Noh, 2003). Die Autoren folgerten daher, dass der Auxintransport möglicherweise nicht über MDR1 selbst erfolgt, sondern dass die Aktivität von MDR1 für die korrekte Positionierung von PIN1 und somit für den gerichteten Efflux von Auxin erforderlich ist.

1.3 Perzeption des Auxinsignals

Die Suche nach einem Auxinrezeptor begann mit der Identifizierung von Auxin-bindenden Proteinen. Doch obwohl eine ganze Reihe solcher Proteine gefunden wurde, war es bis auf einen Fall nicht möglich, die entsprechenden Proteine als Rezeptoren zu charakterisieren, d.h., sie konnten nicht mit auxinregulierten Prozessen in Verbindung gebracht werden (Napier, 2002). Das am besten untersuchte Auxin-bindende Protein ist ABP1 (auxin binding protein1). Bereits 1972 wurde von Hertel, 1972 gezeigt, dass Membranfraktionen, die aus etiolierten Maiskoleoptilen gewonnen worden waren, die Fähigkeit hatten, ¹⁴C-markierte Auxine zu binden. 1985 gelang schließlich die Aufreinigung und Isolierung von ABP1 aus Maiskeimlingen (Löbler und Klämbt, 1985). Einige Jahre danach wurden die entsprechenden Gene aus Mais und *Arabidopsis* kloniert (Hesse, 1989; Palme, 1992) und viel später wurde ABP1 zusammen mit seinem Liganden 1-NAA kristallisiert (Woo, 2002). Studien an ABP1-überexprimierenden Pflanzen deuten darauf hin, dass ABP1 an der auxininduzierten Zellstreckung beteiligt ist (Chen, 2001a; Jones, 1998), während die *abp1*-Verlustmutante in *Arabidopsis* embryo-letal ist (Chen, 2001b). Die nachweisliche Beteiligung von ABP1 an auxinabhängigen Prozessen, wie der Stimulierung der PM-H⁺-ATPase (Barbier-Brygoo, 1989; Barbier-Brygoo, 1991; Rück, 1993), der Schließzellbewegung (Gehring, 1998) und der

Protoplastenschwellung (Christian, 2003; Steffens, 2001), stützt die Auxinrezeptor-Hypothese für dieses Protein. Zweifel an einer umfassenden, alleinigen Rezeptorfunktion von ABP1 resultieren aus der Beobachtung, dass ein Großteil des in der Zelle befindlichen ABP1-Proteins im ER lokalisiert ist und ein nur sehr geringer Anteil an der Plasmamembran nachgewiesen werden konnte (Henderson, 1997). Darüber hinaus deuten - jedoch nicht unumstrittene - elektrophysiologische Arbeiten auf die Funktion von ABP1 an der extrazellulären Seite der Plasmamembran hin (Barbier-Brygoo, 1989; Rück, 1993) und eine Verbindung zwischen der ABP1-Funktion und der Auxin-Wirkung bezüglich auxinregulierter Genexpression oder auxingesteuertem Proteinabbau (s. 1.4) konnte bislang nicht hergestellt werden. Demnach scheinen membrangebundene Proteine wie ABP1 nicht in Signalketten involviert zu sein, die zum Abbau der AUX/IAA-Transkriptionsfaktoren über deren Interaktion mit dem SCF^{TIR1}-Komplex führen (s. 1.4, Dharmasiri, 2003a). Man kann derzeit also aufgrund der Embryo-Letalität der Knockout-Pflanzen zwar davon ausgehen, dass es sich bei ABP1 um ein für Wachstum und Entwicklung der Pflanze essentielles Protein handelt, jedoch scheint es nur an einem Teil der auxinregulierten Vorgänge beteiligt zu sein. Es wäre daher durchaus denkbar, dass weitere, eventuell intrazellulär vorkommende, lösliche Proteine existieren, die als Auxinrezeptoren fungieren (Dharmasiri und Estelle, 2004). So wurde beispielsweise erst kürzlich in der Arbeitsgruppe von Mark Estelle entdeckt, dass das F-Box-Protein TIR1 (s. später) in der Lage ist, IAA zu binden und somit als intrazellulärer Auxinrezeptor in Frage kommt (M. Bennett, persönliche Mitteilung).

1.4 Regulation der Genexpression durch Auxin

Es ist seit längerem bekannt, dass durch Auxin die Transkription einer Reihe von Genen induziert wird. Die Gene, deren Expression sehr rasch nach der Applikation von Auxin gesteigert wird („early auxin response genes“), lassen sich drei Familien zuordnen: der AUX/IAA-, der GH3- und der SAUR-Familie (Abel und Theologis, 1996; Hagen und Guilfoyle, 2002). Während das GH3-Protein, das zuerst in Soja nachgewiesen werden konnte, stabil und im Cytosol lokalisiert ist (Wright, 1987), kodieren SAUR-Gene für kurze, instabile mRNAs, wovon sich auch deren Bezeichnung ableitet (Small auxin-upregulated RNAs, McClure und Guilfoyle, 1987). Die Transkription der SAURs folgt auch endogenen Auxingradienten, wie durch ihre Akkumulation in der Unterseite gravistimulierter Sojakeimlinge gezeigt wurde

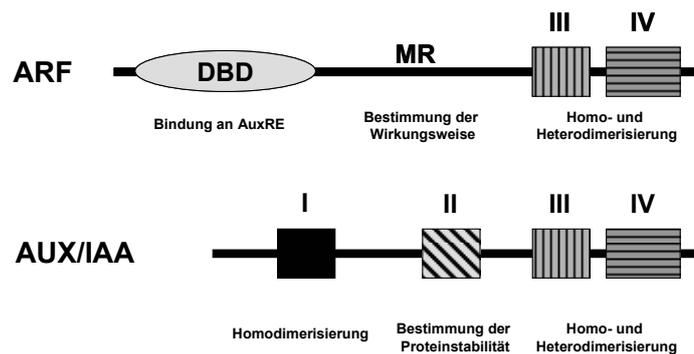
(McClure und Guilfoyle, 1989). SAURs sind kleine (10-20 kD), vermutlich kernlokalisierte Proteine mit einer sehr kurzen Halbwertszeit. ZmSAUR2 beispielsweise ist im Zellkern lokalisiert und weist eine Halbwertszeit von nur ca. 7 min auf (Knauss, 2003). Die Funktion der GH3- und der SAUR-Proteine ist bislang weitestgehend unbekannt. Erst kürzlich wurde jedoch festgestellt, dass einige GH3-verwandte Proteine in *Arabidopsis thaliana* für die Konjugation von IAA an Aminosäuren sorgen und somit an der Auxinhomöostase beteiligt sind (Staswick, 2005). In diesem Zusammenhang sollte erwähnt werden, dass in *Arabidopsis thaliana* die Expression einiger GH3-Proteine möglicherweise durch den Transkriptionsfaktor ARF17 (zu ARFs siehe unten) gehemmt wird (Sorin, 2005). Interessanterweise wird die Expression von ARF17 wiederum durch das microRNA-Molekül miR160 reguliert. In Pflanzen, in denen der Abbau von ARF17 durch miR160 unterbunden wird, sind die Transkripte von GH3.5 und GH3.6 verringert und die Pflanzen zeigen schwerwiegende Defekte in ihrer Entwicklung, was möglicherweise durch Änderungen in der Auxinhomöostase bedingt ist (Mallory, 2005). Für ZmSAUR1 und ZmSAUR2 konnte *in vitro* die Bindung an Calmodulin (CaM) gezeigt werden, so dass eine Rolle dieser Proteine im Crosstalk zwischen dem second messenger Calcium/CaM-System und der Auxinsignalkette postuliert wurde (Knauss, 2003; Yang und Poovaiah, 2000).

Die Funktion der dritten Klasse früher auxinregulierter Gene, der AUX/IAA-Familie hingegen ist erheblich besser untersucht. Es handelt sich hierbei um ebenfalls kurzlebige, kernlokalisierte Proteine, die als Transkriptionsfaktoren die Expression auxinregulierter Gene steuern (Ulmasov, 1997b). Allerdings binden AUX/IAAs nicht direkt an DNA, sondern beeinflussen die Expression auxinregulierter Gene durch ihre Interaktion mit ARF-Proteinen (Auxin response factors), einer weiteren Klasse von Transkriptionsfaktoren (Hagen und Guilfoyle, 2002). ARFs binden spezifisch an konservierte DNA-Sequenzen in der Promotorregion früher auxininduzierter Gene, wie bereits 1997 für ARF1 aus *Arabidopsis* gezeigt (Ulmasov, 1997a). Die hochkonservierten ARF-Bindestellen mit der Basenabfolge TGTCTC werden daher als AuxREs (Auxin response elements) bezeichnet (Guilfoyle, 1998). Auch im Promoterbereich des bereits erwähnten Kaliumkanalgens *ZMK1* befinden sich unter anderem ein sog. G-Box-Element und in unmittelbarer Nachbarschaft ein AuxRE, mögliche cis-Elemente der Auxin-Signalkette zu dessen transkriptioneller Aktivierung (Phillippar, 1999a; Phillippar, 2000). ARFs binden über eine N-terminale Domäne

(DNA binding domain, DBD; s. Abb 5) an AuxREs, wobei die Dimerisierung der ARFs die Auswirkungen dieser Interaktion noch verstärken dürfte (Berleth, 2004; Tiwari, 2003). ARFs können sowohl aktivierend als auch hemmend auf die Transkription wirken, wobei die Art der Wirkung von der Beschaffenheit der mittleren Region (MR) des Proteins abhängt. So fungieren ARFs mit Glutamin-reicher MR als Aktivatoren, während ARFs mit Prolin-, Serin- und Threonin-reichen MRs die Transkription der durch sie regulierten Gene hemmen (Guilfoyle und Hagen, 2001; Tiwari, 2003). Sowohl die Interaktion der ARFs mit AUX/IAA-Proteinen als auch deren Homodimerisierung erfolgt über die C-terminalen Domänen III und IV. Durch die Dimerisierung von ARFs mit AUX/IAA-Proteinen wird die Aktivität der ARF-Transkriptionsfaktoren gehemmt und somit die Genaktivität bestimmt. Durch die Bindung eines AUX/IAA Proteins an einen aktivierenden ARF wird die Transkription des zu regulierenden Gens gehemmt und umgekehrt.

Abb. 5 Struktur typischer Vertreter der ARF- bzw. AUX/IAA-Familie.

Beide Proteinfamilien zeigen hohe Homologien in ihren C-terminalen Bereichen III und IV, die zur Dimerisierung dienen. Die Funktion der einzelnen Regionen ist angegeben. DBD, DNA-bindende Domäne; MR, mittlere Region.



Derzeit geht man von folgendem Modell zur Regulation auxininduzierter Gene durch das Zusammenspiel von ARF- und AUX/IAA-Transkriptionsfaktoren aus (Abb. 6): Bei niedrigen Auxinkonzentrationen dimerisieren AUX/IAA-Proteine mit den ARF-Transkriptionsfaktoren, so dass die Transkription früher auxininduzierter Gene aktiv verhindert wird, obwohl ARFs über die DNA-bindende Domäne (DBD) an AuxREs im Promotor der zu regulierenden Gene gebunden sind. Steigt die Auxinkonzentration, werden die AUX/IAA-Proteine ubiquitinyliert und über das 26S-Proteasom abgebaut (s. unten), so dass die Dimerisierung mit ARFs aufgehoben und die transkriptionelle Aktivierung der betreffenden Gene ermöglicht wird. Diese Induktion könnte noch weiter verstärkt werden, indem ARFs mit bereits an AuxREs gebundenen ARFs Homodimere bilden. Es ist zu beachten, dass es sich im beschriebenen Fall um

ARFs handelt, die eine Glutamin-reiche mittlere Region aufweisen und somit als Aktivatoren wirken. In diesem Modell ist demzufolge sowohl die Bindung der ARFs an AuxREs als auch die Frage, ob ein ARF als Aktivator oder Repressor fungiert, unabhängig vom Auxinstatus der Zelle. Allein die Bildung bzw. Aufhebung der ARF-AUX/IAA-Heterodimere ist durch die Auxinkonzentration bestimmt und stellt den grundlegenden Mechanismus der auxinregulierten Genaktivierung dar (Tiwari, 2003).

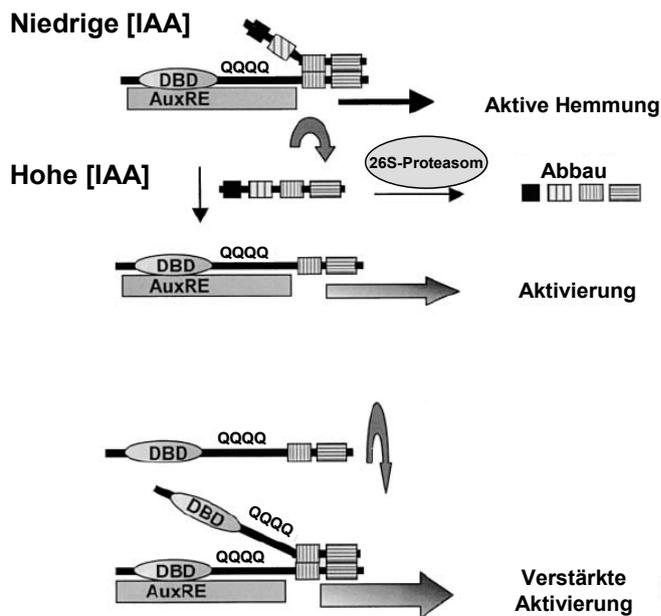


Abb. 6. Modell zur Repression und Aktivierung auxinregulierter Gene, modifiziert nach Tiwari (2003). Erläuterung der dargestellten Vorgänge im Text.

Der Abbau der AUX/IAA-Repressorproteine als Voraussetzung für die Aktivierung auxininduzierter Gene erfolgt über den Ubiquitin-Proteasom-Weg. Dieser Weg des Proteinabbaus ist unter Eukaryoten weit verbreitet und umfasst die Konjugation einer Polyubiquitin-Kette an das abzubauenende Protein und dessen nachfolgende Degradation im 26S-Proteasom (Pickart, 2001; Voges, 1999). Die Markierung des Zielproteins mit Ubiquitin läuft generell in drei Schritten ab: Zunächst wird Ubiquitin durch ein Enzym E1 aktiviert, auf ein Ubiquitin-konjugierendes Enzym E2 übertragen, welches schließlich mit einer Ubiquitin-Protein-Ligase E3 zusammenwirkt, um schließlich Ubiquitin kovalent auf einen Lysinrest des Zielproteins zu übertragen. Die Substratspezifität wird hierbei durch die Ligase E3 vermittelt. Auf diese Weise markierte Proteine werden schließlich im 26S-Proteasom abgebaut. An der Degradation der AUX/IAA-Proteine ist eine E3-Ubiquitin-Ligase des SCF-Typs beteiligt (Abb. 7). SCFs sind multimere Enzyme, die aus mindestens vier Untereinheiten bestehen. Zwei dieser Untereinheiten, CUL1 und RBX1 katalysieren den Aufbau der Polyubiquitin-Kette (Seol, 1999). Das CUL1/RBX1-Dimer ist über ein SKP1-ähnliches Protein, ASK1, mit einem F-Box-Protein (TIR1) verbunden.

Innerhalb dieses so genannten SCF^{TIR1}-Komplexes, der seinen Namen übrigens aufgrund von drei seiner Untereinheiten erhalten hat (SKP1, CUL1, F-Box), interagiert die F-Box-Untereinheit mit dem Zielprotein und bewirkt somit die Substratspezifität des Komplexes.

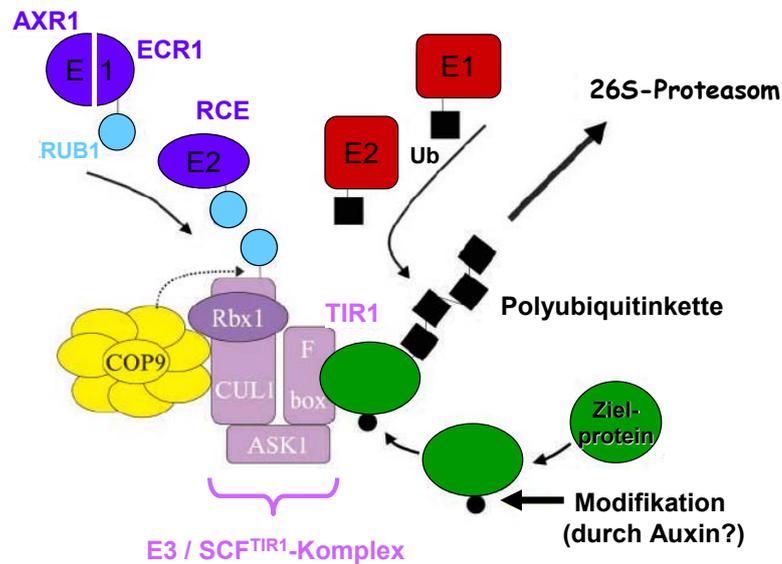


Abb. 7. Modell zum regulierten Proteinabbau im Auxin-Signalweg, modifiziert nach Kepinski (2002).

Durch den E3 ubiquitin-Ligase-Komplex SCF^{TIR1} mit Ubiquitin markierte Zielproteine (z.B. AUX/IAA) werden vom 26S-Proteasom abgebaut. Wahrscheinlich ist die F-Box-Untereinheit TIR1 für die Substratspezifität des SCF-Komplexes verantwortlich. Zum Abbau bestimmte Proteine werden vermutlich unter dem Einfluss hoher Auxinkonzentrationen durch ein bislang unbekanntes Signal modifiziert. Die Aktivität von SCF^{TIR1} wird u. a. durch die Modifikation der CUL1-Untereinheit mit RUB1 gesteuert, wobei sowohl die Konjugation mit Hilfe von AXR1/ECR1 und RCE als auch die Entfernung von RUB1 durch das COP9-Signalosom für die Funktion des Komplexes benötigt wird.

Abkürzungen: ASK1, SKP1-ähnliche Untereinheit; AXR1/ECR1, E1-ähnliches heterodimeres RUB-aktivierendes Enzym; E1, Ubiquitin-aktivierendes Enzym; E2, Ubiquitin-konjugierendes Enzym; RCE, E2-ähnliches RUB-konjugierendes Enzym; Rub, RUB1-Modifikation; Ub, Ubiquitin-Modifikation.

Die Regulation des Zusammenspiels zwischen SCF^{TIR1} und AUX/IAAs durch Auxin ist bislang noch weitgehend ungeklärt. Für mehrere AUX/IAA-Proteine konnte bereits die auxinabhängige Interaktion mit SCF^{TIR1} nachgewiesen werden (Gray, 2001; Tian, 2003), wobei vor allem Domäne II der AUX/IAA-Transkriptionsfaktoren für diese Wechselwirkung wichtig zu sein scheint. So wurde gezeigt, dass Domäne II alleine bereits ausreichend und notwendig für die auxinregulierte Destabilisierung von Proteinen ist (Ramos, 2001).

Lange Zeit wurde spekuliert, dass Auxin die Interaktion von AUX/IAAs mit TIR1 über die Modifikation der AUX/IAA-Proteine, beispielsweise durch Phosphorylierung (wie für andere Proteine gezeigt, s. Skowyra, 1997), beeinflusst und somit deren Abbau steuert. Mittlerweile geht man jedoch davon aus, dass durch höhere IAA-Konzentrationen nicht AUX/IAAs, sondern die TIR1-Untereinheit oder mit dieser interagierende Komponenten auf bislang unbestimmte Weise modifiziert werden, um die AUX/IAA-TIR1-Interaktion zu stimulieren (Dharmasiri, 2003a; Dharmasiri und Estelle, 2004; Kepinski und Leyser, 2004). Abgesehen von der Verstärkung der AUX/IAA-TIR1-Interaktion wäre auch die Regulation der SCF^{TIR1}-Menge oder -Aktivität denkbar, um den Abbau der AUX/IAAs und somit die Transkription auxininduzierter Gene zu beeinflussen. Tatsächlich führte die Überexpression von TIR1 in transgenen Pflanzen zu einer hypersensitiven Auxinantwort (Gray, 1999). Die Aktivität des Komplexes scheint außerdem durch die posttranslationale Modifikation der CUL1-Untereinheit durch ein Ubiquitin-ähnliches Protein RUB1 (related to ubiquitin 1) gesteuert zu werden (s. Abb 7, Dharmasiri, 2003b; Kepinski und Leyser, 2002). Diese Modifizierung erfolgt ähnlich wie auch die Ubiquitylierung von Proteinen: Ein Dimer aus AXR1 und ECR1 aktiviert zunächst RUB1 und überträgt dieses an RCE1, ein RUB1-konjugierendes Enzym. Von dort aus wird RUB1 auf CUL1 übertragen (Schwechheimer und Deng, 2001). Für die Auxinantwort ist jedoch auch die Dekonjugation von RUB1 nötig, die durch das COP9-Signalosom, einen in Eukaryoten konservierten Multienzymkomplex, vermittelt wird (Leyser, 2002; Schwechheimer und Deng, 2001). Auf welche Weise die RUB1-Modifikation die Aktivität von SCF^{TIR1} reguliert und in wiefern Auxin diese Aktivierung beeinflussen könnte, ist bislang nicht geklärt.

1.5 Kaliumaufnahme in die Pflanze

Wie bereits eingangs erwähnt, spielt Kalium als das in Pflanzen am häufigsten vorkommende Kation eine wichtige Rolle für pflanzliche Wachstumsprozesse. So wirken K^+ -Ionen während des auxininduzierten Streckungswachstums als Osmotikum und dienen dem Ladungsausgleich (s. 1.1). Während Kaliumionen in der Vakuole für die Regulation des osmotischen Potentials und somit des Turgordrucks während der Zellstreckung, tropistischer Bewegungen und der Stomabewegung benötigt werden, haben sie auch in anderen Zellkompartimenten wichtige Funktionen: So konnte für die Proteinbiosynthese *in vitro* gezeigt werden, dass physiologische K^+ -Konzentrationen (100-150 mM) für verschiedene Schritte der Translation, wie z.B. die ribosomale Bindung der t-RNA erforderlich sind. Außerdem beeinflusst die Verfügbarkeit von Kalium die Photosynthese: So hängt die Photosyntheserate isolierter Chloroplasten von der K^+ -Konzentration im Außenmedium ab und die Abnahme der Photosyntheserate in trockengestressten Pflanzen kann durch die Bereitstellung höherer Kaliumkonzentrationen im Boden gemildert werden (zusammengefasst in Marschner, 1995). Kalium kann bezüglich der beschriebenen Funktionen im Allgemeinen nicht durch andere Ionen ersetzt werden. Zwar kann Natrium wie Kalium als gewöhnlich leicht verfügbares Osmotikum dienen, jedoch ist eine zu hohe cytosolische Natriumkonzentration toxisch für viele Pflanzen. Es ist daher in pflanzlichen Zellen essentiell, das Verhältnis von Kalium und Natrium im Cytosol möglichst konstant zu halten. Besonders Pflanzen, die auf salzhaltigen Böden wachsen, sind darauf angewiesen, ein möglichst hohes K^+/Na^+ -Verhältnis beizubehalten, welches als bestimmender Faktor für die Ausbildung der Salztoleranz bei Pflanzen gilt (Maathuis und Amtmann, 1999). So wurde beispielsweise gezeigt, dass Pflanzen Salzstress erheblich besser tolerieren können, wenn sie ausreichend mit Kalium versorgt sind (Marschner, 1995).

Ebenso wie die Translokation von Natrium erfolgt auch der Transport von Kalium über biologische Membranen mit Hilfe spezieller Carrierproteine. In Pflanzen wurden bislang sieben verschiedene Proteinfamilien beschrieben, welche den Transport von Kalium vermitteln (Abb. 8; zusammengefasst in Mäser, 2002; Very und Sentenac, 2003).

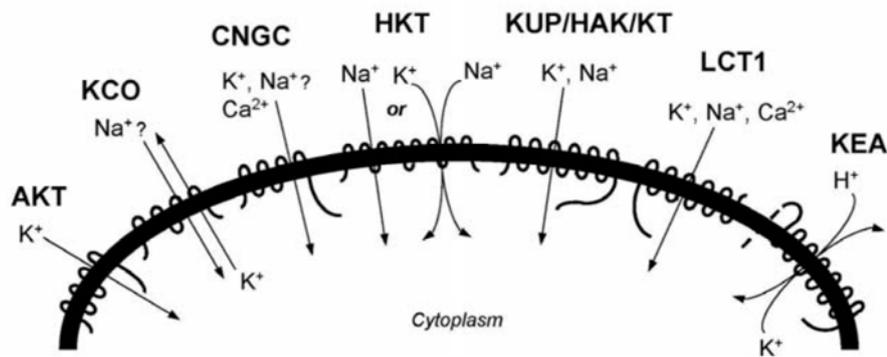


Abb. 8. Pflanzliche, für Kalium durchlässige Kationentransporter (nach Mäser 2002).

Bislang wurden in Pflanzen sieben verschiedene Familien kaliumpermeabler Transporter charakterisiert. Die Selektivität vieler dieser Transporter ist nicht auf Kalium beschränkt, ihre Durchlässigkeit für andere Kationen ist angegeben. Als Vertreter der *Shaker*-Familie ist hier der K^+ -Aufnahmekanal AKT1 genannt. Andere *Shaker*-Kanäle vermitteln den Export von K^+ in den Apoplasten (z.B. GORK, Ache, 2000) oder wurden als nicht-gleichrichtend charakterisiert (z.B. AKT2/3, Deeken, 2000).

Für die Aufnahme von Kalium aus der Bodenlösung in die Pflanze sind in erster Linie „low-affinity“-Transporter der *Shaker*-Familie und „high-affinity“-Transporter der HKT- bzw. KUP/HAK/KT-Familien verantwortlich. Als Vertreter der *Shaker*-Kaliumkanäle wurden in Wurzeln bislang hauptsächlich AKT1- und AtKC1-orthologe Kanäle identifiziert: AKT1 und AtKC1 in *Arabidopsis thaliana*, SKT1 in Kartoffel, LKT1 in Tomate, KDC1 in Karotte und ZMK1 in Mais. *AKT1* wird hauptsächlich in peripheren Zellschichten der Wurzel und in Wurzelhaaren exprimiert (Basset, 1995; Ivashikina, 2001; Lagarde, 1996) und auch *SKT1* wurde in Wurzeln lokalisiert (Zimmermann, 1998). Die Isolierung von *LKT1* erfolgte mit Hilfe einer wurzelhaarspezifischen cDNA-Bibliothek (Hartje, 2000). Auch die Transkripte von *KDC1* und *AtKC1* wurden in Epidermiszellen der Wurzel und in Wurzelhaaren detektiert (Downey, 2000; Ivashikina, 2001; Reintanz, 2002). Zudem konnte die Expression von *SKT1*, *AKT1* und *AtKC1* in Schließzellen, im Hypokotyl und in Tumorgewebe beobachtet werden (Deeken, 2003; Philippar, 2004; Szyroki, 2001; Zimmermann, 1998). Der *AKT1*-orthologe Kanal in Mais, *ZMK1*, wird zwar auch in Wurzeln exprimiert, die höchsten *ZMK1*-Transkriptlevel innerhalb des Maiskeimlings konnten jedoch in der Koleoptile gefunden werden, wo dieser Kanal eine wichtige Rolle für die Kaliumaufnahme während des auxininduzierten Zellstreckungswachstums spielt (s. 1.1, Philippar, 1999b). Erst kürzlich wurde auch in Reis ein *AKT1*-orthologes Gen, *OsAKT1*, identifiziert, dessen Genprodukt als potentieller Kaliumaufnahme Kanal in Frage

kommt (Golldack, 2003). Die mRNA dieses Kanals wurde hauptsächlich in Epidermis und Endodermis von Wurzeln drei Wochen alter Pflanzen detektiert. Die *OsAKT1*-Transkription war in der Exodermis salztoleranter Varietäten in Antwort auf die Behandlung der Pflanzen mit 150 mM NaCl im Vergleich zur Kontrolle verringert. In einer salzsensitiven Reisvarietät jedoch änderte sich die *OsAKT1*-Transkriptmenge unter denselben Bedingungen nicht (Golldack, 2003). Die durch Salzstress bedingte transkriptionelle Regulation konnte auch bereits für andere Kaliumtransporter beobachtet werden: In der halophytischen Mittagsblume *Mesembryanthemum crystallinum* werden aus der *Shaker*-Familie ein *KAT1*-orthologes Kanalgen, *KMT1*, und einige Gene der KUP/HAK/KT-Familie, *McHAK1-4*, durch erhöhte Salzkonzentrationen transkriptionell aktiviert. Der *AKT1*-orthologe Kanal in dieser Pflanze, *MKT1*, wird jedoch unter Salzstress weniger stark exprimiert als unter Kontrollbedingungen (Su, 2001; Su, 2002). In *Arabidopsis thaliana* ist im Vergleich zur Kontrolle die Expression keines der bekannten *Shaker*-Kaliumkanalgene in der Wurzel salzbehandelter Pflanzen verändert. In Blättern jedoch nimmt die *AtKC1*-Transkriptmenge unter Salzstress zu, was auf eine Rolle dieses Transporters für die Kompartimentierung von K^+ in den verschiedenen Blattgeweben schließen lässt (Pilot, 2003). Insgesamt ist die Bedeutung der Kaliumaufnahme über die entsprechenden Transportsysteme und deren Regulation in Reaktion auf erhöhte Salzkonzentrationen im Boden bislang weitestgehend ungeklärt. In der vorliegenden Arbeit sollte daher die Rolle des *AKT1*-orthologen Kanals in Reis für die Kaliumhomöostase in salzgestressten Pflanzen noch näher untersucht werden.

1.6 Ziel dieser Arbeit

In vorangegangenen Studien konnte die Bedeutung des AKT1-orthologen Kaliumkanals aus Mais, ZMK1, für das auxininduzierte Streckungswachstum von Koleoptilzellen bereits gezeigt werden. Im Einklang mit der Tatsache, dass sich im Promoterbereich von *ZMK1* mögliche cis-Elemente der Auxin-Signalkette befinden, wurde die Expression dieses Gens sowohl *in vitro* als auch *in vivo* durch IAA induziert. So folgte der Transkriptgehalt von *ZMK1* während der gravitropen Krümmung dem endogenen IAA-Gradienten in der Maiskoleoptile. Die differentielle Aktivierung von ZMK1 in den beiden unterschiedlich stark wachsenden Organhälften und die dadurch bedingte differentielle Aufnahme von Kaliumionen sind vermutlich für das unterschiedlich starke Zellstreckungswachstum und schließlich für die Krümmung der Koleoptile verantwortlich. Nachdem auch während der phototropen Krümmungsreaktion der Graskoleoptile eine Umverteilung des endogenen Auxins in die stärker wachsende, unbelichtete Flanke erfolgt, sollte in der vorliegenden Arbeit die Beteiligung von ZMK1 an diesem Wachstumsprozess untersucht werden.

Um die Signaltransduktionskette, die zur Aktivierung AKT1-ähnlicher Kanäle führt, näher untersuchen zu können, sollte außerdem der AKT1-Orthologe aus Reis isoliert und charakterisiert werden. Reis stellt zur Behandlung dieser Fragestellung ein besser geeignetes Modellsystem als Mais dar, da hier bereits in die Auxinsignalkette involvierte Transkriptionsfaktoren wie OsARF1 bekannt sind und die Generierung von Funktionsverlustmutanten besser zu realisieren ist als in Mais. So war zunächst zu klären, ob der AKT1-Orthologe aus Reis ähnliche Funktionen im auxinregulierten Zellstreckungswachstum erfüllt wie ZMK1. Nachdem jedoch klar wurde, dass der in der vorliegenden Arbeit untersuchte Kanal nicht durch Auxin reguliert wird und auch ein anderes Expressionsmuster zeigt als ZMK1, sollte die physiologische Bedeutung dieses Transporters geklärt werden. Da Kaliumionen den wichtigsten Makronährstoff in Pflanzen darstellen, ist es notwendig, die Mechanismen von Kaliumaufnahme und -transport besser zu verstehen, um die limitierenden Schritte des pflanzlichen Wachstums bestimmen zu können. So ist es beispielsweise für Pflanzen, die auf versalzten Böden wachsen müssen, besonders wichtig, das Verhältnis von Kalium zu Natrium im Cytosol möglichst hoch zu halten, um toxische Effekte durch die Akkumulation von Na^+ zu vermeiden. Eine Möglichkeit hierfür wäre die verstärkte Aufnahme von Kalium über die Wurzel, welche unter anderem durch

einwärtsgleichrichtende Kanäle der AKT1-Unterfamilie in der Plasmamembran vermittelt wird. Daher sollte nun der AKT1-orthologe Kaliumkanal aus Reis im Hinblick auf dessen Rolle für die pflanzliche Ernährung untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Anzucht von Zea mays

Alle Experimente wurden mit dem Hybridmais cv. „OuralFAO230“ (DSV Lippstadt) durchgeführt. Die Samen wurden gewaschen, für 4 h in Wasser eingeweicht und zur Keimung auf feuchtem Filterpapier ausgelegt, so dass der Embryo nach oben zeigte. Nach 72 h wurden die ca. 1 cm großen Keimlinge in mit 1% Agar (Sigma) gefüllte Plastiktöpfe überführt. Das Wachstum erfolgte stets bei 25 °C im Rotlicht ($0,2 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-2}$).

2.1.1 Wachstum unter phototroper Stimulation

Zur phototropen Stimulation wurde die Koleoptilenspitze (5mm) von 4-5 Tage alten, aufrecht gewachsenen und ca. 2-2,5 cm langen Maiskeimlingen einseitig mit Blaulicht (450 nm, $10 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-2}$) bestrahlt. Hierbei wurden die Pflanzen so ausgerichtet, dass die Ebene durch die Leitbündel parallel zur Richtung des einfallenden Lichts verlief. Alternativ wurden Maiskeimlinge zuvor horizontal auf einem Klinostaten ("Blue Light Cycler", BLC, s. 2.1.3) befestigt, der mit 1 rpm ($0,0001 \text{ g}$) rotierte. Die einseitige Stimulation mit Blaulicht begann 30 min nach dem Einsetzen der Rotation. Die Auswirkung der Bestrahlung mit Blaulicht wurde jeweils über einen Zeitraum von 4 h verfolgt und die Koleoptilen wurden in gegebenen Zeitabständen geerntet. Die phototrope Stimulation und die Isolierung der Koleoptilen erfolgte stets bei 25 °C im Rotlichthintergrund ($0,2 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-2}$). Isoliertes Gewebe für quantitative RT-PCR-Analysen wurde direkt nach der Ernte in flüssigem Stickstoff schockgefroren und danach bei -80 °C gelagert.

Um den Krümmungswinkel der photostimulierten Koleoptilen zu bestimmen, wurden die Pflanzen nach 4 h Belichtung aus den Agartöpfen genommen und mit Klebeband auf einer Plexiglasplatte befestigt. Diese Platte wurde fotokopiert und es wurde der Winkel ermittelt, der durch die Tangenten, die an der Spitze und der Basis der Koleoptile gezeichnet wurden, bestimmt wird.

2.1.2 Wachstum unter gravitroper Stimulation

Zur Gravistimulation wurden 4-5 Tage alte, aufrecht gewachsene und ca. 2-2,5 cm lange Maiskeimlinge um einen Winkel von 90° gedreht und so ausgerichtet, dass die Ebene durch beide Leitbündel parallel zur Richtung der Schwerkraft lag. Die

Auswirkung der Schwerkraft wurde über einen Zeitraum von 4 h verfolgt. Die gravitrope Stimulation und die Isolierung der Koleoptilen erfolgte stets bei 25 °C im Rotlichthintergrund ($0,2 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-2}$). Der Krümmungswinkel der gravistimulierten Koleoptilen wurde 4 h nach dem Einsetzen des Gravistimulus bestimmt (vgl. 2.1.1).

2.1.3 Blue Light Cycler, BLC

Um die Antwort der Maiskeimlinge auf phototrope Stimulation unabhängig von der Reaktion auf Schwerkraftreize untersuchen zu können, wurde ein Klinostat gebaut, der es erlaubt, die Koleoptilspitze während der Rotation einseitig mit Blaulicht zu bestrahlen (Abb. 9). Der BLC wird durch einen 12 V-Motor angetrieben und die Übersetzung des Getriebes beträgt 1:8.640, so dass der Klinostat mit einer Umdrehung pro Minute rotiert. Vorhergegangene Experimente hatten gezeigt, dass die Pflanzen bei dieser Rotationsgeschwindigkeit nicht mehr in der Lage sind, die Richtung der Schwerkraft aufzulösen. Dementsprechend zeigten Maiskeimlinge, die für 24 h auf dem rotierenden BLC inkubiert worden waren, eine zufällige Krümmung in alle Raumrichtungen (s. Abb. 9b, rechts). Auf dem BLC wird jeder einzelne Keimling von einer blauen LED (light emitting diode, Nichia Europe Bv., Amsterdam, NLPB 500, 450 nm) belichtet, die Lichtintensität wurde auf $10 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-2}$ eingestellt.

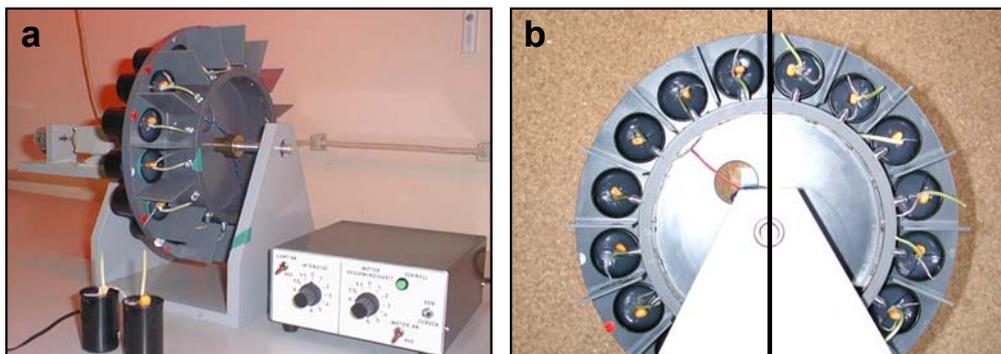


Abb. 9. Blue Light Cycler (BLC): Experimentelles Setup zur Photostimulation von Maiskeimlingen auf einem Klinostaten.

(a) Seitenansicht. **(b)** Frontansicht. Krümmung der Maiskeimlinge nach 24-stündiger Rotation auf dem BLC ohne (rechte Seite) und mit gleichzeitiger Bestrahlung mit blauem Licht (linke Seite).

2.2 Anzucht von *Oryza sativa*

Alle Experimente wurden mit Japonica Reis, *Oryza sativa* L. ssp. *japonica* cv. Nihonmasari, durchgeführt. Um die Samen zu sterilisieren wurden die Spelzen entfernt und die Samen zweimal für je 15 min in 10% H₂O₂ inkubiert. Anschließend wurden die Samen für 45 min mit 1% HClO behandelt. Zum Schluss und zwischen den einzelnen Sterilisationsschritten wurden die Reiskörner gründlich mit sterilem Wasser gewaschen. Die sterilen Samen wurden nun auf Plastiknetzen (Rotilabo-Sicherheitsnetz, Roth) ausgelegt, die, wenn nicht anders angegeben, auf vollentsalztem Wasser schwammen (s. Abb. 10). Nach 4-5 Tagen wurden die verschiedenen Keimlingsgewebe (Koleoptile, Primärblatt, Wurzel) isoliert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Alternativ wurden die Samen auf mit Wasser getränktem Filterpapier ausgebracht und die einzelnen Gewebe nach 4-5 Tagen geerntet. Das Wachstum erfolgte, sofern nicht anders angegeben, bei 25 °C im Dunkeln.



Abb. 10. Anzucht von *Oryza sativa* auf schwimmenden Plastiknetzen. Das Wachstum der Pflanzen erfolgte hier im Gewächshaus bei einem Licht-Dunkel-Rhythmus von 15 h Belichtung ($250 \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, 30° C) und 9 h Dunkelheit (25° C).

2.2.1 Wachstumsexperimente an Koleoptilsegmenten

Die Wachstumsantwort der Reiskeimlinge auf exogenes Auxin wurde an Koleoptilsegmenten untersucht. Hierfür wurden die Koleoptilen von ca. 4-5 Tage alten Keimlingen in 0,5 cm lange Stücke geschnitten und zunächst für 1 h in Wasser geschüttelt, um endogenes Auxin zu entfernen. Danach wurden die Segmente für 4 h in 0, 1, 5 oder 10 μM IAA (Fluka) inkubiert. Die anschließende Messung des Längenzuwachses ergab, dass das Wachstum der Koleoptilen in einer 5 μM IAA-Lösung optimal war (ca. 35% Längenzuwachs / 4 h). Für Northern Blot Analysen wurden Reiskoleoptilen, bei denen die Spitze (3 mm) entfernt worden war, für 1 h in Wasser ausgewaschen und anschließend für 15, 45 und 90 min in 5 μM IAA

inkubiert. Alle Gewebeproben wurden nach der Entnahme aus der Auxinlösung sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Alle Arbeitsschritte (Präparation, Auswaschen, Inkubation, Ernte) wurden stets im Sicherheitsgrünlicht durchgeführt.

2.2.2 Wachstum unter Salzstress

Um die Reaktion von Reiskeimlingen auf Salzstress zu untersuchen, wurden sterilisierte Samen auf Filterpapier ausgelegt, das mit $\frac{1}{2}$ MS-Medium (incl. 1% Saccharose) oder $\frac{1}{2}$ MS, 1% Saccharose, 150 mM NaCl ($\pi = 350\text{ mosmol}\cdot\text{kg}^{-1}$) getränkt worden war. Als osmotische Kontrolle dienten Pflanzen, die auf $\frac{1}{2}$ MS, 1% Saccharose, D-Sorbitol ($\pi = 350\text{ mosmol}\cdot\text{kg}^{-1}$), gewachsen waren. Von 4 Tage alten Keimlingen wurden die entsprechenden Gewebe geerntet, sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Das Wachstum erfolgte, sofern nicht anders angegeben, bei 25 °C im Dunkeln.

2.3 Analyse des IAA-Gehalts in phototrop stimulierten Maiskoleoptilen

Das Wachstum der Maiskeimlinge erfolgte wie unter 2.1.1 beschrieben. Die Pflanzen wurden für unterschiedlich lange Zeiträume (0, 5, 10, 15, 30, 60, 90, 120, 180, 240 min) entweder unter normalen Schwerkraftbedingungen oder auf dem BLC (s. 2.1.3) photostimuliert. Danach wurden die Koleoptilen isoliert, in Licht- und Schattenseite geteilt und von der Spitze aus in vier je 5 mm lange Segmente unterteilt. Die Segmente wurden in 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt, ihr Frischgewicht (FG) wurde bestimmt, und die Proben wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Das Frischgewicht einer Gewebeprobe (Segmente aus 3 Koleoptilen) betrug dabei 8 bis 50 mg. Die Bestimmung des Gehaltes an freier IAA erfolgte mittels GC-MS (Gaschromatographie-Massensspektrometrie, Edlund, 1995) und wurde von Dr. Karin Ljung in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. G. Sandberg, Institut für Forstgenetik und Pflanzenphysiologie an der Universität Umeå, Schweden, durchgeführt.

2.4 Analyse des Gehalts anorganischer Ionen in pflanzlichen Geweben

2.4.1 Kationenanalyse

Das Pflanzenmaterial wurde für 10 Tage bei 65 °C getrocknet, mit HNO₃ versetzt (ca. 100 mg Gewebe, 1 ml 65% HNO₃ suprapur) und in einem Druckaufschlusssystem (Seif, Unterschleißheim, Deutschland) für 10 h bei 160-170 °C und 10 bar aufbewahrt. Die klare Aufschlusslösung wurde anschließend mit deionisiertem Wasser auf 10 ml aufgefüllt. Die Elementbestimmung erfolgte mit einem Optischen Emissionsspektro-meter ("Inductively coupled plasma optical emission spectroscopy ICP-OES"; Typ JY 70 plus, Division d'Instruments S.A., Jobin Yvon, Frankreich) und wurde von Frau Elfriede Reisberg (Julius-v.-Sachs-Institut, Universität Würzburg) durchgeführt.

2.4.2 Anionenanalyse

Das Pflanzenmaterial wurde für 10 Tage bei 65 °C getrocknet und anschließend fein gemörsert. 50 mg des zerriebenen Gewebes wurden in 5 ml deionisiertem Wasser suspendiert und für 3 min auf 105 °C erhitzt. Unlösliche Bestandteile wurden durch Zentrifugation (10.000 g, 15 min) abgetrennt, die Chloridkonzentration im Überstand wurde durch isokratische Anionenchromatographie und nachfolgende Leitfähigkeitsmessung (Biotronik, Maintal, Deutschland) durch Frau Eva Wirth (Julius-v.-Sachs-Institut, Universität Würzburg) ermittelt.

2.5 Verfahren mit Ribonukleinsäuren (RNA)

Alle Arbeitsschritte mit RNA wurden mit sterilen Glas- und Plastikgeräten, RNase-freien Chemikalien und unter Verwendung von Einmalhandschuhen durchgeführt. Das verwendete Wasser wurde mit 1 ml/l DEPC (Diethylpyrocarbonat, RNase-Inhibitor) behandelt und autoklaviert.

2.5.1 Isolierung von RNA und mRNA

Die Isolierung von Gesamt-RNA erfolgte mittels des Plant RNeasy Extraction Systems (Qiagen) nach den Angaben des Herstellers. Poly (A)⁺ RNA wurde mit Dynabeads Oligo (dT)₂₅ (Dyna) aus Gesamt-RNA extrahiert, die Durchführung erfolgte nach dem zugehörigen Protokoll. Um DNA-freie mRNA für die RT-PCR-

Analysen (s. 2.6.5) zu isolieren, wurde die mRNA-Extraktion mit Dynabeads Oligo (dT)₂₅ zweimal hintereinander durchgeführt.

2.5.2 Elektrophorese von RNA

Ribonukleinsäureproben wurden mit einem Volumen RNA-Ladungspuffer versetzt, bei 65° C für 10 min denaturiert und in einem 1%igen MEN-Agarosegel in 1 x MEN-Puffer mit 6,5 V/cm elektrophoretisch aufgetrennt. Die entstandenen Bandenmuster wurden durch Zugabe von Ethidiumbromid zum RNA-Ladungspuffer und anschließender Fluoreszenzanregung (312 nm) sichtbar gemacht und dokumentiert (Image Master VDS, Pharmacia).

<u>MEN-Puffer (10 x):</u>	MOPS	200 mM
	Na-Acetat	50 mM
	EDTA	5 mM
<u>RNA-Ladungspuffer (1:1 einzusetzen):</u>	Formamid	720 µl
	10 x MEN	160 µl
	37 % Formaldehyd	260 µl
	H ₂ O	250 µl
	80 % Glycerol	100 µl
	Bromphenolblau	10 µl
	Ethidiumbromid	1 µl
<u>1% MEN-Agarosegel:</u>	Agarose	600 mg
	H ₂ O	44,4 ml
	10 x MEN	6 ml
	37 % Formaldehyd	9,6 ml

2.5.3 Northern Blot

Zum Nachweis spezifischer Transkripte wurde 1 µg poly (A)⁺ RNA gelelektrophoretisch (2.5.2) aufgetrennt und mittels Kapillar-Transfer (Sambrook, 1989) auf eine Nylonmembran (Hybond N, Amersham) übertragen. Der Transfer erfolgte innerhalb von 12 h in 20 x SSC-Puffer. Die transferierte RNA wurde durch Bestrahlung mit UV-Licht (0,8 J/cm², UV-Stratalinker 2400, Stratagene) mit der Membran kovalent vernetzt.

Der spezifische Nachweis der Transkripte von *OsAKT1* und *OsARF1* erfolgte durch Hybridisierung der Northern Blots mit radioaktiv markierten Sonden, die die gesamte Sequenzinformation der *OsAKT1*-cDNA, bzw. einen Teil von *OsARF1* (GenBank Nr. AJ306306, Position 735-2352) beinhalten. Die Synthese der Sonden wurde wie unter 2.5.4 beschrieben durchgeführt. Als DNA-Matrize dienten die mittels Restriktionsverdau (2.6.1.2) aus den Plasmiden *OsAKT1/pCRIITopo #1* (*EcoRI*) und *OsARF1:smGFP4/pUC19* (*EcoRV*, *BglII*) herausgetrennten und aufgereinigten cDNA Moleküle (2.6.1.3). Das Plasmid *OsARF1:smGFP4/pUC19* wurde freundlicherweise von Prof. Dr. Peter Nick (Universität Karlsruhe) zur Verfügung gestellt. Die Hybridisierung der Blots erfolgte bei 68 °C für 12 h in P_i -Hybridisierungspuffer. Nach dem gründlichen Waschen der Blots mit P_i -Puffer bei 68 °C erfolgte die Detektion der Signale durch Autoradiographie (Hyperfilm MP, Amersham).

Um die verwendeten Blots einer zweiten Hybridisierung mit einer weiteren Sonde zugänglich zu machen, wurde die zuvor eingesetzte Sonde durch die Behandlung der Membran mit kochender 1%iger SDS-Lösung und anschließendem gründlichem Waschen der Membran entfernt. Die Quantifizierung der Northern Blots erfolgte mit einer oligo-(dT)-Sonde, die als interner Standard für die vorhandene poly(A)⁺ RNA-Menge diente. Hierzu wurden je 5, 10 und 15 ng der entsprechenden mRNA-Proben auf eine Nylonmembran aufgetragen (Northern Dot Blot) und bei 42 °C mit der oligo-(dT)-Sonde in P_i -Puffer hybridisiert.

<u>P_i-Hybridisierungspuffer:</u>	Natriumphosphat, pH 7,2	250 mM
	EDTA	1 mM
	SDS	7 %
	BSA	1 %

2.5.4 Synthese radioaktiv markierter DNA-Sonden

Die Synthese der mit [α ³²P]-dCTP markierten DNA-Sonden erfolgte im „Random prime Labelling“-Verfahren mit dem „ReadyToGo DNA Labelling System“ (Amersham) nach den Angaben des Herstellers unter Verwendung von 200 ng hitzedenaturierter DNA und 5 μ l [α ³²P]-dCTP (ICN Biomedicals, 3000 Ci/mol).

Die zur Quantifizierung der Northern Blots eingesetzte oligo(dT)-Sonde wurde in Anlehnung an eine Methode von Hollander und Fornace (Hollander und Fornace,

1990) synthetisiert. Hierzu wurde ein oligo(dT)₂₇₂-Nukleotid mit [γ -³²P]-ATP unter Verwendung einer T4 Polynukleotidkinase endmarkiert. Die Reaktion enthielt die unten angegebenen Komponenten und erfolgte für 30 min bei 37 °C. Alle Sonden wurden im Anschluss an ihre Synthese über eine mit Sephadex G-50 (Ausschlußvolumen 20 bp, Sigma) gefüllte Säule (Mobicols, MoBiTec) aufgereinigt, für 5 min bei 95° C denaturiert und sofort für die Hybridisierung eingesetzt.

<u>oligo(dT)-Sonde:</u>	Oligo (dT) ₂₇₂ [20 pmol/ μ l] (Pharmacia)	1 μ l
	10 x Puffer (Pharmacia)	2 μ l
	T4 Polynukleotidkinase [6,1 U/ μ l] (Pharmacia)	2 μ l
	[γ - ³² P]-ATP [5 mCi/ μ l] (ICN)	5 μ l
	H ₂ O	10 μ l

2.6 Verfahren mit Desoxyribonukleinsäuren (DNA)

2.6.1 Analyse und Modifikation

2.6.1.1 DNA-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA erfolgte elektrophoretisch in Agarosegelen. Die entstandenen Bandenmuster wurden durch Zugabe von 100 ng/ml Ethidiumbromid (Roth) und die anschließende Fluoreszenzanregung bei 320 nm sichtbar gemacht. Zur Dokumentation diente der Image Master VDS (Pharmacia). Fragmente über 500 bp Länge wurden standardmäßig in 1 %igen TBE-Agarosegelen (SeaKem LE-Agarose, Biozym) aufgetrennt, kleinere hingegen in 3 %igen TBE-Agarosegelen (SeaKem LE-Agarose, Biozym). Den aufzutrennenden DNA-Proben wurde das entsprechende Volumen 5fach-Probenpuffer zugesetzt und die Elektrophorese erfolgte bei 40 mA in 1 x TBE-Puffer. Als Größenstandard diente λ -DNA (Pharmacia), die vollständig mit *Pst*I verdaut worden war (λ -*Pst*-Standard).

<u>5 x DNA-Probenpuffer:</u>	Bromphenolblau	0,25 %
	Xylencyanol	0,25 %
	Glycerin	50 %
	EDTA	100 mM

<u>10 x TBE (Tris-Borat-EDTA):</u>	Tris-HCl, pH 8,0	1 M
	Borsäure	0,9 M
	EDTA	0,01 M

2.6.1.2 Restriktionsanalyse

Rekombinierte Plasmide wurden durch Spaltung mit Restriktionsendonukleasen auf erfolgreiche Insertion untersucht bzw. die Orientierung des Inserts ermittelt. Außerdem wurden Vektoren und Inserts durch den Verdau mit Restriktionsenzymen für Ligationen vorbereitet. Die Restriktionsansätze entsprachen den Angaben der Herstellerfirmen (MBI, NEB, Pharmacia, Gibco). Für die quantitative Spaltung der DNA wurden 5 U eines Enzyms pro µg DNA eingesetzt.

2.6.1.3 Aufreinigung von DNA

DNA-Fragmente gewünschter Größe wurden nach Gelelektrophorese und Identifikation anhand des Größenstandards aus dem Gel ausgeschnitten und mit dem JetSorb-System (Genomed) nach den Angaben des Herstellers eluiert. War bei der gelelektrophoretischen Überprüfung von PCR-Produkten nur eine einzige Bande zu detektieren, so erfolgte die Aufreinigung des PCR-Produkts direkt aus dem PCR-Ansatz mit Hilfe des JetPure-Systems (Genomed).

2.6.1.4 Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA

Die Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren erfolgte absorptionsspektrophotometrisch mit Hilfe eines UV-Photospektrometers (Gene Quant II, Pharmacia). Anhand der Extinktion bei 260 nm (Absorption der Nukleinbasen) und 280 nm (Absorption aromatischer Aminosäuren) konnte die Konzentration bzw. die Reinheit der zu untersuchenden Proben bestimmt werden.

2.6.1.5 Plasmidpräparation

Plasmid-DNA wurde nach dem Prinzip der alkalischen Lyse (Birnboim und Doly, 1979) im Standardverfahren isoliert, wobei stets 1,5 ml Flüssigkultur eingesetzt wurden. Waren ein hoher Reinheitsgrad bzw. größere Mengen der Plasmid-DNA erforderlich, wurden für die Aufreinigung das WizardPlus Mini- bzw. Midiprepsystem (Promega) nach den Angaben des Herstellers eingesetzt.

2.6.1.6 DNA-Sequenzierung und Sequenzanalyse

Alle Sequenzierungsreaktionen beruhten auf der Didesoxymethode nach Sanger (Sanger, 1977) und wurden mit dem LiCOR 4200 von Frau Susanne Michel (Chemielaborantin, Julius-v.-Sachs-Institut, Universität Würzburg) durchgeführt. Als Primer dienten entweder die auf der multiplen Klonierungsstelle der entsprechenden Plasmide hybridisierenden Primer T7, Sp6, M13(fw) und M13(rev) oder zuvor konstruierte Primer, die zu definierten Bereichen der jeweiligen DNA-Insertion komplementär waren. Alle Sequenzierungsreaktionen erfolgten mit aufgereinigter Plasmid-DNA.

DNA-Sequenzen wurden mit dem Programm Vector NTI 7.1 (Infor Max, Inc.) analysiert. Sequenzähnlichkeiten zu bekannten DNA- und Proteinmolekülen wurden über den BLAST-Algorithmus (Altschul, 1990) am NCBI-Server (National Center for Biotechnology Information, Bethesda, Maryland, USA) ermittelt. Vergleiche von DNA- und Proteinsequenzen wurden mit dem Programm ClustalX (Thompson, 1994) generiert und mit Hilfe von GeneDoc 2.6 (Nicholas, 1997) graphisch dargestellt.

2.6.2 Klonierung von DNA-Fragmenten

Zur Klonierung wurden spezifische DNA-Fragmente in Plasmidvektoren ligiert, die Plasmide in Bakterienzellen transformiert und die vervielfältigte Plasmid-DNA mittels Restriktionsverdau (s. 2.6.1.2) bzw. Sequenzierung (s. 2.6.1.6) analysiert.

2.6.2.1 Ligation

Die für eine Ligation zweier DNA-Fragmente benötigten komplementär kohäsiven (engl. „sticky“) bzw. glatten (engl. „blunt“) Enden beider Moleküle wurden durch den Verdau mit geeigneten Restriktionsendonukleasen generiert (s. 2.6.1.2). Die Ligation erfolgte stets über Nacht bei 16 °C.

<u>Ligationsansatz:</u>	10 x Ligationspuffer (MBI)		2 µl
	50 % PEG 4000 (MBI)	(nur für blunt ends)	2 µl
	T4-Ligase (1U/µl, MBI)	sticky	2 µl
		blunt	4 µl
	Vektor-DNA		1 µl
	Insert-DNA		8 µl
	H ₂ O		ad 20 µl

2.6.2.2 Ligation von PCR-Produkten (TA-Klonierung)

Durch die matrizenunabhängige terminale Transferaseaktivität der nativen *Taq*-Polymerase (Clark, 1988) wird am 3'-Ende der hiermit generierten PCR-Produkte ein Nukleotidrest, vorzugsweise Adenin, angehängt. Bei der Ligation wurde das derartig adenylierte PCR-Produkt mit einem Vektor verknüpft, der an seinen 5'-Enden Thyminüberhänge aufweist. In der vorliegenden Arbeit wurde das TOPO-TA Cloning System (Invitrogen) nach den Angaben des Herstellers genutzt.

2.6.2.3 Gerichtete Ligation von PCR-Produkten

Die Ligation durch Directional-TOPO-Cloning (Invitrogen) ermöglicht die gerichtete Klonierung von blunt-end PCR-Produkten in den Vektor pcDNA3.1D/V5-His-TOPO. Hierfür muss der fw-Primer an seinem 5'-Ende eine einfache Kozak-Sequenz (CACCATG, Kozak, 1990), d.h. einen Überhang von 4 Basen vor dem Startcodon, enthalten. Der verwendete Vektor pcDNA3.1D/V5-His-TOPO trägt einen komplementären Überhang (GTGG) an seinem 3'-Ende, welcher in das 5'-Ende des PCR-Produkts eindringt, mit diesem hybridisiert und so das PCR-Produkt in der richtigen Orientierung stabilisiert. Zudem erhöht die Kozak-Sequenz als eukaryontische Translations-Initiations Sequenz die Expression von offenen Leserastern in eukaryontischen Zellen. Die Ligation erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

2.6.3 cDNA-Synthese

RNA-abhängige DNA-Polymerasen aus Retroviren, so genannte Reverse Transkriptasen (RT), sind in der Lage, vom 3'-Ende eines kurzen Doppelstranges aus, an einer RNA-Matrize eine komplementäre DNA (engl.: copy DNA oder cDNA) zu synthetisieren. Der Doppelstrang ergibt sich hierbei aus der Hybridisierung eines kurzen, zur RNA komplementären Oligonukleotids (Primer). Mit Hilfe eines Oligo-dT-Primers, der mit dem 3'-poly-A-Bereich der mRNA hybridisiert, kann so die gesamte in einer Probe enthaltene mRNA in cDNA umgeschrieben werden. Optional kann im Anschluss an die cDNA-Synthese der RNA-Strang des entstandenen RNA-DNA-Hybrids durch Ribonuklease H abgebaut werden.

In der vorliegenden Arbeit erfolgte die cDNA-Synthese standardmäßig mit MMLV-RT (engl.: Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase, Promega). Für die möglichst vollständige reverse Transkription sehr GC-reicher mRNA aus *Oryza sativa*

wurde eAMV-RT (engl.: enhanced Avian Myeloblastosis Virus Reverse Transcriptase, Sigma) verwendet, da sich diese besonders für die Transkription komplexer Sekundärstrukturen bei erhöhter Reaktionstemperatur (bis zu 65° C) eignet. Im Anschluss an die Synthese konnte die cDNA unverdünnt bei -80° C gelagert werden.

<u>Standard-RT-Ansatz:</u>	mRNA	6,7 µl
	Oligo-dT-Primer (100 µM)	0,4 µl
	dNTP (10 mM)	0,5 µl
	RT-Puffer (5x, Promega)	2,0 µl

Denaturierung bei 70 °C für 2 min, dann sofortige Kühlung auf Eis

	MMLV-RT (100 U/µl, Promega)	0,4 µl
--	-----------------------------	--------

Inkubation bei 42 °C für 60 min

<u>eAMV-RT-Ansatz:</u>	mRNA	8 µl
	Oligo-dT-Primer (0,5 µg/µl, Sigma)	1 µl
	dNTP (10 mM)	2 µl

Denaturierung bei 70° C für 2 min, dann sofortige Kühlung auf Eis

	RT-Puffer (10x, Sigma)	2 µl
--	------------------------	------

	RNase-Inhibitor (20 U/µl, Sigma)	1 µl
--	----------------------------------	------

	eAMV-RT (20 U/µl, Sigma)	1 µl
--	--------------------------	------

	PCR-H ₂ O	5 µl
--	----------------------	------

Inkubation bei 42 °C für 15 min, anschließend bei 60 °C für 90 min

2.6.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Durch den Einsatz genspezifischer Primer wurden definierte DNA-Fragmente mit Hilfe von DNA-Polymerasen exponentiell amplifiziert. Standardmäßig erfolgte die PCR mit *Taq*-Polymerase aus *Thermus aquaticus* (Diagonal), die terminale Transferaseaktivität aufweist und deren Produkte sich daher für eine TA-Klonierung (2.6.2.2) eignen. Sollten PCR-Produkte ohne Adenin-Überhänge generiert werden, so kamen *Pfu*-DNA-Polymerase aus *Pyrococcus furiosus* (Stratagene) oder SAWADY *Pwo*-DNA-Polymerase aus *Pyrococcus woesei* (PeqLab) nach den Angaben des Herstellers zum Einsatz, die aufgrund ihrer 3'→5'-Exonukleaseaktivität

zudem eine wesentlich geringere Fehlerquote aufweisen als beispielsweise *Taq*-Polymerasen. Für die Amplifikation sehr GC-reicher Regionen aus *Oryza sativa* wurde der JumpStart Accu Taq LA DNA Polymerase Mix (Sigma) entsprechend der Angaben des Herstellers verwendet. Hier garantiert die Blockierung der Polymerase durch einen Antikörper den Start der PCR erst ab einer bestimmten Temperatur, so dass die Spezifität der Reaktion deutlich erhöht wird.

Die PCR-Reaktionen wurden in verschiedenen Thermocyclern (Modell Varius V45, Landgraf; RoboCycler Gradient 40, Stratagene oder Mastercycler personal, Eppendorf) durchgeführt. Als Negativkontrolle diente stets ein Ansatz ohne Template-DNA. Im Anschluss an die Reaktion wurden die PCR-Produkte gelelektrophoretisch aufgetrennt (2.6.1.1) und mit Hilfe des ImageMaster VDS (Pharmacia Biotech) dokumentiert.

<u>Standard-PCR-Ansatz:</u>	PCR-Puffer (10x, Biotherm)	5 µl
	MgCl ₂ (25 mM)	5 µl
	dNTP (10 mM)	1 µl
	<i>fw</i> -Primer (10 µM)	1 µl
	<i>rev</i> -Primer (10 µM)	1 µl
	DNA-Matrize	10 ng
	Taq-Polymerase (5 U/µl, Biotherm)	1 µl
	PCR-H ₂ O	ad 50 µl

Standardprogramm des Thermocyclers:

Zyklenzahl	Denaturierung	Annealing	Elongation
1	95 °C, 120 sec		
30-40	95 °C, 30 sec	spezifische Annealing- temperatur der jeweiligen Primer, 30 sec	72 °C, 60 sec/1000 bp

2.6.5 Quantitative Echtzeit-RT-PCR

Die LightCycler Technologie (Roche) erlaubt sowohl die Detektion als auch die quantitative Darstellung der Kinetik und des Ergebnisses einer PCR-Reaktion (Rasmussen, 1998). Zusätzlich können spezifische PCR-Produkte mit Hilfe einer

Schmelzpunkt-Analyse von unspezifischen Amplifikaten unterschieden werden. Die Fluoreszenz-Detektion der Amplifikate beruht hierbei auf der selektiven Interkalierung von SYBR Green I in die bei der PCR-Reaktion entstehende doppelsträngige DNA, so dass die Fluoreszenz während der exponentiellen Phase der PCR proportional zur DNA-Konzentration zunimmt.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression verschiedener Gene mit Hilfe des LightCycler (Roche Diagnostics) untersucht. Der Einsatz von cDNA als Matrize ermöglichte es hierbei, durch den Verlauf der PCR-Reaktion auf die Ausgangsmenge eines bestimmten Transkriptes in einer zu untersuchenden Gewebeprobe zu schließen.

2.6.5.1 Primerdesign

Alle Primer für die LightCycler-Analyse wurden mit Hilfe des Programms LightCycler Probe Design (Roche) entworfen und von TIBMolBiol (Berlin) bezogen. Hierbei wurden bestimmte Vorgaben berücksichtigt, wie z.B. die maximale Primerlänge (17 bp), die maximale Länge des entstehenden Fragments (500 bp) oder die optimale Annealingtemperatur (55 °C bis 60 °C). Zudem durfte die Basenabfolge keine Dimere oder Sekundärstrukturen innerhalb eines Primers oder zwischen beiden Primern zulassen. Um Kontaminationen der zu untersuchenden Proben mit genomischer DNA detektieren zu können, wurden die Primer möglichst so gewählt, dass sie ein Intron umfassten. Vor der Anwendung im LightCycler wurde die optimale Annealingtemperatur der Primer in einer konventionellen PCR bestimmt und das gewünschte PCR-Fragment isoliert. Im Anschluss daran wurden die Primer mit dem entsprechenden Fragment als Matrize im LightCycler getestet. Die Spezifität der Primer wurde durch die Analyse der PCR-Produkte in einem 3%igen Agarosegel überprüft.

2.6.5.2 LightCycler-PCR

Als Matrize für die LightCycler-PCR wurde cDNA verwendet, die zuvor 1:10 mit PCR-H₂O verdünnt worden war. Die Reaktion wurde mit dem FastStart DNA Master SYBR Green I Kit (Roche) nach den Angaben des Herstellers angesetzt, in Glaskapillaren (Roche) überführt und im LightCycler (Roche) durchgeführt.

<u>Standard-Experiment:</u>	sense-Primer (10 mM)	1 µl
	antisense-Primer (10 mM)	1 µl
	MgCl ₂ (25 mM)	2,4 µl
	PCR-H ₂ O	11,6 µl
	LightCycler FastStart Enzyme	2 µl
	cDNA	2µl

PCR-Profil:

Zyklenzahl	Denaturierung	Annealing	Elongation	Detektion
1	95° C, 10 min			
45	95° C, 1 sec	50-56° C (primerabhängig), 7 sec	72° C, 19 sec	79° C, 5 sec

2.6.5.3 Auswertung der LightCycler-PCR

Zur Quantifizierung der Daten wurden die genspezifischen Signale auf die in den Proben enthaltene Ausgangsmenge an Aktin bezogen. Hierfür wurden in jeder PCR mit genspezifischen Primern zusätzlich Fragmente der Aktine *ZmAct81* (GenBank Nr. AAB40106) und *ZmAct83* (GenBank Nr. AAB40105) amplifiziert. Der relative Gehalt einer bestimmten cDNA in einer untersuchten Probe konnte dann anhand folgender Beziehung berechnet werden:

$$\text{Relativer Gehalt an cDNA} = 2^{[n(\text{Aktin}) - n(\text{Gen})]}$$

wobei n die Anzahl der Zyklen bezeichnet, bei der die Menge des jeweiligen Amplifikats einen festgelegten Schwellenwert überstieg. Dieser Schwellenwert war identisch für das genspezifische und das Aktinsignal und wurde in jeder PCR so bestimmt, dass die Messpunkte innerhalb der exponentiellen Phase der PCR lagen.

2.7 Bakterien**2.7.1 Verwendete Stämme und Vermehrung**

Alle benutzten Bakterienstämme stellten Abkömmlinge des *Escherichia coli* Stammes K12 dar. Zur Vermehrung wurde standardmäßig LB-Medium verwendet, das für 20 min bei 121 °C autoklaviert und danach für die Selektion mit dem entsprechenden

Antibiotikum versetzt wurde. Die Bakterien wurden in Flüssigmedium unter Schütteln oder auf Agarplatten (LB-Medium + 1,5 % Agar) bei 37 °C für 16 h inkubiert.

<u>LB-Medium:</u>	Trypton (Roth)	10 g
	Hefeextrakt (Roth)	5 g
	NaCl	10 g

<u>Verwendete Bakterienstämme:</u>	XL1-Blue MRF' (Stratagene)
	XL10-GOLD (Stratagene)
	One shot (Invitrogen)
	TOP 10 F' (Invitrogen)

2.7.2 Transformation chemisch kompetenter Bakterien

Die Herstellung kompetenter Bakterien, die sich durch eine erhöhte Aufnahmefähigkeit für Fremd-DNA auszeichneten, erfolgte durch die chemische Behandlung der Zellmembran mit divalenten Rb^+ -Kationen (Hanahan, 1983). Die Transformation wurde nach Inoue *et al.* (Inoue, 1990) durchgeführt.

2.7.3 Transformation elektrokompeter Bakterien

Die Herstellung von Bakterien, die sich für die Elektroporation eignen, erfolgte durch Entfernen des Salzes aus Flüssigkulturen. Hierzu wurden die gewünschten Bakterien in Flüssigmedium angezogen, auf Eis gekühlt und durch Zentrifugation bei 3840 x g und bei 4° C für 10 min sedimentiert. Die Zellen wurden mehrfach mit einer eisgekühlten 10%igen Glycerinlösung gewaschen und schließlich in 10% Glycerin resuspendiert, aliquotiert und bei -85° C gelagert. Die Transformation erfolgte mit Hilfe eines Elektroporators (Eppendorf 2510) durch einen Spannungspuls von 2500 V und einer Dauer von ca. 4,8 ms. Die elektroporierten Zellen wurden sofort mit 250 µl SOC-Medium versetzt, für 60 min bei 37° C geschüttelt und auf Selektionsmedium ausplattiert.

2.8 Proteinanalytik

2.8.1 Aufreinigung von Gesamt-Protein aus HEK293-Zellen

Zur Aufreinigung der Proteine aus HEK293-Zellen wurden die HEK293-Zellen nach der Entfernung des Mediums, zweimaligem Waschen mit PBS und der Zugabe von 100 µl RIPA-Puffer mit Protease Inhibitoren (complete Mini, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail Tablets; Roche Diagnostics GmbH) mittels eines Zellschabers aus der Kulturschale isoliert. Die Zellen wurden in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und für 30 min unter leichtem Schütteln bei 4 °C lysiert. Die Zelldebris wurde bei 1000 g und 4 °C für 10 min in einer Zentrifuge pelletiert. Von den im Überstand befindlichen Proteinen wurde die Konzentration nach Bradford bestimmt (s. 2.8.2). Die Proteine wurden bei -20 °C gelagert und standen so zur weiteren Analyse zur Verfügung.

<u>PBS (Phosphate buffered saline, pH 7,3-7,4):</u>	NaCl	137 mM
	KCl	3 mM
	Na ₂ HPO ₄	10 mM
	KH ₂ PO ₄	1,8 mM
<u>RIPA-Puffer (pH 7,2):</u>	Natriumphosphat pH 7	10 mM
	Triton X-100	1 %
	SDS	0,1 %
	EDTA	2 mM

Vor der Benutzung wurden 143µl einer 7x Protease Inhibitor Stock-Lösung (Roche Diagnostics) hinzugefügt.

2.8.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Konzentrationsbestimmung von Proteinen mit Roti-Nanoquant beruht auf einer modifizierten Proteinbestimmung nach Bradford (Bradford, 1976). Eine definierte Konzentrationsreihe von BSA in H₂O diente als Proteinstandard. Diese wurde bei 450nm und 590nm photometrisch vermessen und es wurde der Quotient OD590/OD450 gebildet. Zur Bildung einer Eichgeraden wurden diese Quotienten gegen die dazugehörigen BSA-Konzentrationen aufgetragen. Durch die Ermittlung

der Steigung der Eichgeraden und ihres Schnittpunktes mit der Y-Achse konnte die Proteinkonzentration berechnet werden:

Proteinkonzentration [$\mu\text{g/ml}$] = $(\text{OD}_{590}/\text{OD}_{450} - \text{Y-Achsenschnittpunkt})/\text{Steigung der Eichgerade}$

2.8.3 SDS-Page

Die Größenfraktionierung von Proteinen erfolgte in diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamidgelen. Für das Polyacrylamidgel wurde zuerst das Trenngel gegossen und mit H_2O überschichtet. Auf das polymerisierte Trenngel wurde nun das Sammelgel gegossen, welches mit $100\mu\text{g}$ Protein, das mit 6x SDS-Probenpuffer versetzt und für 6 min bei 80°C denaturiert worden war, beladen wurde. Die Elektrophorese wurde mit 10 mA in SDS-Elektrophorese-Puffer gestartet. Sobald die Bromphenolblau-Bande des Probenpuffers das Trenngel erreicht hatte, wurde die Stromstärke auf 20mA erhöht.

<u>Trenngel (8%, 10ml):</u>	4x Tris-Cl/SDS, pH 8,8 (1,5M Tris-Cl; 0,4% SDS)	2,5 ml
	H_2O	5,4 ml
	40% Acrylamid	2,0 ml
	10% $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$	50 μl
	TEMED	5 μl
<u>Sammelgel (10ml):</u>	4x Tris-Cl/SDS, pH 6,8 (0,5M Tris-Cl; 0,4% SDS)	2,5 ml
	H_2O	6,6 ml
	40% Acrylamid	0,8 ml
	10% $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$	100 μl
	TEMED	10 μl
<u>5x SDS-Elektrophorese-Puffer (pH 8,3):</u>	Tris	0,125 M
	Glycin	0,96 M
	SDS	0,5 %
	H_2O	ad 1000 ml

<u>6x SDS-Probenpuffer:</u>	4x Tris-Cl/SDS, pH 6,8 (0,5M Tris-Cl; 0,4% SDS)	7 ml
	Glycerol	24 %
	SDS	8 %
	DTT	0,2 M
	Bromphenolblau	0,012 %
	H ₂ O	ad 10 ml

2.8.4 Westernblot

Die Proteine wurden im Anschluss an die Elektrophorese durch Elektro-Transfer bei 70 mA für 2 h auf eine Hybond-P PVDF-Membran (Amersham Biosciences) übertragen. Dazu wurden zuerst drei mit Transferpuffer getränkte Whatman Papiere luftblasenfrei auf die Anode der Blotapparatur gelegt. Nun folgte die PVDF-Membran, welche vorher zuerst mit Methanol getränkt und mit H₂O für 5 min gewaschen und anschließend für 20 min in Transferpuffer inkubiert worden war. Als nächstes wurde das für 20 min in Transferpuffer inkubierte Proteingel auf die Membran gelegt. Das Gel wurde nun wiederum mit drei mit Transferpuffer getränkten Whatman Papieren bedeckt und der Transfer wurde gestartet. Zur Kontrolle der Effizienz des Transfers diente ein vorgefärbter Proteinmarker zur Molekulargewichtsbestimmung (Invitrogen). Die Membran wurde über Nacht bei 4 °C in 0,1 % I-Block (Tropix) geblockt. Im Anschluss daran wurde der primäre Anti-V5-Antikörper 1:5000 in TBST (TBS-Puffer + 0,1% Tween 20) verdünnt zugegeben und für 1 h bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln inkubiert. Nach dreimaligem Waschen für je 10 min in TBST wurden die entsprechenden sekundären Antikörper 1:30.000 in TBST verdünnt zugegeben und für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Membran wurde dreimal für 10 min in TBST gewaschen. Die Detektion der mit alkalischer Phosphatase konjugierten Antikörper erfolgte mit NBT-BCIP (Sigma). Zunächst wurde die Membran für 5 min in AP-Puffer inkubiert, dann wurden 0,5 ml NBT/BCIP-Lösung auf die Membran gegeben. Die Färbereaktion wurde durch Zugabe von 1 mM EDTA in PBS gestoppt, die Membran unter fließendem Wasser gewaschen und bei 60 °C getrocknet.

<u>TBS-Puffer (Tris buffered saline, pH 7,8):</u>	Tris	50 mM
	NaCl	150 mM
<u>Transferpuffer (pH 8,3-8,4):</u>	Tris	3 g
	Glycin	14,4 g
	Methanol	150 ml
	H ₂ O	ad 1000 ml
<u>AP-Puffer (pH 9,5):</u>	Tris	100 mM
	NaCl	100 mM
	MgCl ₂	5 mM

2.8.5 Coomassie-Färbung von Polyacrylamidgelen

Im Anschluss an den Western Blot wurde das Proteingel in Coomassielösung (Sigma; 0,006% Brilliant Blue R-250 in 10% Essigsäure) unter Schwenken für 15 min bei Raumtemperatur gefärbt. Coomassie bindet dabei unspezifisch an die Proteine und färbt diese blau. Die überschüssige Farbe wurde durch 5-minütiges Erhitzen in H₂O entfernt. Das Gel wurde anschließend unter Vakuum auf einer Wärmeplatte für 1 Stunde getrocknet.

2.9 Elektrophysiologische Messungen

2.9.1 Heterologe Expression von OsAKT1 in HEK293 Zellen

HEK293-Zellen sind humane embryonale Nierenzellen (engl.: human embrionic kidney). Die 293-Zelllinie stellt eine etablierte menschliche Zelllinie von adhärenenten, fibroblastoiden Zellen dar, die Teile eines viralen Genoms enthält, aber keine infektiösen Viruspartikel erzeugt (Graham, 1977).

2.9.1.1 Kultivierung von HEK293-Zellen

Die HEK293 Zellkultur wurde in 200 ml-Zellkulturflaschen mit M10-Medium kultiviert. Zum Umsetzen der Zellen nach 3-4 Tagen wurde die HEK293-Zellkultur 2x mit 10 ml PBS gewaschen und die Zellen wurden nach ca. 3 min Behandlung mit 1 ml Trypsin (ICN) durch leichtes Schlagen von der Zellkulturflasche abgelöst und mit 5 ml M10 versetzt. Diese Zellsuspension wurde für 4 min bei Raumtemperatur mit 400 g

abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen wurden in 10 ml M10 resuspendiert. Nachdem die Zellzahl bestimmt worden war, wurden $1-2 \cdot 10^6$ Zellen mit 15 ml M10-Medium versetzt und bei leicht geöffnetem Deckel bei 37 °C und 5% CO₂ kultiviert.

<u>M10 Medium:</u>	DMEM (Dulbecco's Mod Eagle Medium, Gibco BRL)	500 ml
	200mM L-Glutamin (Gibco BRL)	5 ml (1%)
	Fetal Calf Serum (FCS)	50 ml (10%)
	10000U/ml Penicillin/Streptomycin (Gibco BRL)	5 ml (1%)

<u>PBS (Phosphate buffered saline, pH 7,3-7,4):</u>	NaCl	137 mM
	KCl	3 mM
	Na ₂ HPO ₄	10 mM
	KH ₂ PO ₄	1,8 mM

2.9.1.2 Transfektion von HEK293-Zellen nach der Calciumphosphat-Methode

Am Tag vor der Transfektion wurden $2-4 \cdot 10^6$ Zellen in 1,8ml M-10 Medium in 6-well Kulturschalen (Nunc Brand Products, Nunclon Surface) ausgesät und über Nacht bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert.

10µg DNA wurden mit sterilen ddH₂O in einem 1,5ml Reaktionsgefäß auf 60µl gebracht. Nun wurden 20µl 1M CaCl₂ hinzugefügt und gut durchmischt. Nach der Zugabe von 80µl 2xBBS wurde mit einer Pipette 2-3x Luft in den Ansatz geblasen. Der DNA-Mix wurde für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert und danach tropfenweise auf die Zellen gegeben. Hier präzipitiert der Calcium-DNA-Komplex auf die HEK293-Zellen und kann von diesen aufgenommen werden. Die Zellen wurden über Nacht bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert.

<u>2 x BBS (pH 6,95 – 6,96):</u>	BES	50 mM
	NaCl	280 mM
	Na ₂ HPO ₄	1,5 mM

2.9.1.3 Vorbereitung der HEK293-Zellen für elektrophysiologische Messungen

Runde Objektträger wurden in Ethanol getaucht, kurz abgeflammt, in 24-well-Schalen überführt und für 12 h in Poly-L-Lysin (0,1% w/v, Sigma) inkubiert. Danach wurde das Poly-L-Lysin entfernt und die Objektträger wurden zweimal mit PBS gewaschen. Nach dem Vorlegen von 100µl M10-Medium pro Vertiefung standen die Schalen zum Umsetzen der Zellen zur Verfügung. Nach dem Entfernen des Mediums wurden die Zellen je einmal mit PBS und PBS-EDTA (PBS + 0,5 g/l EDTA) gewaschen. Durch die Zugabe von 150µl Trypsin pro Vertiefung und leichtes Klopfen an der Schale wurden die Zellen vom Boden der Schale abgelöst und anschließend in 1,8 ml M10-Medium resuspendiert. Je 300 µl der Zellsuspension wurden nun auf die Objektträger überführt. Die Zellen wurden über Nacht bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert und standen am nächsten Tag für elektrophysiologische Messungen zur Verfügung.

2.9.1.4 Patch-Clamp-Technik an HEK293-Zellen

Zur elektrophysiologischen Charakterisierung von OsAKT1 wurden HEK293-Zellen mit OsAKT1/pcDNA 3.1D/V5-His-TOPO transfiziert (2.9.1.2) und mit Hilfe der Patch-Clamp-Technik analysiert. Um die transfizierten Zellen identifizieren zu können, wurden die Zellen zusätzlich zur Transformation mit OsAKT1/pcDNA3.1D/V5-His-TOPO noch mit pTracer, der die codierende Sequenz für GFP (Green Fluorescent Protein) trägt, cotransfiziert. Die GFP-Fluoreszenz wurde mit Hilfe eines inversen Mikroskops (Axiovert 35, Zeiss, Jena, Germany) mit Bandpassfilter (450-490 nm) detektiert.

Alle Patch-clamp-Messungen an HEK 293-Zellen wurden von Frau Dr. Sonja Stölzle (Julius-v.-Sachs-Institut, Uni Würzburg) durchgeführt. Die Ströme wurden an einem EPC-9 Patch-clamp-Verstärker (HEKA, Lambrecht, Germany) aufgenommen. Die Standard-Badlösung enthielt 100 mM K-Gluconat, 10 mM Mes/Tris pH 5.6, die Osmolarität wurde mit D-Sorbitol auf $\pi = 350 \text{ mosmol}\cdot\text{kg}^{-1}$ eingestellt. Die Pipettenlösung bestand aus 150 mM K-Gluconat, 2 mM MgCl₂, 10 mM EGTA, 10 mM HEPES/Tris pH 7.4 und 50 mM Glucose, die Osmolarität wurde mit D-Sorbitol auf $\pi = 350 \text{ mosmol}\cdot\text{kg}^{-1}$ eingestellt. Um die Selektivität von OsAKT1 zu untersuchen, wurde in der Badlösung K-Gluconat durch 100 mM NH₄Cl oder 100 mM Na-Gluconat ersetzt. Zum Überprüfen der pH-Abhängigkeit von OsAKT1

wurde die Standard-Badlösung mit 10 mM Hepes/Tris auf pH 7,4 eingestellt. Um die Blockierung von OsAKT1 durch Ca^{2+} bzw. Cs^+ zu untersuchen, wurde eine Badlösung benutzt, die zusätzlich zur Standardzusammensetzung noch 20 mM CaCl_2 bzw. 1 mM CsCl enthielt. Zur Analyse der Abhängigkeit von OsAKT1 von der Kaliumkonzentration wurde alternativ eine Badlösung mit 30 mM K-Gluconat benutzt.

2.9.2 *In Vivo*- Messungen an Wurzelprotoplasten aus *Oryza sativa*

2.9.2.1 Isolierung von Wurzelhaarprotoplasten

Sowohl die elektrophysiologischen Messungen an Reis-Wurzelprotoplasten als auch deren Präparation wurden von Frau Dr. Natalya Ivashikina (Julius-v.-Sachs-Institut, Uni Würzburg) durchgeführt. Wurzelhaarprotoplasten wurden durch enzymatischen Verdau von 4-5 Tage alten Primärwurzeln gewonnen. Im Anschluss an die Inkubation der Wurzeln für 1,5 h in Enzymlösung wurden die Protoplasten, die aus Wurzelhaaren und Epidermiszellen entlassen worden waren, über ein Nylonnetz (Porengröße 20 μm) filtriert und zweimal mit 1 mM CaCl_2 -Puffer ($\pi = 350 \text{ mosmol}\cdot\text{kg}^{-1}$, pH 5,6) gewaschen. Die Protoplastensuspension wurde eisgekühlt aufbewahrt und Aliquots wurden für elektrophysiologische Experimente oder RT-PCR-Analysen verwendet.

<u>Enzymlösung:</u>	Cellulase (Onozuka R 10)	0,8 %
	Pectolyase (Sigma)	0,1 %
	BSA (Serva)	0,5 %
	Polyvinylpyrrolidon (Sigma)	0,5 %
	CaCl_2	1 mM
	MES/Tris (pH 5,6)	10 mM

Die Osmolalität der Lösung wurde mit D-Sorbitol auf $300 \text{ mosmol}\cdot\text{kg}^{-1}$ eingestellt.

2.9.2.2 Patch-Clamp-Technik an Wurzelprotoplasten aus *Oryza sativa*

Zur elektrophysiologischen Charakterisierung von OsAKT1 wurden Protoplasten aus Wurzelhaaren isoliert (2.9.2.1) und mit Hilfe der Patch-Clamp-Technik analysiert. Die Ströme wurden an einem EPC-7-Verstärker (List-Medical-Electronic, Darmstadt, Germany) in der „whole cell“- oder „outside out“-Konfiguration aufgenommen. Die

Standard-Badlösung enthielt, 30 mM K-Gluconat, 1 mM CaCl₂ und 10 mM MES/Tris (pH 5,6). Die Standard-Pipettenlösung bestand aus 150 mM K-Gluconat, 2 mM MgCl₂, 10 mM EGTA, 2 mM Mg-ATP und 10 mM Hepes/Tris (pH 7,4). Die Osmolarität aller Lösungen wurde mit D-Sorbitol auf $\pi = 300 \text{ mosmol} \cdot \text{kg}^{-1}$ eingestellt. Um die Selektivität von OsAKT1 zu untersuchen, wurde in der Badlösung K-Gluconat durch 30 mM NH₄Cl oder 30 mM Na-Gluconat ersetzt. Zum Überprüfen der pH-Abhängigkeit von OsAKT1 wurde die Standard-Badlösung mit 10 mM Hepes/Tris auf pH 7,4 eingestellt. Um die Blockierung von OsAKT1 durch Ca²⁺ bzw. Cs⁺ zu untersuchen, wurde die Kalziumkonzentration auf 20 mM CaCl₂ erhöht, bzw. eine Badlösung benutzt, die zusätzlich zur Standardzusammensetzung noch 1 mM CsCl enthielt. Zur Analyse der Abhängigkeit von OsAKT1 von der Kaliumkonzentration wurde eine Badlösung mit 100 mM K-Gluconat benutzt.

3 Ergebnisse

In vorangegangenen Experimenten konnte gezeigt werden, dass die Expression des K^+ -Aufnahmekanals *ZMK1* durch physiologisch aktive Auxine induziert wird (Fuchs, 1999; Philippar, 1999). Die Expression von *ZMK1* folgt auch der endogenen IAA-Umverteilung während des Gravitropismus: Der gravitropen Krümmung geht die Akkumulation von IAA und anschließend die Erhöhung des *ZMK1*-mRNA-Gehalts in der stärker wachsenden unteren Koleoptilenhälfte voraus (Philippar, 1999). In den im Folgenden beschriebenen Experimenten sollte nun untersucht werden, ob die Expression von *ZMK1* ebenfalls durch die IAA-Umverteilung während des Phototropismus der Maiskoleoptile beeinflusst wird.

3.1 Einfluss phototroper Stimulation auf die Auxinverteilung und Expression von *ZMK1* in Maiskoleoptilen

3.1.1 Differentielle Expression von *ZMK1* während des Phototropismus

Es ist bekannt, dass der phototropen Krümmung der Graskoleoptile ebenso wie der gravitropen Reaktion eine Umverteilung des endogenen Auxins auf die stärker wachsende Seite vorausgeht (Iino, 1991). Um zu untersuchen, ob *ZMK1* auch während des Phototropismus entsprechend des Auxingradienten differentiell exprimiert wird, wurden Maiskeimlinge unterschiedlich lange (0, 30, 60 und 90 min) einseitig mit blauem Licht bestrahlt (450 nm , $10\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-2}$). Die Koleoptilen wurden dann in Licht- und Schattenseite geteilt und der *ZMK1*-Transkriptgehalt in den Gewebehälften durch quantitative Echtzeit-RT-PCR bestimmt (Abb. 11).

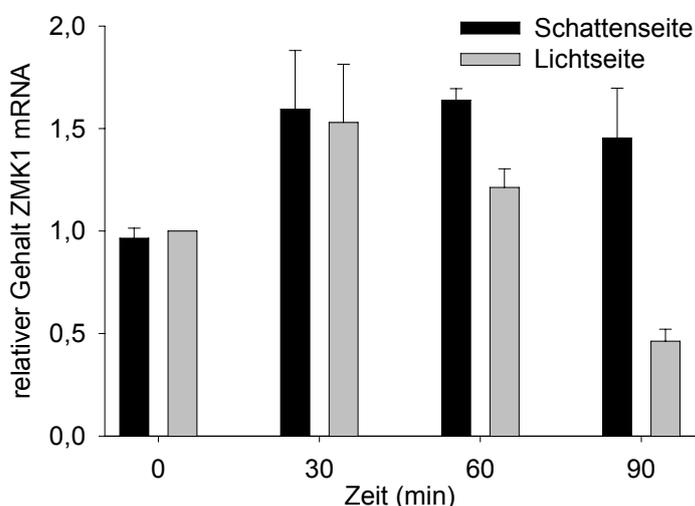


Abb. 11. Differentielle Expression von *ZMK1* in photostimulierten Keimlingen.

Relativer Gehalt an *ZMK1*-Transkripten in belichteter (graue Balken) und lichtabgewandter Koleoptilenhälfte (schwarze Balken) nach 0, 30, 60, 90 min einseitiger Bestrahlung mit Blaulicht. Der Gehalt an *ZMK1* mRNA wurde durch quantitative RT-PCR (Light Cycler) bestimmt und mittels eines Aktin-Signals normiert ($n = 3$, $MW \pm SF$, relative Einheiten).

In Reaktion auf die Belichtung stieg der Gehalt an *ZMK1*-Transkripten in beiden Koleoptilenhälften während der ersten 30 min auf das etwa 1,5-fache des Ausgangswertes an. Im weiteren Verlauf sank der Gehalt an *ZMK1*-mRNA auf der belichteten, wachstumsinhibierten Seite stetig ab, während die Expression von *ZMK1* auf der stärker wachsenden Schattenseite konstant blieb. Ein signifikanter Unterschied im *ZMK1*-mRNA-Gehalt zwischen Licht- und Schattenseite war 60 min nach dem Einsetzen der Belichtung erkennbar. Nach 90 min Photostimulation war die Expression von *ZMK1* auf der Schattenseite etwa 3-fach höher als in der belichteten Koleoptilenhälfte. Es ist zu beachten, dass durch die hier beschriebene Vorgehensweise stets der in der Literatur beschriebene sogenannte "zeitabhängige Phototropismus" (time-dependent phototropism, TDP) ausgelöst wurde. Diese Krümmungsreaktion auf eine Blaulichtquelle hin hängt im Gegensatz zum ersten und zweiten Puls-induzierten positiven Phototropismus (first and second pulse-induced positive phototropism, fPIPP und sPIPP) weniger von der Photonenflussrate und somit der Intensität der Lichtquelle, sondern hauptsächlich von der Zeitdauer der Belichtung ab (zum Überblick Iino, 2001). Somit wird durch den TDP am ehesten die in der freien Natur vorkommende Wachstumsreaktion von Pflanzen auf dauerhaft geänderte Lichtverhältnisse beschrieben.

3.1.2 Differentielle Expression von *ZMK1* während der Photostimulation „ohne Schwerkraft“

In gravistimulierten Maiskoleoptilen ist die Menge an *ZMK1* Transkripten in der wachstumsstimulierten unteren Flanke nach 90 min bis zu siebenfach höher als in der oberen Koleoptilenhälfte, wohingegen der *ZMK1*-mRNA-Gradient in photostimulierten Keimlingen nur ca. 1:3 betrug. Da während der phototropen Stimulation immer noch die Schwerkraft auf die Keimlinge wirkt, konnte vermutet werden, dass die Gravitation einer weiteren Erhöhung der differentiellen *ZMK1*-Expression und einer stärkeren Krümmung zur Lichtquelle entgegenwirkte. Um zu untersuchen, ob die differentielle Expression von *ZMK1* und die Koleoptilenkrümmung in photostimulierten Keimlingen "ohne" Einfluss der Erdschwerkraft stärker ausgeprägt sind, wurden die Pflanzen auf dem Blue Light Cycler ("BLC", s. 2.1.3) belichtet. Dieser Klinostat ermöglicht eine Photostimulation der Koleoptilen bei nomineller Abwesenheit eines Schwerereizes (s. Abb. 9). Nach

Photostimulation auf dem BLC sollte demzufolge der Krümmungswinkel der Keimlinge deutlich erhöht sein.

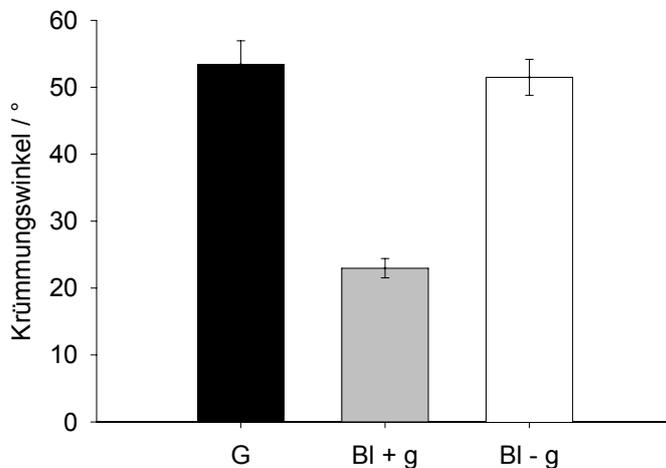


Abb. 12. Krümmungswinkel von Maiskeimlingen nach verschiedenen tropistischen Stimuli.

Krümmungswinkel von Maiskoleoptilen 4h nach dem Beginn der Gravistimulation (G, schwarze Balken), Photostimulation (BI+g, graue Balken) und Photostimulation auf dem BLC (BI-g, weiße Balken).

Zunächst wurde der Krümmungswinkel von gravi- und photostimulierten Maiskeimlingen mit dem solcher Pflanzen verglichen, die auf dem BLC photostimuliert worden waren (Abb. 12). Gravitrop gereizte Keimlinge wiesen 4h nach dem Einsetzen des Gravistimulus einen Krümmungswinkel von $53.4 \pm 3.5^\circ$ ($n = 32$, $MW \pm SF$) auf, wohingegen phototrop stimulierte Pflanzen nur um $23 \pm 1.4^\circ$ ($n = 30$, $MW \pm SF$) gekrümmt waren. Keimlinge, die auf dem Klinostaten belichtet wurden, zeigten eine erheblich stärkere Reaktion (Krümmung um $51.5 \pm 2.7^\circ$, $n = 32$, $MW \pm SF$), die mit derjenigen der gravistimulierten Pflanzen vergleichbar war.

Diese Ergebnisse legten den Schluss nahe, dass die Größe des Krümmungswinkels mit der Ausprägung des *ZMK1*-Gradienten in den beiden unterschiedlich stark wachsenden Flanken der Koleoptile zusammenhängt. Die Schwerkraft könnte demzufolge hemmend auf die phototrope Krümmung wirken, indem durch eine entgegengesetzte differentielle Gravistimulation ein stärkerer Gradient der *ZMK1* Expression durch den Lichtstimulus verhindert wird. Umgekehrt lag es nahe, zu vermuten, dass die stärkere phototrope Krümmung auf dem Klinostaten durch eine ausgeprägtere differentielle Expression von *ZMK1* begünstigt wird. Um diese Hypothese zu prüfen, wurde die Expression von *ZMK1* mittels quantitativer RT-PCR in Maiskeimlingen untersucht, die auf dem BLC, also "ohne" den Einfluss der Schwerkraft einseitig mit blauem Licht bestrahlt worden waren (Abb. 13).

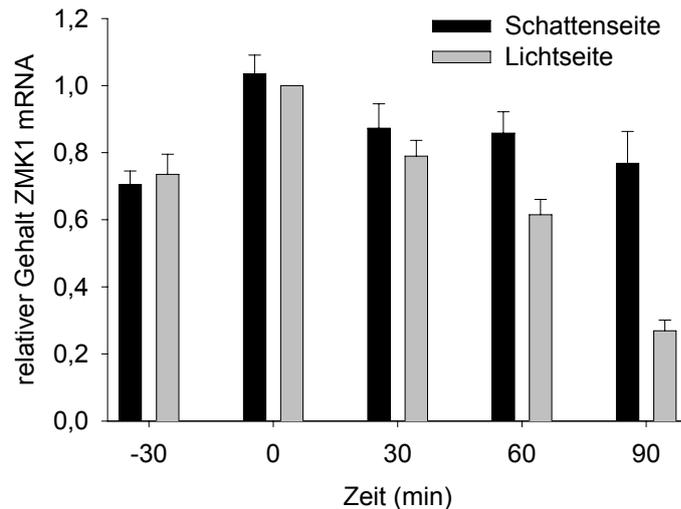


Abb. 13. Differentielle Expression von *ZMK1* in photostimulierten Keimlingen “ohne“ Einfluß der Gravitation.

Relativer Gehalt an *ZMK1* Transkripten in belichteter (graue Balken) und lichtabgewandter Koleoptilenhälfte (schwarze Balken) nach 0, 30, 60, 90 min einseitiger Blaulicht-Bestrahlung und gleichzeitiger Rotation auf dem Klinostaten (BLC). Die Rotation begann bereits 30 min vor dem Einsetzen der Belichtung. Der Gehalt an *ZMK1* mRNA wurde durch quantitative RT-PCR bestimmt und mittels eines Aktin-Signals normiert ($n = 3, \pm \text{SF}$, relative Einheiten).

Es zeigte sich, dass die *ZMK1*-Transkriptmenge zunächst nach dem Einsetzen der Rotation des BLC gleichmäßig auf beiden Seiten der Koleoptile zunahm. Nach dem Beginn der Belichtung sank die Menge an *ZMK1*-mRNA in der wachstumsinhibierten belichteten Hälfte stetig ab, wohingegen die *ZMK1*-Expression auf der stärker wachsenden lichtabgewandten Seite zunächst geringfügig sank und im weiteren Verlauf des Experiments konstant blieb. Auch hier konnte, wie schon bei den unter “normalen“ Schwerkraftbedingungen photostimulierten Pflanzen, ein signifikanter Unterschied im *ZMK1*-mRNA-Gehalt zwischen Licht- und Schattenseite nach 60 min detektiert werden. Der *ZMK1*-mRNA-Gradient war nach 90 min allerdings nicht verschieden von dem in photostimulierten Keimlingen. Auch nach der Belichtung auf dem BLC war die Expression von *ZMK1* auf der Schattenseite nur ca. 3-fach höher als in der belichteten Koleoptilenflanke, so dass die zuvor aufgestellte Hypothese zunächst nicht im Einklang mit den bisherigen Ergebnissen stand.

3.1.3 Zeitlich und räumlich aufgelöste IAA-Umverteilung in phototrop stimulierten Koleoptilen

Da sowohl der gravi- als auch der phototropen Krümmung der Graskoleoptile eine Umverteilung des endogenen Auxins vorausgeht (Iino, 1991), sollte im Folgenden überprüft werden, ob diese IAA-Umverteilung durch verschiedene Schwerkraftbedingungen beeinflusst wird. Hierfür wurde der Gehalt an freier IAA im Koleoptilengewebe von unter normalen Gravitationsverhältnissen und auf dem BLC photostimulierten Maiskeimlingen in Abhängigkeit von der Stimulationsdauer gemessen (Abb. 14-16). Diese Analysen erfolgten mittels GC-MS (s. 2.3) und wurden von Frau Dr. Karin Ljung in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Göran Sandberg, Institut für Forstgenetik und Pflanzenphysiologie in Umeå, Schweden, durchgeführt. Der IAA-Gehalt wurde über einen Zeitraum von 240 min aufgezeichnet.

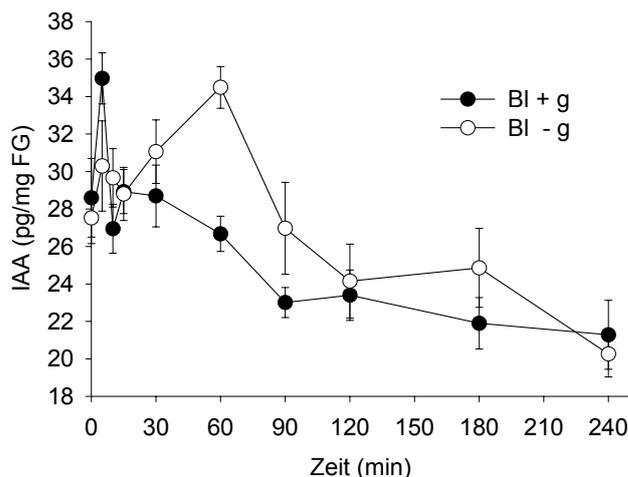


Abb. 14. IAA-Konzentration in phototrop stimulierten Maiskoleoptilen.

Zeitverlauf der IAA-Konzentration in der gesamten Koleoptile nach phototroper Stimulation unter normalen Schwerkraftbedingungen (BI+g, ●) oder auf dem rotierenden BLC (BI-g, ○); n = 3, MW ± SF.

Zunächst wurde die Auxinkonzentration in ganzen Koleoptilen nach Photostimulation unter verschiedenen Schwerkraftbedingungen ermittelt (Abb 14). Ausgehend von einem initialen Wert von $28 \pm 0,5$ pg IAA/mg FG stieg die IAA-Konzentration innerhalb der ersten 5 min nach Beginn der Belichtung an, wobei dieser Anstieg in den unter normaler Schwerkraft behandelten Pflanzen erheblich ausgeprägter war als in den auf dem BLC belichteten Keimlingen. Danach nahm die Konzentration an freiem Auxin in den unter normaler Gravitation photostimulierten Pflanzen stetig ab und erreichte nach 90 min ein basales Niveau von $28 \pm 0,8$ pg IAA/mg FG. Im Gegensatz hierzu nahm in den auf dem BLC behandelten Keimlingen (ohne Schwerkraft) die IAA-Gesamtmenge stetig zu und zeigte nach 60 min ein Maximum

von $34,5 \pm 1,1$ pg IAA/mg FG. Im weiteren Verlauf des Experiments sank auch hier die Menge an freier IAA und pegelte sich auf einen Grundgehalt von $24,1 \pm 2$ pg IAA/mg FG ein.

Um die IAA-Umverteilung zwischen wachstumsgehemmter und schnell wachsender Koleoptilenseite verfolgen zu können, wurde nun die IAA-Konzentration auf Licht- und Schattenseite photostimulierter Maiskoleoptilen untersucht (Abb. 15a und 15b).

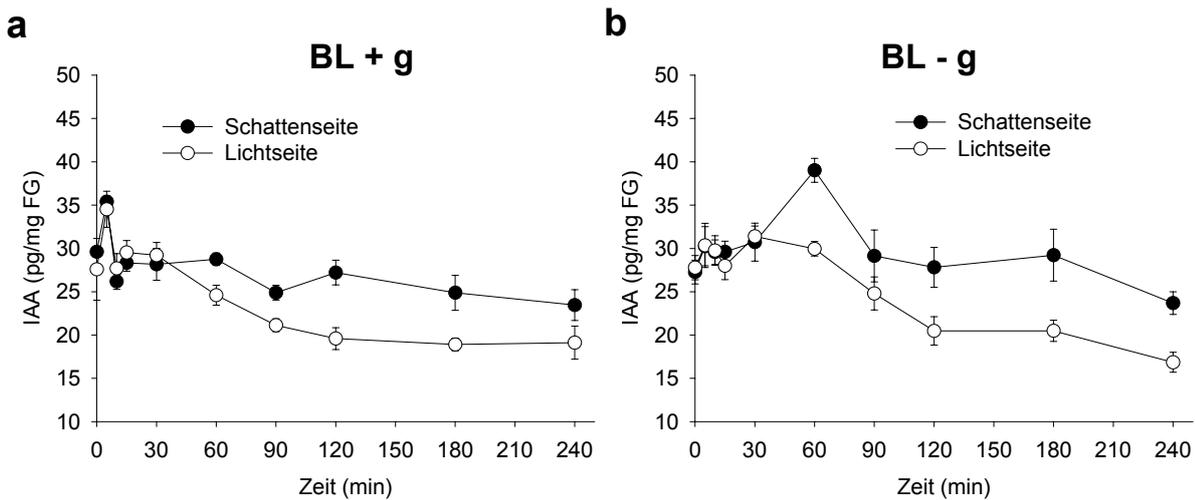


Abb. 15. Zeitabhängige IAA-Umverteilung in phototrop stimulierten Maiskoleoptilen. (a) IAA-Konzentration auf Schatten- (●) und Lichtseite (○) nach Blaulichtbehandlung (BI+g). (b) IAA-Konzentration auf Schatten- (●) und Lichtseite (○) nach Blaulichtbehandlung auf dem rotierenden BLC (BI-g); n = 3, MW ± SF.

In Pflanzen, die unter normalen Schwerkraftbedingungen belichtet worden waren, stieg die Konzentration an freier IAA innerhalb von 5 min nach Einsetzen des Reizes auf beiden Seiten an und kehrte dann auf etwa das Ausgangsniveau zurück (Abb. 15a). Im weiteren Verlauf der Photostimulation sank der Auxingehalt in der wachstumsinhibierten belichteten Koleoptilenhälfte weiter ab, während die IAA-Konzentration auf der stärker wachsenden Schattenseite etwa konstant blieb. Eine Umverteilung des endogenen Auxins war 60 min nach dem Einsetzen der Belichtung detektierbar. In Keimlingen, die auf dem rotierenden BLC "ohne" den Einfluss der Gravitation photostimuliert worden waren, war der initiale Anstieg der Auxinkonzentration in beiden Hälften weniger ausgeprägt (Abb. 15b). Stattdessen blieb der IAA-Gehalt bis 30 min nach Beginn des Experiments auf beiden Seiten der Koleoptile konstant und fiel danach in der belichteten Hälfte stetig ab, bis nach 120 min ein basaler IAA-Gehalt von $20,5 \pm 1,6$ pg IAA/mg FG erreicht wurde. Auf der Schattenseite jedoch stieg die Auxinkonzentration bis auf $39,0 \pm 1,4$ pg IAA/mg FG

an und nahm erst 60 min nach Beginn der Belichtung wieder ab. Auch in den auf dem BLC photostimulierten Pflanzen konnte also eine Umverteilung des endogenen Auxins nach 60 min beobachtet werden. Diese IAA-Umverteilung war aber im Gegensatz zu den unter normalen Schwerkraftbedingungen belichteten Keimlingen auf einen deutlichen Anstieg der Auxinkonzentration in der wachstumsstimulierten Schattenseite zurückzuführen.

Um zu untersuchen, wo in der Koleoptile die für diesen enormen Konzentrationsanstieg verantwortliche IAA-Freisetzung stattfindet, wurde der Gehalt an freier IAA auf Licht- und Schattenseite der Koleoptilspitze (0-5 mm) und in der Koleoptilenbasis (5-20 mm) unter verschiedenen Schwerkraftbedingungen ermittelt (Abb. 16).

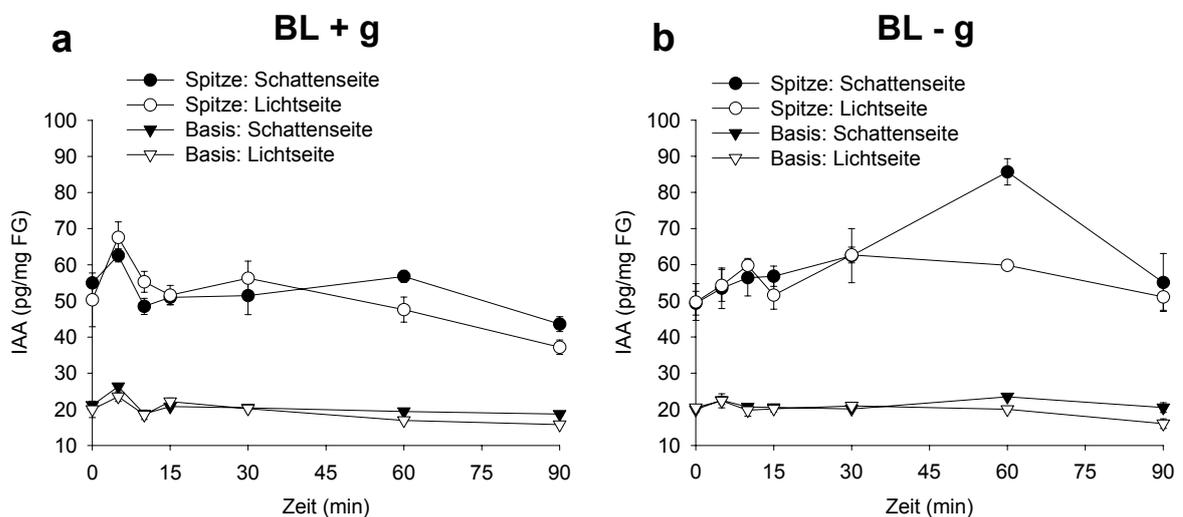


Abb. 16. Zeitabhängige IAA-Umverteilung in Spitze und Basis phototrop stimulierter Maiskoleoptilen.

(a) IAA-Konzentration auf Schatten- (●) und Lichtseite (○) der Koleoptilenspitze oder auf Schatten- (▼) und Lichtseite (△) der Koleoptilenbasis nach Blaulichtbehandlung (Bl+g). (b) IAA-Konzentration auf Schatten- (●) und Lichtseite (○) der Koleoptilenspitze oder auf Schatten- (▼) und Lichtseite (△) der Koleoptilenbasis nach Photostimulation auf dem BLC (Bl+g) ; n = 3, MW ± SF.

Wie bereits von Philippar et al. (1999) für gravistimulierte Maiskeimlinge gezeigt, war die Auxinkonzentration zu Beginn des Experiments in der Koleoptilenspitze am höchsten (50 ± 5 pg/mg FG) und nahm zur Koleoptilenbasis hin ab (20 ± 2 pg/mg FG). In unter normalen Schwerkraftbedingungen photostimulierten Koleoptilen stieg der IAA-Gehalt innerhalb der ersten 5 min nach Beginn der Belichtung sowohl in der Spitze als auch in der Basis an und fiel dann sofort wieder auf das Ausgangsniveau ab (Abb. 16a). Während im unteren Koleoptilenabschnitt

nur eine sehr geringe Umverteilung des endogenen Auxins in die Schattenseite festgestellt werden konnte, war die IAA-Konzentration in der Koleoptilenspitze nach 60 min auf der Schattenseite deutlich höher als in der belichteten Flanke. In Keimlingen, die auf dem BLC belichtet worden waren, konnte in der Koleoptilenbasis ebenfalls nur ein sehr schwach ausgeprägter IAA-Gradient detektiert werden (Abb. 16b). In der Koleoptilenspitze hingegen stieg die Auxinkonzentration in beiden Hälften zunächst bis auf etwa 63 pg/mg FG leicht an und fiel dann auf der wachstumsinhibierten Lichtseite wieder auf den ursprünglichen Wert zurück. Auf der stärker wachsenden Schattenseite der Koleoptilenspitze jedoch erreichte der Gehalt an freier IAA nach 60 min ein Maximum von $85,7 \pm 3,6$ pg/mg FG. Aufgrund dieser Ergebnisse ist davon auszugehen, dass der enorme Auxingradient in photostimulierten Koleoptilen im BLC-Experiment (s. Abb 15b) maßgeblich durch die Umverteilung oder differentielle Freisetzung von IAA in der äußersten Koleoptilenspitze verursacht wird.

3.1.4 Lokalisation der *ZMK1*-mRNA-Umverteilung innerhalb der Koleoptile

Ausgehend von der Annahme, dass die transkriptionelle Aktivierung des *ZMK1*-Gens nach Überschreiten eines Schwellenwertes bezüglich der endogenen IAA-Konzentration erfolgt, stellte sich nun die Frage, ob die differentielle Expression von *ZMK1* – ebenso wie die Umverteilung endogenen Auxins – in der Koleoptilenspitze am deutlichsten ist. Hierfür wurde mittels quantitativer RT-PCR die Expression von *ZMK1* in Koleoptilenspitze und –basis von Maiskeimlingen untersucht, die unter verschiedenen Schwerkraftbedingungen einseitig mit blauem Licht (450 nm , $10\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-2}$) bestrahlt worden waren. Als interne Kontrolle wurde hier zusätzlich die Expression des Blaulichtrezeptors *PHOT1* in Koleoptilenspitze und –basis verfolgt, da bereits gezeigt werden konnte, dass dieses Protein hauptsächlich in der photosensitiven Koleoptilenspitze lokalisiert ist (Hager und Brich, 1993; Kaldenhoff und Iino, 1997). In unbehandelten Kontrollpflanzen wurden sowohl *ZMK1* als auch *PHOT1* überwiegend in der Koleoptilenspitze exprimiert (Abb. 17). Die Menge an *ZMK1*-Transkripten in der Koleoptilenbasis war im Vergleich zur Spitze um 55% reduziert, *PHOT1* mRNA wurde sogar fast ausschließlich in den obersten 5mm der Keimlinge detektiert. In der Basis betrug die *PHOT1*-Transkriptmenge nur etwa 15% des in der Spitze ermittelten Wertes. Vor Beginn der Blaulichtbehandlung waren die

Transkripte beider Gene erwartungsgemäß in gleicher Menge in den beiden Flanken der Koleoptile vorhanden.

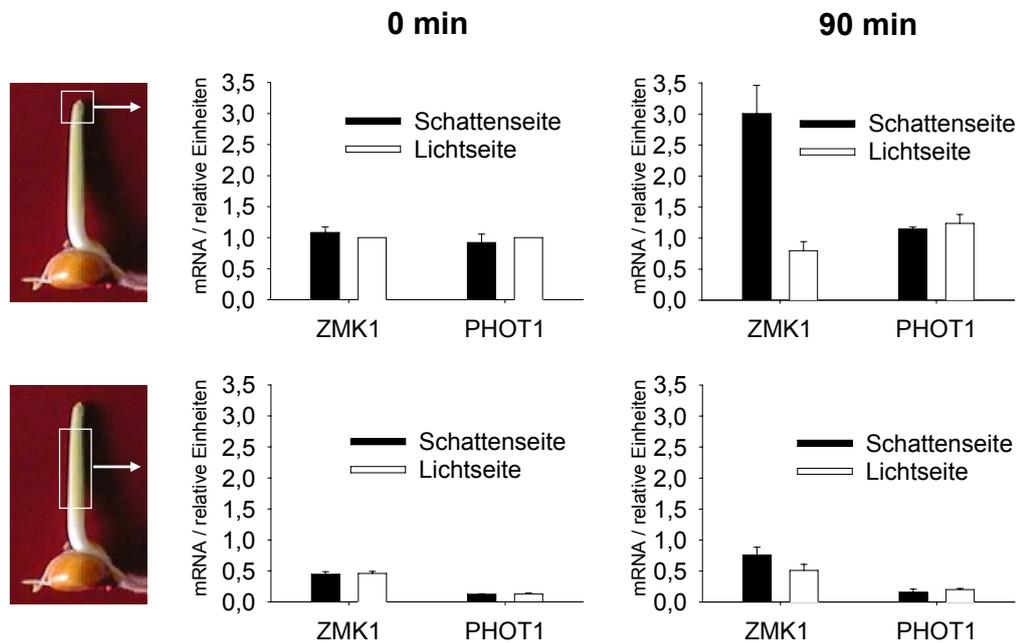


Abb. 17. Lokalisation der *ZMK1*- bzw. *PHOT1*-Expression in photostimulierten Maiskeimlingen.

Relativer Gehalt an *ZMK1* und *PHOT1*-Transkripten auf Schatten- (■) und Lichtseite (□) der Koleoptilenspitze (oben) und –basis (unten) nach Blaulichtbehandlung unter normalen Schwerkraftbedingungen vor Beginn des Experiments (links) und nach 90 min (rechts). Der Gehalt an *ZMK1* und *PHOT1* mRNA wurde durch quantitative RT-PCR bestimmt und mittels eines Aktin-Signals normiert (n = 3, ± SF, relative Einheiten). Die Menge an *ZMK1*- bzw. *PHOT1*-Transkripten in der belichteten Seite der Koleoptilenspitze zu Beginn des Experiments wurde jeweils auf 1 gesetzt, die übrigen Werte relativ hierzu berechnet.

90min nach Beginn der einseitigen Bestrahlung mit Blaulicht blieb die Expression von *PHOT1* in Spitze und Basis unverändert. Die Expression von *ZMK1* hingegen war auf der Schattenseite der Koleoptilenspitze nach 90 min Blaulichtbehandlung etwa dreimal höher als in der Lichtseite. In der Koleoptilenbasis war der *ZMK1*-mRNA-Gradient hingegen signifikant geringer ausgeprägt: Auch hier konnten mehr *ZMK1*-Transkripte auf der wachstumsstimulierten Schattenseite detektiert werden, jedoch nur ca. 1,5-mal mehr als in der belichteten Hälfte.

Zusammenfassend lässt sich damit feststellen, dass die Expression von *ZMK1* der IAA-Umverteilung in der Koleoptilenspitze während des Phototropismus folgt, während die Transkription des Blaulichtrezeptors *PHOT1* durch diesen Prozess nicht beeinflusst wird.

3.1.5 Zeitabhängige differentielle Expression von *ZMK1* unter verschiedenen Schwerkraftbedingungen

Wie in 3.1.1 und 3.1.2 gezeigt, war der Krümmungswinkel gravistimulierter und auf dem BLC photostimulierter Maiskeimlinge 4h nach Beginn des Experiments etwa gleich groß, die differentielle Expression von *ZMK1* in den gravistimulierten Keimlingen jedoch erheblich ausgeprägter. So konnte zunächst unsere Hypothese, dass der während einer tropistischen Krümmung erreichte Winkel mit der Höhe des *ZMK1*-Gradienten korreliert ist, nicht bestätigt werden. Die Expression von *ZMK1* in den beiden Koleoptilhälften war bislang allerdings stets nur innerhalb der ersten 90min nach dem Einsetzen des Schwere- bzw. Lichtreizes verfolgt worden, so dass die Möglichkeit bestand, dass der zeitliche Verlauf der differentiellen *ZMK1*-Expression unter verschiedenen Schwerkraftbedingungen verändert ist. Um diese Hypothese zu prüfen, wurde die Menge an *ZMK1*-Transkripten auf Licht- und Schattenseite photostimulierter Maiskeimlinge unter den beiden Schwerkraftbedingungen während einer Dauer von 4h verfolgt (Abb. 18). Wie bereits in den zuvor beschriebenen Experimenten gezeigt, war die Expression von *ZMK1* 90min nach dem Einsetzen des Lichtreizes auf der Schattenseite etwa dreimal höher als in der wachstumsgehemmten belichteten Koleoptilenflanke, und zwar unabhängig davon, ob die Pflanzen auf dem BLC oder unter dem normalen Einfluss der Gravitation photostimuliert worden waren. 180min nach Beginn der Bestrahlung mit blauem Licht lag das Verhältnis an *ZMK1*-Transkripten zwischen Schatten- und Lichtseite in unter dem normalen Schwerkraftbedingungen belichteten Pflanzen wieder bei 1, d.h., *ZMK1* wurde in den beiden Koleoptilhälften wieder gleich stark exprimiert, obwohl der Lichtreiz andauerte. In den auf dem BLC photostimulierten Pflanzen jedoch war die Expression von *ZMK1* 3h nach Belichtungsbeginn auf der stärker wachsenden Schattenseite 4-5-mal höher als in der Lichtseite, d.h. *ZMK1* wurde immer noch differentiell exprimiert. Dabei war der Gradient an *ZMK1*-Transkripten zwischen den beiden Flanken weiter angestiegen und nun fast so groß wie nach 90min Gravistimulation (6-7-fach höhere *ZMK1*-Expression auf der wachstumsstimulierten Unterseite, s. Fuchs, 1999 und Philippar, 1999). Erst 240min nach Beginn des Experimentes und mit dem Erreichen der maximalen Krümmung waren die *ZMK1*-Transkripte auf Licht- und Schattenseite unter beiden Schwerkraftbedingungen wieder gleich verteilt.

Diese Ergebnisse lassen die Vermutung zu, dass die stärkere Krümmung photostimulierter Keimlinge „ohne“ den Einfluss der Schwerkraft darauf zurückzuführen ist, dass die differentielle Expression von *ZMK1* länger andauert und somit über einen längeren Zeitraum die für die Zellstreckung erforderliche Kaliumaufnahme auf der Schattenseite der Koleoptile ermöglicht wird.

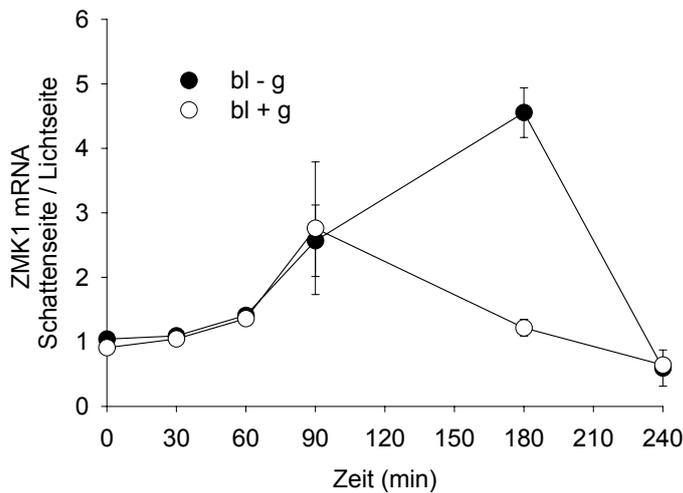


Abb. 18. Zeitabhängige differentielle Expression von *ZMK1* in photostimulierten Maiskoleoptilen unter verschiedenen Schwerkraftbedingungen.

Verhältnis der *ZMK1*-Transkriptmenge zwischen Schatten- und Lichtseite von unter normalen Schwerkraftbedingungen (○) oder auf dem BLC (●) mit blauem Licht bestrahlten Keimlingen nach 0, 30, 60, 90, 180 und 240 min.

3.2 Charakterisierung von OsAKT1 aus Reis

Die Veröffentlichung des Genoms von *Oryza sativa* (Kikuchi, 2003) hat dazu geführt, dass Reis als Modellpflanze zur Untersuchung des pflanzlichen Wachstums und der Aufnahme von Nährstoffen enorm an Bedeutung gewonnen hat. Da Kaliumionen den wichtigsten Makronährstoff in Pflanzen darstellen und in vorangegangenen Studien die Bedeutung von ZMK1 für das auxininduzierte Koleoptilwachstum bereits beschrieben wurde, sollte in der vorliegenden Arbeit auch der ZMK1-orthologe Kaliumkanal aus Reis charakterisiert werden. Eine Analyse der verfügbaren Sequenzen des Reisgenoms deutete die Existenz zweier ZMK1-orthologer Kanäle in Reis an. Zunächst gelang nur die Klonierung eines dieser beiden Gene, welches im Folgenden als *OsAKT1* bezeichnet werden soll.

3.2.1 Klonierung von *OsAKT1*

Da ZMK1 zur AKT1-Unterfamilie pflanzlicher Kaliumkanäle gehört, wurden ausgehend von der vergleichenden Analyse der veröffentlichten Sequenzen des Reisgenoms mit bereits bekannten Sequenzen AKT1-orthologer Kanäle Primer erstellt, die die Amplifikation des Vollängen-cDNA-Moleküls von *OsAKT1* ermöglichen (Abb. 19). Als Matrize diente cDNA, die aus den Wurzeln von 5 Tage alten Reiskeimlingen hergestellt worden war.

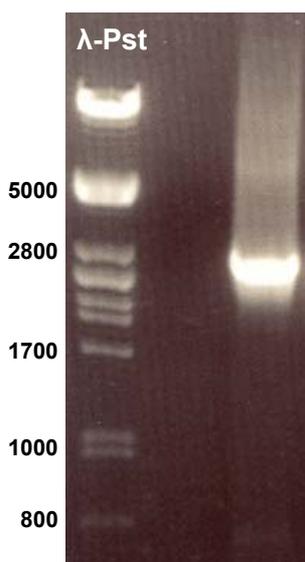


Abb. 19: Spezifisches PCR-Produkt des cDNA-Moleküls von *OsAKT1*.

Gelelektrophoretische Auftrennung der Produkte, die die PCR auf Wurzel-cDNA mit den Primern *OsAKT1* fl fw und *OsAKT1* fl rev ergab. Es zeigte sich als Hauptprodukt nur eine Bande der erwarteten Größe von ca. 2800 bp; λ -Pst: Größenstandard mit Angabe der Fragmentgrößen in bp.

Kurze Zeit später wurde die Klonierung von *OsAKT1* durch eine andere Arbeitsgruppe berichtet (Golldack, 2003), die partielle cDNA-Sequenz wurde unter

OsAKT1	1	MAEWGAARMAACGPWGRNRRVVGAGDAFEASEVRRDGRSRMPACGPWGAGHGGDPALEER
ZMK1	1	MAGCAPSERVASCGPWG-----GRAALES
AKT1	1	-MRGGAALICGQVQ-----DEIE
----- S1 -----		
OsAKT1	61	ELSRDGSYHSISSAIILPSPGARSNRRIKLRRFIISPYDRYRIWETFLLIVLVVYSAWVSP
ZMK1	24	ELSWDGSYHSISSGILPSLGGARSNRRVKLRPFIFVSPYADRYRCWETFLLIVLVVYSAWVSP
AKT1	17	QLSRESSHFSLSSTGILPSLGGARSNRRVKLRRFVVSPLYDHKYRIWEAFLVVLVVYTAWVSP
----- S2 -----		
OsAKT1	121	FEFGFIPKPTGALATADNVVNAFFAVDIIILTFVAYLDMKMSYMLEDDPKKIAWRYSTTWL
ZMK1	84	FEFGFIQKPTGALAAVDNVVNAFFAVDIIILTFVAYLDRMTYLLLEDDPKRIAWRYTTSWF
AKT1	77	FEFGFLRKPRPPLSITDNTVNAFFAIDIIIMTFVGYLDKSTYLIVDDRKQIAFKYLRSWF
----- S3 -----		
OsAKT1	181	VLDVASTIPSEFARRILPSKLRSYGFFNMLRLWRLRRVSSLFSLRLEKDRHFNYFWVRCAK
ZMK1	144	VLDVASTIPSEFARKILPPDLRSYGFFNMLRLWRLRRVSSLFARLEKDRHFNYFWVRCAK
AKT1	137	LLDLVSTIPSEAMRIS--OSYGLFNMLRLWRLRRVGALEFARLEKDRNFNYFWVRCAK
----- S4 -----		
OsAKT1	241	LICVTLFAVHCAACFYLLADRYVPPTSTWIGNYMADFHSLWIRYVTSVYWSITTLTT
ZMK1	204	LICVTLFAVHCSACFYLLADMYPTPTDPTWIGNSMDFHQRGLWIRYVTSVYWSITTLTT
AKT1	194	LVCVTLFAVHCAACFYLLTAARNNSNPAKTIWIGANVANFLSESLWMRYVTSMYWSITTLTT
----- P -----		
OsAKT1	301	VGYDGLHAENTREMI FNI FYMLFNLGLTAYLIGNMTNLVHGTSTRTRNYRDTIQAAATSF
ZMK1	264	VGYDGLHAENTREMI FNI FYMLFNLGLTAYLIGNMTNLVHGTSTRTRKYRDTIQAAATSF
AKT1	254	VGYDGLHPVNTREMI FDI FYMLFNLGLTAYLIGNMTNLVHGTSTRTRNFRDTIQAAASNFA
----- S6 -----		
OsAKT1	361	VRNQLPRLQDQMSHLSLKYRTDSEGLQQQEIILDSLPAIKSSISOYLFFHLVQNVYLF
ZMK1	324	LRNQLPRLQDQMSHLCLKFRDSEGLQQQETLDVLPKAIRSSISOYLFFNLVQKVYLF
AKT1	314	HRNHLPPRLQDQMLAHLCLKYRTDSEGLQQQETLDALPKAIRSSI SHFLFFYSLMDKVYLF
----- cNMP -----		
OsAKT1	421	QGVSNDLIFQLVSEMKAEYFPPREDVILQNEAPTDFYILVSGSVELVEQONCADOVIQVA
ZMK1	384	EGVSNDLIFQLVSEMKAEYFPPREDVILQNEAPTDFYILVIGSAELIELONGGEQMVGVA
AKT1	374	RGVSNDLIFQLVSEMKAEYFPPKEDVILQNEAPTDFYILVNGTADLVVDVDTGTESIVREV

OsAKT1	481	TSGEVVGEIGVLCYRPQLFTVVRTSLCQLLRLLNRTAFLSIVQFNVGDGTIIMNNLIQFLK
ZMK1	444	KAGDVVGEIGVLCYRPQLFTVVRTKSLCQLLRMNRTAFLSLVQSNVADGTIIMNNLIQLLK
AKT1	434	KAGDITIGETIGVLCYRPQLFTVVRTKRLCQLLRMNRTTFLNLIQANVGDGTIIMNNLIQHLK

OsAKT1	541	ECKENSVMAGVVKELIEMSLARGNLDLPIITLCFAVTRGDDFLLHQLLKRGMDPNESDNDGH
ZMK1	504	QQNDNSVMMGVLKEVENMLARGRLDLPVITLCFAVNKGDDFLLHQLLKRGLDPNESDNNGH
AKT1	494	EMN-DPVMTNVLEIENMLARGKMDLPLNLCFAAIRDDLLHQLLKRGLDPNESDNNGR
----- ANK -----		
OsAKT1	601	TALHTAASKGN EOCVRLLELYGADPNARDSEKGVPLWEALCEKHAAVVQLLVEGGADLSS
ZMK1	564	TALHTAASKGDEOCVKLLELYGADPNARDSEKGVPLWEALCEKQNPVVELLVQSGAGLSS
AKT1	553	TPLHTAASKGTLNLCVLLLELYHADPNCRDAEGSVPLWEAMVEGHEKVVVKVLELHEGSTIDA

OsAKT1	661	GDTGLYACTI AVEESDTELLNDIHYGGDVRARRDGTALHR-ACDGNVQMAEELLEHGA
ZMK1	624	GDVALYSCVAVEENDPELLENIRYGGNVNSMKDGTPLHRAVCDGNVQMVLELLEHGA
AKT1	613	GDVGHFACTAAEQGNLKLLEKELVHLHGGDVTRPRATGTSALHTAVCEEENIEMVKYLLEQGA

OsAKT1	720	DIDKQDGNWTPRALAEQQGHDDIQLLFRSRKAATASGHHHVPSSTTTTRVAPAAAASLIG
ZMK1	684	DIDKODNNGWSARALADQOQGHDDHSLSRSK---AHRQOHASKGTVAPVP-----IW
AKT1	673	DVNKQDMHGWTPRDLAEQQGHEDIKALFREKLL---HERRVHIETSSSVPIILKTG-IRFLG

OsAKT1	780	RFNSEPMKMNIED-ADLPSRVLP EKLRRKRVT FQNSLFGVISSSQAQRET DHPLSRGG
ZMK1	734	RFNSEPTMPNKHEDAEELRGKVVPEKLLRKRVS FQNSLFGVISSSHARQDTGRLLSKG-
AKT1	729	RETFSEPNIR---PASREVSFRIRRETRARRKTNNFDNSLFGILANQSVPKNGLATVDEG-

OsAKT1	839	LAAATGSPNPSGSRNAVIRVTISCEPKGNTAGKLVLLPQTLDMLLELGAKKFDFAPTKVL
ZMK1	793	LAGPGSPGCSHGS---LVRVTIGCEPKGNAAAGKLVLLPRSMTEVLELGARKFGFKPTKVL
AKT1	784	--RTGNP-----VRVTISCAEKDDIAGKLVLLPVSFKELLELGSNKFGIVATKVM
----- K _H -----		
OsAKT1	899	TVEG-AEVDLEVELIRDGDHLVLSNEWDAEKMKGKS---
ZMK1	850	TTGG-ABIDEVELIRDGDHLVLSVDWAPDVAQLRPNDK
AKT1	832	NKDNNAEIDDVDVIRDGDHLIFATDS-----
----- K _A -----		

Abb. 20: Sequenzvergleich von OsAKT1 mit ZMK1 (*Zea Mays*) und AKT1 (*Arabidopsis thaliana*).

Identische Aminosäuren sind schwarz, konservierte grau unterlegt. Die transmembranen Segmente S1-S6 und die Porenregion P sind durch durchgezogene Linien hervorgehoben. Die potentielle Bindestelle für cyclische Nukleotide (cNMP) ist durch eine gestrichelte Linie, die Ankyrin-Konsensus Domäne (ANK) durch eine gepunktete Linie markiert. C-terminal hydrophobe und saure Domänen (K_H, K_A) sind eingerahmt.

der Nummer AY065970 in der Sequenzdatenbank GenBank abgelegt. Die Sequenzierung des von uns erhaltenen Vollängen-PCR-Produkts ergab ein durchgängiges Leseraster von 2802 Nukleotiden und bestätigte die vorhergesagte Basenfolge für *OsAKT1* in Übereinstimmung mit der von Golldack, 2003 publizierte Sequenz. Die in Abbildung 20 dargestellte abgeleitete Peptidsequenz beinhaltet 934 Aminosäuren mit einer Masse von 104,4 kD und zeigte die typischen Strukturbereiche der Kaliumkanäle des *Shaker*-Typs mit sechs transmembranen Segmenten S1-S6 und einer Porenregion P zwischen dem fünften und sechsten membrandurchspannenden Bereich. Wie erwartet zeigte *OsAKT1* im Vergleich mit weiteren Vertretern pflanzlicher Kaliumkanäle die größten Ähnlichkeiten zu *ZMK1* (77 % Aminosäureidentität) und zu *AKT1* (62% Aminosäureidentität) und lässt sich somit in die *AKT1*-Unterfamilie pflanzlicher *Shaker*-Kaliumkanäle einordnen.

3.2.2 Lokalisation der *OsAKT1*-Transkripte

Die Kanäle der einzelnen *Shaker*-Unterfamilien zeichnen sich häufig durch spezifische Expressionsmuster aus, die mit der physiologischen Bedeutung der jeweiligen Kanäle korreliert werden können. So wurden Vertreter der *AKT1*-Unterfamilie bislang größtenteils in der Wurzel lokalisiert, so dass ihnen eine Rolle für die Kaliumaufnahme aus dem Boden zugeschrieben wird. Die Expression von *AKT1* konnte in Epidermis und Cortex der Wurzel und in Wurzelhaaren nachgewiesen werden (Basset, 1995; Lagarde, 1996), jedoch auch in Hydathoden, Hypokotyl, Tumorgewebe und sogar Schließzellen (Deeken, 2003; Lagarde, 1996; Philippar, 2004; Szyroki, 2001). Der *AKT1*-orthologe Kanal aus Kartoffeln, *SKT1*, wurde ebenfalls in Wurzeln, aber auch in mit Schließzellen angereicherten Epidermisfraktionen gefunden (Zimmermann, 1998). Auch in Weizen und Tomate konnten die Transkripte *AKT1*-orthologer Kaliumkanäle (*TaAKT1* und *LKT1*) in der Wurzel lokalisiert werden (Buschmann, 2000; Hartje, 2000). Im Gegensatz hierzu wurde die Expression des ebenfalls der *AKT1*-Unterfamilie zuzuordnenden *ZMK1* aus Mais zwar ebenfalls in der Keimlingswurzel lokalisiert, jedoch war die *ZMK1*-Transkriptmenge in der Koeoptile am höchsten (Fuchs, 1999; Philippar, 1999). Um die Bedeutung von *OsAKT1* für das Wachstum näher zu untersuchen, wurde zunächst das Expressionsmuster des Kanals im Keimling bestimmt. Das repräsentative Ergebnis einer hierzu durchgeführten Northern Blot Analyse ist in Abb. 21 zu sehen.

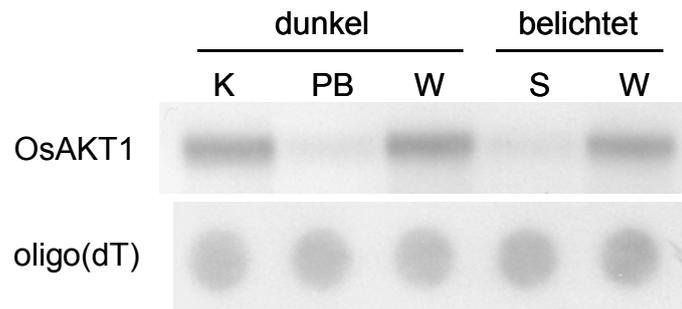


Abb. 21. Gewebespezifische Expression von *OsAKT1* im Keimling von *Oryza sativa*. Northern Blot von je 1 µg mRNA, die aus Koleoptile (K), Primärblatt (PB) und Wurzel (W) von im Dunkeln gewachsenen 5 Tage alten Keimlingen und aus Sproß (S) und Wurzel (W) von im Licht angezogenen 5 Tage alten Reispflanzen isoliert worden war. Die mRNA wurde mit einer radioaktiv markierten Vollängen-Sonde von *OsAKT1* hybridisiert. Die Quantifizierung erfolgte durch Hybridisierung von 10 ng mRNA (Northern Dot Blot) mit einer radioaktiv markierten oligo(dT)-Sonde.

In etiolierten, 5 Tage alten Keimlingen war die Expression von *OsAKT1* in Koleoptile und Wurzel am höchsten. Bei im Licht gewachsenen ebenso alten Pflanzen wurde ebenfalls in der Wurzel die höchste *OsAKT1*-Transkriptmenge gefunden. Sowohl im etiolierten Primärblatt als auch im belichteten Spross war die Expression von *OsAKT1* vergleichsweise niedrig. *OsAKT1* weist im Keimling demzufolge eher ein *AKT1*-ähnliches Expressionsmuster auf, während *ZMK1*, zu dem *OsAKT1* die höchsten Sequenzhomologien besitzt, hauptsächlich in der Koleoptile des Maiskeimlings exprimiert wird (Fuchs, 2003; Philippar, 1999).

3.2.3 Regulation der *OsAKT1*-Expression durch Auxin

Da für *ZMK1* bereits nachgewiesen werden konnte, dass dessen Expression durch Auxine induziert wird (Philippar, 1999), sollte nun überprüft werden, ob die Transkription von *OsAKT1* ebenfalls einer Regulation durch IAA unterliegt. Hierzu wurde von 4-5 Tage alten Reiskeimlingen die Koleoptile präpariert, die Spitze entfernt und die Koleoptilsegmente nach dem Auswaschen endogenen Auxins für 15, 45 und 90 min in 5 µM IAA inkubiert. In anschließenden Northern Blot Analysen stellte sich heraus, dass die *OsAKT1*-Genaktivität nicht oder nur in sehr geringem Umfang durch die Applikation exogenen Auxins beeinflusst wurde (Abb. 22). Die für *ZMK1* bereits gezeigte Expressionssteigerung um den Faktor 7 nach der Behandlung der Koleoptile mit IAA konnte für *OsAKT1* nicht beobachtet werden. Die Expression

des Transkriptionsfaktors *OsARF1*, dessen Auxinregulation bereits von Waller, 2002 beschrieben wurde, nahm jedoch im Laufe des Experiments erwartungsgemäß zu.

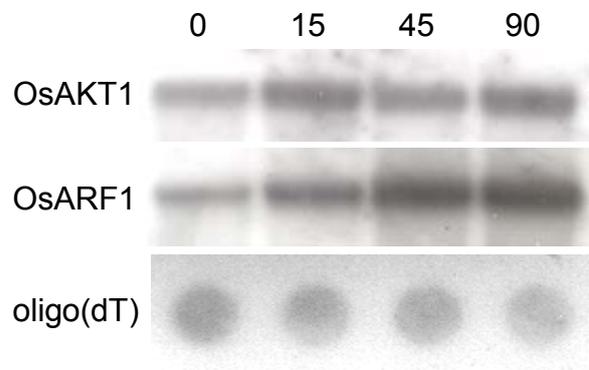


Abb. 22. Die Expression von *OsAKT1* ist Auxin-insensitiv.

Northern Blot von je 1 µg mRNA aus Koleoptilsegmenten, die für 0, 15, 45 oder 90 min mit 5 µM IAA behandelt worden waren. Die mRNA wurde mit einer radioaktiv markierten Vollängen-Sonde von *OsAKT1* und anschließend mit einer Sonde für *OsARF1* hybridisiert. Die Quantifizierung erfolgte durch Hybridisierung von 10 ng mRNA (Northern Dot Blot) mit einer radioaktiv markierten oligo(dT)-Sonde.

Diese Ergebnisse zeigen, dass *OsAKT1* trotz seiner hohen Sequenzhomologie zu *ZMK1* durch ein anderes Expressionsmuster im Keimling und Auxin-Insensitivität charakterisiert war. Eine Anbindung an andere Signalnetzwerke der Zelle sowie eine mögliche, von *ZMK1* verschiedene Funktion des *OsAKT1*-Kanals lag somit nahe.

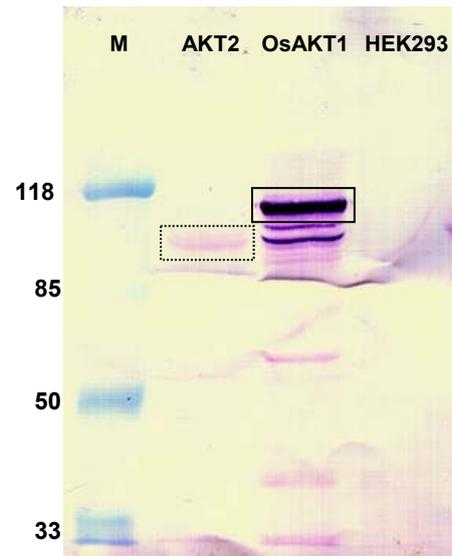
3.2.4 Elektrophysiologische Charakterisierung von *OsAKT1*

3.2.4.1 Funktionelle Expression von *OsAKT1* in HEK293-Zellen

Um die biophysikalischen Eigenschaften von *OsAKT1* untersuchen zu können, wurde die cDNA von *OsAKT1* zunächst in den Expressionsvektor pcDNA3.1D/V5-His-TOPO (Invitrogen) subkloniert, wobei das Stop-Codon von *OsAKT1* entfernt wurde, um eine translationale Fusion mit dem V5-Epitop zu gewährleisten. In mit *OsAKT1*/pcDNA3.1D/V5-His-TOPO transfizierten HEK293-Zellen konnte daher das *OsAKT1*-Protein durch den Einsatz eines Anti-V5-Antikörpers nachgewiesen werden (Abb. 23).

Abb. 23. Nachweis von OsAKT1 in transfizierten HEK293-Zellen

Western Blot von je 100µg Gesamtprotein, das aus HEK293-Zellen isoliert wurde, die mit AKT2/pcDNA3.1D/V5-His-TOPO (Positivkontrolle, ca. 92 kD) oder OsAKT1/pcDNA3.1D/V5-His-TOPO transfiziert worden waren. In letzteren konnte OsAKT1/V5-His durch einen Anti-V5-Antikörper in einer Höhe von ca. 110 kD detektiert werden. Gesamtprotein aus untransfizierten HEK293 wurde in der rechten Spur aufgetrennt und diente als Negativkontrolle. M: Vorgefärbter Proteinmarker mit Angabe der Größen in Kilodalton (kD)



In elektrophysiologischen Untersuchungen wurde OsAKT1 nun durch Frau Dr. Sonja Stölzle (Julius-v.-Sachs-Institut, Universität Würzburg) weiter charakterisiert. An nicht mit OsAKT1 transfizierten HEK293-Zellen konnten keine Kalium-Einwärtsströme gemessen werden. In mit OsAKT1/ pcDNA3.1D/V5-His-TOPO transfizierten Zellen jedoch wurde durch hyperpolarisierende Membranspannungen negativ von -100 mV ein spannungsabhängiger, einwärtsgleichrichtender Kaliumkanal aktiviert (Abb. 24a). Wie für einen K⁺-selektiven Kanal erwartet, nahmen die durch OsAKT1 vermittelten Ströme mit zunehmender Kaliumkonzentration im extrazellulären Medium zu und das Umkehrpotential wurde zu positiveren Spannungen hin verschoben (nicht gezeigt). Neben K⁺ war OsAKT1 auch für NH₄⁺ permeabel, wie es auch bereits für AKT1 berichtet wurde (Bertl, 1997). Mit 100 mM Na⁺ in der externen Lösung hingegen wurden keine OsAKT1-vermittelten Ströme registriert (Abb. 24b).

Die Anwesenheit von 20 mM Ca²⁺ oder 1 mM Cs⁺ im Außenmedium führte zu einem spannungsabhängigen Block von OsAKT1 (Abb. 24c). Neben K⁺, Na⁺ und NH₄⁺ spielen auch Protonen eine wichtige Rolle in der pflanzlichen Ernährung, da die Nährstoffaufnahme häufig von pH-Änderungen begleitet bzw. durch pH-Gradienten bedingt wird. So werden durch die Aktivität der H⁺-ATPase in der Plasmamembran pH- und Potentialgradienten über der Plasmamembran aufrechterhalten, die u.a. für die Aktivierung von Kaliumkanälen erforderlich sind. So sind beispielsweise die Einwärtsgleichrichter KST1, SPIK KDC1, LKT1 und ZMK1 durch die Ansäuerung des extrazellulären Mediums aktivierbar (Downey, 2000; Hartje, 2000; Hoth, 1997; Mouline, 2002; Philippar, 1999). In Analogie hierzu konnte auch in OsAKT1-

exprimierenden HEK293-Zellen eine Zunahme des Kaliumeinstroms festgestellt werden, nachdem der pH-Wert der Badlösung von 7,4 auf 5,6 erniedrigt wurde (Abb. 24d).

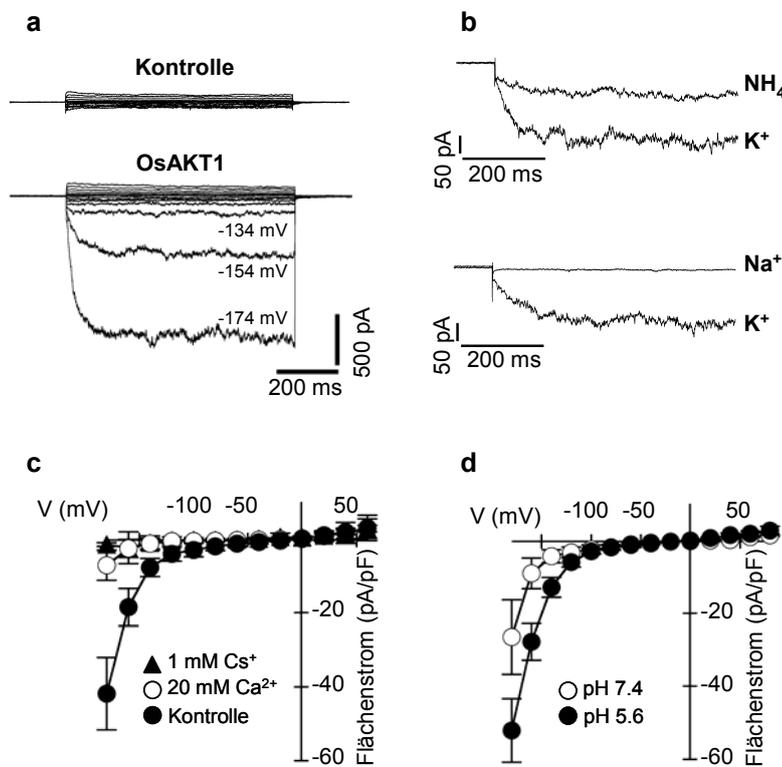


Abb. 24. Charakterisierung von OsAKT1 nach heterologer Expression in HEK293-Zellen.

(a) Repräsentative Ganz-Zell-Ströme von HEK293-Zellen, die nur mit dem Plasmid pTracer (Kontrolle) oder mit pTracer und OsAKT1/pcDNA3.1D/V5-His-TOPO (OsAKT1) co-transfiziert worden waren. Ausgehend von einer Haltespannung bei -34 mV wurde die Membranspannung in 20 mV-Abständen sukzessiv von $+86$ mV auf -174 mV für jeweils 3 sec geändert. Sowohl Bad- als auch Pipettenlösung entsprachen den Standardbedingungen. (b) Oben Ganz-Zell-Ströme in mit OsAKT1 transfizierten Zellen bei -154 mV mit 100 mM NH_4^+ oder K^+ in der Badlösung. Unten Ganz-Zell-Ströme in mit OsAKT1 transfizierten Zellen bei -154 mV mit 100 mM Na^+ oder K^+ in der Badlösung. (c) Strom-Spannungs-Diagramm der Gleichgewichts-Ströme in OsAKT1-exprimierenden HEK293 in Anwesenheit von 30 mM K^+ in der Badlösung vor (\bullet , $n=6$) und nach der Zugabe von 1 mM Cs^+ (\blacktriangle , $n=3$) oder 20 mM Ca^{2+} (\circ , $n=3$). Die Ströme wurden bezogen auf die Fläche normiert und gegen die Membranspannung aufgetragen. (d) Strom-Spannungs-Diagramm der Gleichgewichts-Ströme in OsAKT1-exprimierenden HEK293 bei pH 7,4 (\circ , $n=5$) oder pH 5,6 (\bullet , $n=17$). Die Ströme wurden bezogen auf die Fläche normiert und gegen die Membranspannung aufgetragen.

3.2.4.2 *In vivo* Kaliumströme in Reis-Wurzelprotoplasten

Um die funktionellen Eigenschaften von OsAKT1 nach Expression im heterologen System mit den Eigenschaften des Kanals *in vivo* vergleichen zu können, wurden durch Frau Dr. Natalya Ivashikina (Julius-v.-Sachs-Institut, Universität Würzburg) Patch-clamp-Messungen an Protoplasten durchgeführt, die aus epidermalen Wurzelzellen junger Reispflanzen gewonnen wurden, in denen bereits die Expression von OsAKT1 nachgewiesen werden konnte (s. 3.2.2).

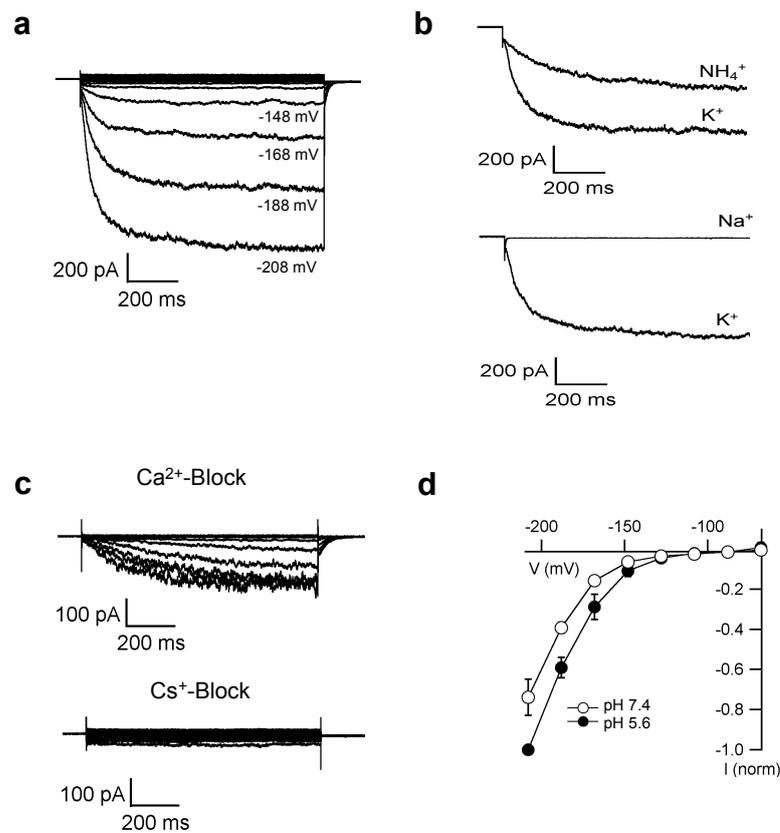


Abb. 25. Eigenschaften des Einwärtsgleichrichters in Reiswurzeln.

(a) Zeit- und spannungsabhängige K⁺-Einwärtsströme in Reis-Wurzelprotoplasten. Ausgehend von einer Haltespannung bei -48 mV wurde die Membranspannung in 20 mV Abständen sukzessiv von +52 mV auf -208 mV geändert. Sowohl Bad- als auch Pipettenlösung entsprachen den Standardbedingungen. (b) *Oben* Ganz-Zell-Ströme in Wurzelprotoplasten nach einem Spannungspuls auf -188 mV in Gegenwart von 100 mM NH₄⁺ oder K⁺ in der Badlösung. *unten* Ganz-Zell-Ströme in Wurzelprotoplasten nach einem Spannungspuls auf -188 mV mit 100 mM Na⁺ oder K⁺ in der Badlösung. (c) Ganz-Zell-Ströme in Wurzelprotoplasten in Anwesenheit von 30 mM K⁺ und 20 mM Ca²⁺ (*oben*) oder 30 mM K⁺ und 1 mM Cs⁺ (*unten*) in der Badlösung. (d) Strom-Spannungs-Diagramm der Gleichgewichts-Ströme aus (a) bei pH 5,8 (●, n=3) oder pH 7,4 (○, n=3). Die Stromamplituden wurden auf den Strom bei -208 mV, pH 5,6 normalisiert und als Mittelwert ± SF gegen die Membranspannung aufgetragen.

In diesen Zellen wurde durch hyperpolarisierende Membranspannungen negativ von etwa -100 mV ein spannungsabhängiger, einwärtsgleichrichtender Kaliumkanal aktiviert (Abb. 25a). Wie für K^+ -selektive Kanäle charakteristisch, nahmen die Ströme als Funktion der extrazellulären K^+ -Konzentration zu (nicht gezeigt). Wurde K^+ in der Badlösung durch NH_4^+ ersetzt, so nahmen die Stromamplituden um ca. 50% ab. Keine Einwärtsströme wurden beobachtet, wenn K^+ durch Na^+ ersetzt wurde (Abb. 25b). Die beschriebene NH_4^+ -Permeabilität des Wurzel-Einwärtsgleichrichters könnte auf eine Rolle dieses Kanals für die Stickstoffernährung der Reispflanze hindeuten. Besonders wichtig könnte diese Funktion für Pflanzen sein, die häufig überflutet werden, da unter diesen Bedingungen NH_4^+ -Ionen die bedeutendste Stickstoffquelle im Boden darstellen (Wolt, 1994). Ähnlich wie OsAKT1 in HEK293-Zellen wurde der K^+ -Einwärtsgleichrichter in Reiswurzeln durch Ca^{2+} und Cs^+ spannungsabhängig geblockt (Abb. 25c). Die Erhöhung der extrazellulären Protonenkonzentration führte ebenfalls zu einer Zunahme der Kaliumeinwärtsströme in den Wurzelprotoplasten (Abb. 25d).

Der Einwärtsgleichrichter in der Reiswurzel zeigt demzufolge sehr ähnliche Eigenschaften wie der in HEK293-Zellen heterolog exprimierte OsAKT1, was dafür spricht, dass OsAKT1 den dominanten Kaliumaufnahmekanal in Reiswurzeln darstellt.

3.2.5 Regulation des Wachstums und der OsAKT1-Aktivität durch Salzstress

Die Regulierung der Kaliumaufnahme über die Wurzel ist besonders unter ungünstigen Wachstumsbedingungen wichtig. So ist es beispielsweise für Pflanzen, die auf versalzten Böden wachsen notwendig, das $K^+ : Na^+$ -Verhältnis im Cytosol aufrecht zu erhalten, um toxische Effekte durch zu hohe Na^+ -Konzentrationen zu vermeiden (s. 1.5). Ausgehend von der Beobachtung, dass der OsAKT1-Kanal eine wichtige Komponente für die Kaliumaufnahme aus dem Boden darstellen könnte, sollte im Folgenden der Einfluss von Salzstress auf die OsAKT1-vermittelte Kaliumversorgung in Reispflanzen untersucht werden.

3.2.5.1 Auswirkungen von Salzstress auf das Wachstum und die Ionenhomöostase

Reiskeimlinge, die auf Nährböden mit 150 mM NaCl angezogen wurden, hatten erheblich kürzere Wurzeln als Pflanzen, die unter natriumfreien Kontrollbedingungen wuchsen (Abb. 26a). Zudem waren die Wurzelhaare der salzgestressten Keimlinge deutlich kürzer als die der Kontrollpflanzen (Abb. 26b).

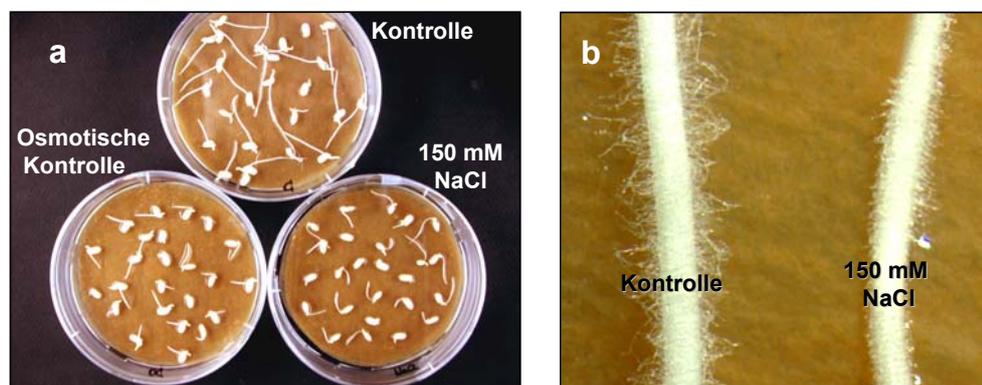


Abb. 26. Salzstress beeinflusst das Keimlingswachstum.

(a) Vier Tage alte Pflanzen, die im Dunkeln unter Kontrollbedingungen (*oben*) oder auf 150 mM NaCl (*unten rechts*) angezogen wurden. Keimlinge, die auf Medium wuchsen, das mit D-Sorbitol auf die gleiche Osmolarität ($\sigma = 350 \text{ mosmol kg}^{-1}$) eingestellt wurde wie das Salzmedium dienen als Kontrolle für osmotische Nebeneffekte (*unten links*). (b) Wurzelhaare von 4 Tage alten Reispflanzen, die im Dunkeln unter Kontrollbedingungen oder auf 150 mM NaCl angezogen wurden. Die verwendeten Medien sind unter 2.1.6 beschrieben.

Da über die Wurzelhaare der Großteil der Nährstoffaufnahme in die Wurzel erfolgt, wurde nun überprüft, ob das verminderte Wachstum der salzgestressten Keimlinge

durch Änderungen im Ionenhaushalt hervorgerufen wird. Hierfür wurde der Gehalt an Natrium, Chlorid und Kalium in Wurzel und Spross salzbehandelter Pflanzen ermittelt und mit Kontrollpflanzen verglichen. Pflanzen, die auf D-Sorbitol-Medium wuchsen, (osmotische Kontrolle, $\sigma = 350 \text{ mosmol kg}^{-1}$) dienten als Kontrolle für das Salzmedium. Die Ionenanalysen zeigten, dass in salzgestressten Pflanzen die Na^+ -Konzentration etwa 140fach höher war als unter Kontrollbedingungen (Abb. 27a). Auch der Gehalt an Chlorid-Ionen war im Vergleich zur Kontrolle erhöht, jedoch nur um einen Faktor von 4,5 und 7,9 in Spross bzw. Wurzel (Abb. 27b). Keimlinge, die auf osmotischem Kontrollmedium wuchsen, zeigten keine Abweichungen im Na^+ - oder Cl^- -Gehalt.

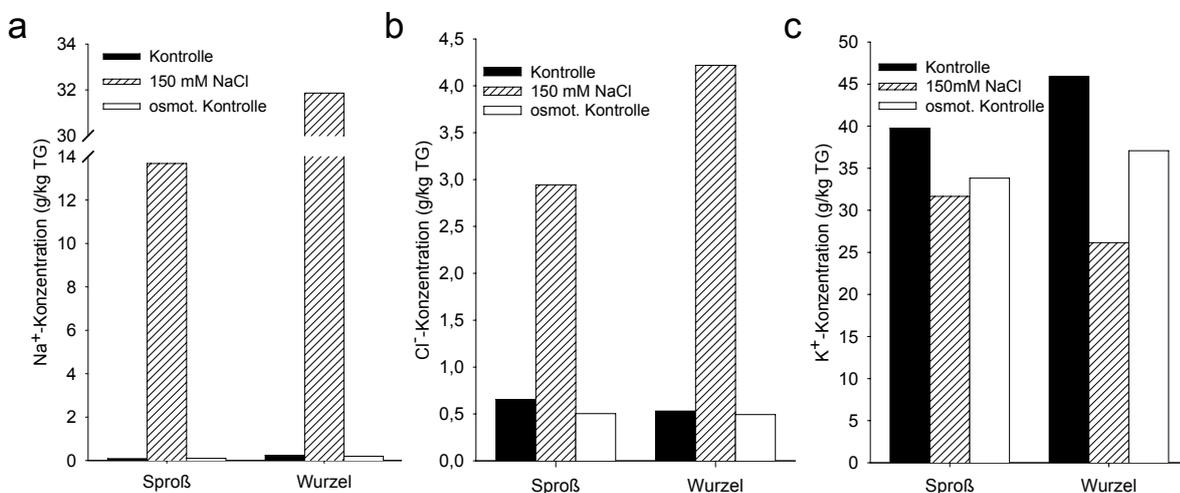


Abb. 27. Salzstress beeinflusst das Ionengleichgewicht.

Konzentrationen von (a) Natrium, (b) Chlorid und (c) Kalium in der Trockenmasse (TG) von Wurzel und Spross 5 Tage alter, im Licht gewachsener Reiskeimlinge. Die Pflanzen wurden für 72 h auf 0,5 MS, 1% Saccharose angezogen und anschließend für 48 h unter Kontrollbedingungen (schwarze Balken), osmotischen Kontrollbedingungen (weiße Balken) oder Salzstress (gestreifte Balken) weiterkultiviert.

Interessanterweise nahm die Kaliumkonzentration in salzgestressten Keimlingen in Spross und Wurzel im Vergleich zur Kontrolle um 20% bzw. 44% ab (Abb. 27c), so dass man davon ausgehen kann, dass durch Salzstress die Kaliumhomöostase der Pflanzen beeinflusst wird, eine Beobachtung, die bereits von Watad, 1991 beschrieben wurde. Der Kaliumgehalt der Pflanzen, die osmotischem Stress ausgesetzt waren, war ebenfalls um 15% und 19% in Spross bzw. Wurzel reduziert. Dies könnte darauf hindeuten, dass ein Teil der wachstumshemmenden Wirkung der Salzbehandlung durch osmotische Effekte auf Kaliumaufnahme oder –homöostase bedingt ist.

3.2.5.2 Regulation der *OsAKT1*-Expression durch Salzstress

Der geringere Kaliumgehalt in salzgestressten Keimlingen (3.2.5.1, Watad, 1991) könnte durch eine geringere Transportaktivität der K^+ -Einwärtsgleichrichter oder einen erhöhten Kaliumverlust der Wurzel bedingt sein. Um zu überprüfen, ob die Aktivität von *OsAKT1*, der möglicherweise den dominanten K^+ -Aufnahmekanal der Reiswurzel darstellt, in salzgestressten Pflanzen verändert ist, wurde zunächst die Expression von *OsAKT1* in mit 150 mM NaCl behandelten Keimlingen untersucht.

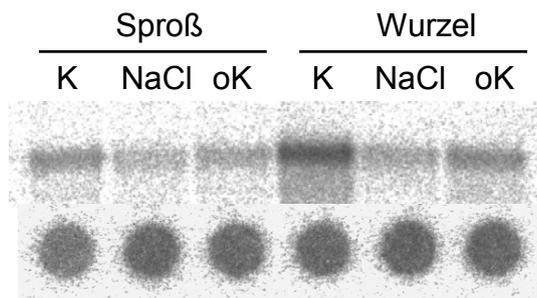


Abb. 28. Regulation der *OsAKT1*-Expression durch Salzstress.

Northern Blot von je 1 μ g mRNA, isoliert aus Wurzel und Sprossen von im Dunkeln gewachsenen 4 Tage alten Keimlingen, die unter Kontrollbedingungen (K), unter Salzstress (150 mM NaCl) und unter osmotischem Stress (osmotische Kontrolle, oK) angezogen wurden. Die verwendeten Medien sind unter 2.1.6 genauer beschrieben. Die mRNA wurde mit einer radioaktiv markierten Vollängen-Sonde von *OsAKT1* hybridisiert. Die Quantifizierung erfolgte durch Hybridisierung von 10 ng mRNA (Northern Dot Blot) mit einer radioaktiv markierten oligo(dT)-Sonde.

Dabei zeigte sich, dass der Gehalt an *OsAKT1*-mRNA in salzgestressten Pflanzen im Vergleich zur Kontrolle sowohl im Spross als auch in der Wurzel reduziert war (Abb. 28). In Keimlingen, die osmotischem Stress ausgesetzt waren, war die Expression von *OsAKT1* ebenfalls niedriger als unter Kontrollbedingungen, was darauf schließen lässt, dass zumindest ein Teil der transkriptionellen Regulierung von *OsAKT1* nicht auf Veränderungen in der intrazellulären Na^+ -Konzentration, sondern auf osmotische Effekte zurückzuführen ist. Die beschriebenen Ergebnisse stimmen gut mit den von Golldack, 2003 gezeigten Beobachtungen überein, dass in den Wurzeln salzgestresster Reispflanzen die Transkripte AKT1-orthologer Kaliumkanäle reduziert sind. An dieser Stelle sollte erwähnt werden, dass auch die Expression des AKT1-orthologen Kanals aus der Wurzel von *Mesembryanthemum crystallinum*, MKT1, in Reaktion auf die Behandlung der Pflanzen mit 400 mM NaCl verringert wird (Su, 2001).

3.2.5.3 Kaliumeinwärtsströme in Protoplasten salzgestresster Wurzeln

Um zu untersuchen, ob die verminderte Expression von *OsAKT1* die Kalium-Transporteigenschaften der Wurzelzellen ändert, wurden Patch-Clamp-Experimente an Protoplasten 4 Tage alter Keimlinge durchgeführt, die in Anwesenheit von 150 mM NaCl angezogen worden waren. Im Vergleich zu Pflanzen, die unter Kontrollbedingungen gewachsen waren, zeigten die Wurzelprotoplasten der salzgestressten Keimlinge bei -188 mV um 81% verringerte Kaliumeinströme (Abb. 29a). Die Stromamplitude nahm hier im Vergleich zur Kontrolle ohne eine Änderung in der Spannungsabhängigkeit des Kanals ab (Abb. 29b), was auf eine verminderte Expression und somit Dichte der *OsAKT1*-Kanäle schließen lässt.

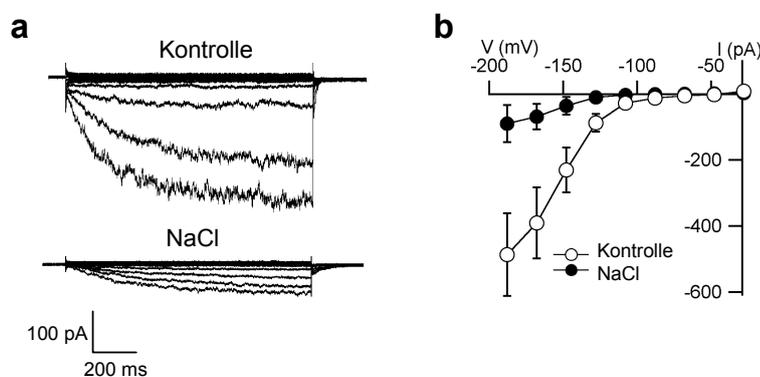


Abb. 29. Reduzierung *OsAKT1*-ähnlicher Ströme unter Salzstress.

(a) Zeit- und spannungsabhängige K^+ -Einwärtsströme in Reis-Wurzelprotoplasten, die aus unter Kontrollbedingungen kultivierten (oben) oder salzgestressten Pflanzen (unten) isoliert wurden. Ausgehend von einer Haltespannung bei -48 mV wurde die Membranspannung in 20 mV Abständen sukzessiv von -28 mV auf -188 mV geändert. Sowohl Bad- als auch Pipettenlösung entsprachen den Standardbedingungen. (b) Strom-Spannungs-Diagramm der Gleichgewichts-Ströme am Ende der Spannungspulse aus (a) in Protoplasten aus Kontrollpflanzen (\circ , $n=6$) und aus salzbehandelten Keimlingen (\bullet , $n=10$). Die Stromamplituden wurden als Mittelwert \pm SF gegen die Membranspannung aufgetragen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass *OsAKT1* durch Natriumstress wahrscheinlich auf transkriptioneller Ebene reprimiert wird, wenngleich auch ein osmotischer Effekt nicht ausgeschlossen werden kann. Eine posttranslationale Regulation von *OsAKT1* durch Natrium wie von Qi und Spalding (2004) für *AKT1* vorgeschlagen, konnte in den hier durchgeführten Experimenten nicht beobachtet werden. Die unseren Untersuchungen zugrunde liegenden experimentellen Bedingungen sind allerdings sehr verschieden von den von Qi und Spalding verwendeten, da diese Na^+ sehr rasch über die Pipette ins Cytoplasma einbringen. Zukünftige Experimente an Reis- und *Arabidopsis*-Wurzelprotoplasten werden zeigen

müssen, inwieweit Kaliumkanäle der AKT1-Unterfamilie durch Änderungen in der intrazellulären Natriumkonzentration posttranslational reguliert werden.

4 Diskussion

4.1 Bedeutung von ZMK1 für die Zellstreckung während des Phototropismus

Die differentielle Aufnahme von Kalium in gegenüberliegenden Koleoptilflanken gilt als Voraussetzung für die gravi- oder phototrope Krümmung von Graskeimlingen (Goswami und Audus, 1976). In gravistimulierten Maiskeimlingen kommt die Krümmungsreaktion durch das im Vergleich zur Oberseite stimulierte Zellstreckungswachstum der Koleptilenunterseite zustande (Firn und Digby, 1979). Erhöhte Auxinkonzentrationen in dieser Organhälfte (Iino, 1991; Philippar, 1999b) führen dort zur Auflockerung der Zellwand und zur Aufnahme von Osmotika. In diesem Zusammenhang haben Claussen *et al.* (1997) bereits nachgewiesen, dass das auxininduzierte Streckungswachstum von Koleoptilzellen von der Kaliumaufnahme über Kaliumkanäle abhängt. Diese Funktion erfüllt in Maiskoleptilen ZMK1, dessen Expression durch physiologisch aktive Auxine reguliert wird (Philippar, 1999b). In gravistimulierten Pflanzen ist der ZMK1-Transkriptgehalt auf der stärker wachsenden Unterseite bis zu achtmal höher als in der wachstumsgehemmten oberen Hälfte. Es ist daher anzunehmen, dass die initiale Steigerung des Wachstums in Antwort auf den IAA-Anstieg durch die Aktivierung der Plasmamembran- H^+ -ATPase bedingt ist. Die Ansäuerung des apoplasmatischen Raums führt zur Lockerung der Zellwand und zur Aktivierung bereits in der Plasmamembran befindlicher ZMK1-Kanalproteine. Um jedoch erhöhte Wachstumsraten auf der Koleptilenunterseite über einen längeren Zeitraum aufrechterhalten zu können, muss dort die ZMK1-Kanaldichte gesteigert werden, was durch die differentielle Expression von ZMK1 bewerkstelligt wird (vgl. 1.1; Becker und Hedrich, 2002).

Da auch die Krümmungsreaktion in Richtung einer Blaulichtquelle von der Umverteilung endogenen Auxins in Graskoleptilen begleitet wird, sollte in der vorliegenden Arbeit die Rolle dieses Kanals während des Phototropismus näher untersucht werden.

4.1.1 Umverteilung von IAA und differentielle Expression von *ZMK1*

In Übereinstimmung mit Iino et al. (1995) wurde auch in photostimulierten Pflanzen ein lateraler Auxingradient beobachtet (Abb. 15). Die durch einseitige Blaulichtbestrahlung ausgelöste Auxinumverteilung in der Koleoptilenspitze konnte mit der differentiellen Expression von *ZMK1* auf Licht- und Schattenseite korreliert werden (Abb. 16 und 17). *ZMK1* wird hauptsächlich in der Spitze des Maiskeimlings exprimiert und auch nur hier konnten signifikante Unterschiede im *ZMK1*-Transkriptgehalt in beiden Flanken detektiert werden. Auch das für den Blaulichtrezeptor *PHOT1* codierende Gen zeigte erwartungsgemäß die höchste Expression in der Koleoptilenspitze, jedoch wurde *PHOT1* in Antwort auf die Bestrahlung mit blauem Licht nicht differentiell exprimiert. Im unteren Abschnitt der Koleoptile konnte ebenfalls eine leichte Umverteilung des endogenen Auxins beobachtet werden und der *ZMK1*-Transkriptgehalt auf der Schattenseite war im Vergleich zur Lichtseite auch nur leicht erhöht. Dies ist vermutlich auf die geringe IAA-Konzentration in diesem Teil des Keimlings zurückzuführen: Legt man einen Wassergehalt der Koleoptilzellen von ca. 94% zugrunde (Philippar, 1999a), so entspricht eine in der Keimlingsbasis gemessene Konzentration von ca. 20 pg IAA/mg Frischgewicht etwa 0,1 μM IAA. Wie von Philippar et al. (1999) gezeigt, liegt der K_M -Wert für die transkriptionelle Aktivierung von *ZMK1* etwa bei 0,1 μM . Da die Auxinkonzentration in der Basis der hier untersuchten Keimlinge in beiden Koleoptilenhälften zumeist unter diesem Wert blieb (Abb. 16), liegt der Schluss nahe, dass in diesem Fall der Schwellenwert für die Induktion der *ZMK1*-Expression weder in der Licht- noch in der Schattenseite deutlich überschritten wurde.

An dieser Stelle sei noch darauf hingewiesen, dass die Auxinumverteilung in photostimulierten Keimlingen eine andere Kinetik aufwies als in gravistimulierten Pflanzen: Während des Gravitropismus wurde bereits 30 min nach Beginn des Experiments eine Verschiebung endogenen Auxins auf die stärker wachsende Unterseite detektiert (Philippar, 1999b). In photostimulierten Pflanzen hingegen war erst nach 60 min ein IAA-Gradient in Licht- und Schattenseite messbar (Abb. 16). Dementsprechend war hier auch die Transkription von *ZMK1* erst später, nämlich nach 90 min differentiell, während ein *ZMK1*-mRNA-Gradient in gravistimulierten Keimlingen bereits nach 60 min zu beobachten war (Philippar, 1999b).

Der von verschiedenen Autoren beschriebene sehr bald, ca. 10 min nach Beginn der Belichtung messbare Auxingradient innerhalb der Koleoptile (Iino, 1991; Iino, 2001) konnte in der vorliegenden Arbeit nicht detektiert werden. Allerdings wurde hier auch nicht der in den vorangegangenen Studien beobachtete, durch einen kurzen Lichtpuls induzierte positive Phototropismus (pulse-induced positive phototropism, PiPP) untersucht, sondern der sog. zeitabhängige Phototropismus (time-dependent phototropism, TDP). Dieser hängt in erster Linie von der Bestrahlungsdauer ab und beschreibt wohl am besten die unter natürlichen Bedingungen vorkommende Wachstumsreaktion von Pflanzen auf dauerhaft geänderte Lichtverhältnisse (zum Überblick über phototrope Reaktionen, s. Iino, 2001). ZMK1 dürfte wohl aufgrund der zeitlich verzögerten transkriptionellen Aktivierung an der im PiPP ausgelösten Krümmungsreaktion nicht beteiligt sein, sondern spielt vermutlich nur während länger anhaltender Krümmungsbewegungen wie im TDP eine Rolle.

4.1.2 Differentielle Expression von ZMK1 unter verschiedenen Schwerkraftbedingungen

Hinsichtlich der differentiellen Expression von *ZMK1* ergab sich in Keimlingen, die unter verschiedenen Schwerkraftbedingungen photostimuliert worden waren zunächst kein Unterschied. Sowohl mit als auch ohne Einfluss der Schwerkraft war die *ZMK1*-mRNA-Menge auf der Schattenseite der Koleoptile 90 min nach Beginn der Belichtung etwa dreimal höher als auf der wachstumsgehemmten Lichtseite. Somit konnte der größere Krümmungswinkel, den BLC-stimulierte Pflanzen erreichten, nicht, wie vermutet, mit einem deutlicheren *ZMK1*-mRNA-Gradienten korreliert werden. Die Analyse der Pflanzen, die auf dem BLC („ohne“ Schwerkraft) einseitig belichtet worden waren ergab jedoch, dass hier in der Koleoptilenspitze 60 min nach Beginn des Experiments ein massiver IAA-Gradient zwischen den beiden Hälften aufgetreten war, der in Pflanzen, die unter normalen Schwerkraftbedingungen belichtet worden waren, nicht beobachtet werden konnte. Um zu überprüfen, ob diese massive Auxinumverteilung in der Spitze einen Einfluss auf den *ZMK1*-mRNA-Gradienten zu einem späteren Zeitpunkt hat, wurde die *ZMK1*-Transkriptmenge in beiden Koleoptilenhälften über einen längeren Zeitraum hinweg verfolgt. Es zeigte sich, dass die Expression von *ZMK1* in auf dem Klinostaten photostimulierten Pflanzen erheblich länger differentiell blieb als unter normalen Schwerkraftbedingungen. Nachdem 3 h nach Beginn des Experiments in

Kontrollpflanzen nahezu kein *ZMK1*-mRNA-Gradient in Licht- und Schattenseite mehr gemessen wurde, war die Menge an *ZMK1*-Transkripten in der Schattenseite BLC-belichteter Keimlinge etwa fünfmal höher als in der Lichtseite (Abb. 18). Die Höhe des *ZMK1*-Gradienten wie auch der Krümmungswinkel waren unter diesen Bedingungen (4,6:1) demzufolge vergleichbar mit dem gravistimulierten Keimlinge (6,4:1, vgl. Philippar, 1999b).

In Anbetracht der vorliegenden Resultate ist anzunehmen, dass der Einfluss der Gravitation den Aufbau eines ausgeprägteren IAA- und *ZMK1*-mRNA-Gradienten in photostimulierten Maiskeimlingen normalerweise verhindert. Die stärkere Krümmung BLC-behandelter Keimlinge könnte demnach auf länger andauernde differentielle *ZMK1*-Expression und somit ebenfalls über einen längeren Zeitraum stattfindende kaliumabhängige Zellstreckung zurückzuführen sein. Ob die länger anhaltende differentielle Expression von *ZMK1* in BLC-belichteten Keimlingen tatsächlich auf den ausgeprägten Auxingradienten nach 60 min zurückzuführen ist, kann hier nicht abschließend geklärt werden. Hierfür wäre eine detailliertere Analyse von IAA-Verteilung und *ZMK1*-Transkription über einen längeren Zeitraum notwendig.

Während tropistischer Reaktionen der Maiskoleoptile werden zwei verschiedene Reize, geänderte Schwerkraftbedingungen oder Blaulicht, durch unterschiedliche Rezeptoren wahrgenommen. Die Perzeption des Schwerereizes erfolgt sehr wahrscheinlich über die Verlagerung stärkegefüllter Amyloplasten (Statolithen) in hierfür spezialisierten Zellen (Statocyten). Im Spross befinden sich die Statocyten in der Peripherie der Leitbündel, während in der Wurzel die Schwerkraftwahrnehmung in den Columella-Zellen der Wurzelhaube stattfindet. Da jedoch auch stärkefreie *Arabidopsis*-Mutanten noch eine, wenn auch schwächer ausgeprägte, gravitrope Reaktion der Wurzel zeigen, wurde postuliert, dass auch die Verlagerung des gesamten Protoplasten als Signal wirken könnte. Ein Rezeptor für die Wahrnehmung der Schwerkraft wurde bislang noch nicht gefunden, jedoch könnten mechanosensitive Ionenkanäle im ER oder in der Plasmamembran hier eine Rolle spielen (zusammengefasst in Blancaflor und Masson, 2003). Die Wahrnehmung des die phototrope Krümmung auslösenden Lichtreizes erfolgt durch spezielle Blaulichtrezeptoren. Während in *Arabidopsis thaliana* die beiden Phototropine phot1 und phot2 überlappende Funktionen in der Perzeption des Blaulichtsignals erfüllen (Briggs und Christie, 2002), ist in Mais bislang nur ein phot1-orthologer Rezeptor identifiziert worden (zum Überblick siehe Briggs, 2001).

Die Perzeption beider Reize, der Schwerkraftänderung und des geänderten Lichteinfalls, mündet jedoch offensichtlich in einen gemeinsamen Signalweg: In beiden Fällen führt die Umverteilung endogenen Auxins zur differentiellen Expression von *ZMK1*, zur differentiellen Kaliumaufnahme in den gegenüberliegenden Organhälften und in der Folge zum beobachteten Krümmungswachstum.

4.1.3 Modell zur phototropen Krümmung der Maiskoleoptile

Die hier beschriebenen Resultate haben zu einem Modell geführt, das die Vorgänge während des Krümmungswachstums der Maiskoleoptile in Reaktion auf einseitige Belichtung beschreiben soll (Abb. 30).

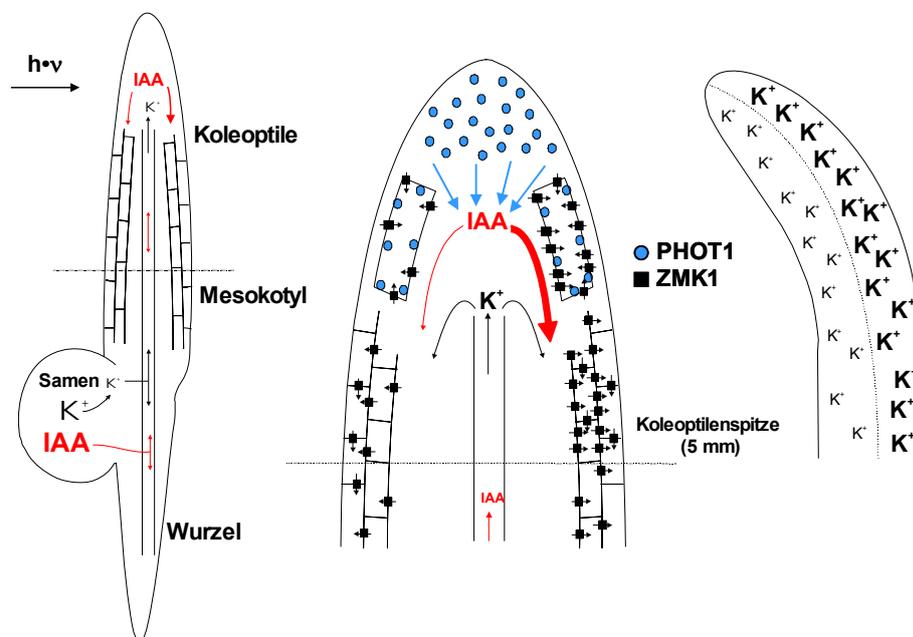


Abb. 30. Modell zur Regulation der phototropen Krümmungsreaktion über die Umverteilung endogener IAA und differentieller Expression von *ZMK1*.

Links Schematische Darstellung des IAA-*myo*-inositol (IAA_m) und K^+ -Transports vom Samen in die wachsenden Gewebe des Maiskeimlings. *Mitte* Modell zu Auxinumverteilung und anschließender differentieller *ZMK1*-Expression in der Koleoptilenspitze. Während die Rezeptorkinase PHOT1 (blaue Kreise) gleichmäßig in der Koleoptilenspitze verteilt ist, akkumuliert der Kaliumaufnahme Kanal ZMK1 (schwarze Quadrate) infolge erhöhter Auxinkonzentrationen in der lichtabgewandten Koleoptilenflanke. Die Richtung des einfallenden Lichts wird durch den Pfeil symbolisiert ($h \cdot \nu$). *Rechts* Die Akkumulation von Kalium in der stärker wachsenden Schattenseite wird durch die Umverteilung von ZMK1 bedingt und ist eine Voraussetzung für das phototrope Krümmungswachstum der Koleoptile.

Sowohl Kalium als auch IAA befinden sich als Speicherstoffe im Samen, wobei IAA hauptsächlich in Form von Konjugaten wie Indol-3-acetyl-*myo*-Inositol oder IAA-*myo*-Inositol-Glykosiden vorliegt (Epstein, 1980). Beide Substanzen werden im Lauf der Entwicklung über das Leitgewebesystem vom Samenkorn in den Spross

transportiert (Chisnell und Bandurski, 1988; Nowacki und Bandurski, 1980). IAA wird in der Koleoptilenspitze aus seinen Konjugaten entlassen und über die bereits beschriebenen Carrier der PIN- und AUX- Familien (vgl. 1.2) in die auxinsensitiven Gewebe transportiert. Die Richtung des einfallenden Lichts wird durch den Photorezeptor PHOT1 wahrgenommen, welcher gleichmäßig in der Koleoptilenspitze verteilt ist (Briggs, 2001; Fuchs, 2003; Hager und Brich, 1993; Kaldenhoff und Iino, 1997). Auf bislang unbekannte Weise führt die Wahrnehmung des Lichtsignals zur Umverteilung freien Auxins in der Koleoptilenspitze. Gleichzeitig werden dort vermutlich auch Enzyme aktiviert, welche IAA-Konjugate zu spalten vermögen. Hierdurch ließe sich auch die Erhöhung der Konzentration an freier IAA in der Sprossspitze 5 min nach Beginn von gravi- oder phototroper Stimulation erklären (Abb. 16 und 17; Philippar, 1999b). Durch die erhöhte Auxinkonzentration auf der unbelichteten Seite der Koleoptile wird dort die Plasmamembran- H^+ -ATPase aktiviert, was zur Ansäuerung des Extrazellularraums führt. Durch eine hierdurch bedingte Lockerung der Zellwand und die Aktivierung bereits in der Plasmamembran vorhandener ZMK1-Kanäle wird der erste Wachstumsschub initiiert. Während des länger andauernden Wachstums wird jedoch die Transkription von *ZMK1* auf der Schattenseite induziert, so dass über eine Erhöhung der K^+ -Kanaldichte verstärkt Kaliumionen in die Zellen der stärker wachsenden Flanke aufgenommen werden können.

Neben seiner Beteiligung am auxininduzierten Zellstreckungswachstum scheint ZMK1 auch während der späten Embryogenese von essentieller Bedeutung zu sein. Die Expression von ZMK1 im sich entwickelnden Embryo erreicht ca. 44 Tage nach der Bestäubung ihren Höhepunkt. Untersuchungen an ZMK1-Transposon-Insertionsmutanten haben ergeben, dass die *zmk1*-Verlustmutante embryo-letal ist, was auf eine zentrale Rolle von ZMK1 auch während der Embryonalentwicklung schließen lässt (K. Philippar, persönliche Mitteilung).

4.2 Charakterisierung von OsAKT1

Im weiteren Verlauf der Arbeit sollte nun der AKT1-orthologe Kaliumkanal aus Reis untersucht werden. Diese wichtige Nutzpflanze avancierte vor allem nach der Veröffentlichung des Reisgenoms zu einem bedeutenden Modellorganismus, in dem auch bereits Elemente der Auxinsignalkette wie beispielsweise der Transkriptionsfaktor OsARF1 identifiziert worden waren. Dies und die Tatsache, dass in dieser Spezies bereits interessante Mutanten erhältlich waren, führten dazu, dass in der vorliegenden Arbeit der Kalium-Einwärtsgleichrichter OsAKT1 aus Reis isoliert und zunächst lokalisiert und biophysikalisch charakterisiert wurde.

4.2.1 Expressionsanalysen

Aufgrund von Sequenzhomologien zu bereits bekannten Kaliumkanälen verschiedener Pflanzen konnte OsAKT1 in die AKT1-Familie pflanzlicher *Shaker*-Kaliumkanäle eingeordnet werden, da er zu ZMK1 aus Mais und AKT1 aus *Arabidopsis thaliana* die größten Ähnlichkeiten aufweist (Abb. 20). Die Transkripte von *OsAKT1* wurden in Koleoptile und Wurzel weniger Tage alter Keimlinge nachgewiesen, wobei der höchste Gehalt an *OsAKT1*-mRNA in der Wurzel detektiert wurde (Abb. 21). Im Gegensatz hierzu wird das am nächsten mit *OsAKT1* verwandte Kaliumkanalgen *ZMK1* zwar auch in der Wurzel, aber hauptsächlich in der Koleoptile exprimiert (Philippar, 1999b). Für *AKT1* wurde eine bevorzugte Lokalisation der Transkripte in der Wurzel gezeigt (Basset, 1995). *OsAKT1* weist somit eher das Expressionsmuster von *AKT1* als das seines nächsten Verwandten *ZMK1* auf. Auch die transkriptionelle Aktivierung durch IAA, wie für *ZMK1* gezeigt, konnte für *OsAKT1* nicht beobachtet werden (Abb. 22). Im Hypokotyl von *Arabidopsis thaliana*, dem der Koleoptile von Gräsern homologen Organ in Dikotylen, wird die Expression von *AKT1* ebenfalls nicht durch exogen appliziertes Auxin reguliert (Philippar, 2004). In diesem Modellsystem werden vielmehr zwei Vertreter einer anderen *Shaker*-Kaliumkanal-Familie, *KAT1* und *KAT2*, durch IAA transkriptionell aktiviert (Philippar, 2004).

Es ist daher zu vermuten, dass OsAKT1 nicht wie ZMK1 an der Kaliumaufnahme während des auxininduzierten Zellstreckungswachstums beteiligt ist, sondern wie AKT1 zur Kalium-Ernährung der Pflanze beiträgt. Eine Analyse der verfügbaren genomischen Sequenzen im Reis ließ auf einen weiteren ZMK1-orthologen Kanal schließen, dessen Klonierung bislang jedoch noch nicht gelungen ist. Möglicherweise

könnte dieser zweite AKT1-ähnliche Kanal in Reis eine vergleichbare Funktion für die Zellelongation einnehmen wie ZMK1.

Erste, vorläufige Ergebnisse von Untersuchungen an überfluteten Reiskeimlingen deuten jedoch eine Rolle von OsAKT1 für das Streckungswachstum von Koleoptilenzellen an. In Reispflanzen, deren Keimung unter Wasser erfolgt, wird die Entwicklung von Wurzel und Primärblatt zunächst gehemmt, und nur die Koleoptile weist eine erhöhte Wachstumsrate auf, wodurch es dem Keimling ermöglicht wird, die Wasseroberfläche zu erreichen. Die noch überfluteten Teile der Pflanze können dann über die hohle Koleoptile mit Sauerstoff versorgt werden (Sauter, 2000). So ist die Koleoptile 5 Tage alter, unter Wasser gewachsener Pflanzen etwa doppelt so lang, aber viel dünner als diejenige von Keimlingen, die unter Kontrollbedingungen angezogen wurden (Kutschera, 1991). Die Wachstumsantwort in gefluteten Pflanzen wird vermutlich durch das Pflanzenhormon Ethylen ausgelöst. In Reiskeimlingen, die mit Wasser überschichtet worden waren, konnte bereits wenige Stunden nach Beginn des Experiments eine Erhöhung der OsAKT1-Expression beobachtet werden (nicht gezeigt). Die OsAKT1-vermittelte Aufnahme von Kalium in die Zellen der Koleoptile könnte demzufolge wichtig für die durch Ethylen induzierte Zellstreckung sein. Detailliertere zukünftige Analysen der OsAKT1-Expression und –Aktivität in überfluteten Reiskeimlingen werden zeigen, inwieweit dieser Kanal am ethylenregulierten Wachstum der Koleoptile beteiligt ist.

4.2.2 Biophysikalische Analyse

Durch heterologe Expression von OsAKT1 in HEK293-Zellen konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass OsAKT1 wie orthologe Kanäle aus anderen Pflanzenarten ein für Kalium selektiver, spannungsabhängiger Einwärtsgleichrichter ist, der durch extrazelluläre Protonen aktiviert und durch Cäsium und Calcium geblockt wird (Abb. 24; Downey, 2000; Hartje, 2000). Ähnliche Eigenschaften konnten in Protoplasten beobachtet werden, die aus Reisswurzeln, dem Organ höchster OsAKT1-Expression im Keimling, isoliert worden waren (Abb. 25). Auch hier wurden die durch Kalium getragenen Einwärtsströme durch die Ansäuerung des extrazellulären Mediums aktiviert und durch Cs⁺ oder Ca²⁺ geblockt. Diese Ergebnisse legen den Schluss nahe, dass OsAKT1 der dominante Kaliumaufnahmekanal in Reisswurzeln ist.

Nach heterologer Expression in Sf9-Zellen bilden die Untereinheiten von AKT1 einen funktionellen einwärtsgleichrichtenden Kanal (Gaymard, 1996), während der zweite

in *Arabidopsis*-Wurzeln für die Kaliumaufnahme verantwortliche Kanal AtKC1 weder im heterologen System noch *in vivo* funktionelle Homomere bildet (Reintanz, 2002). AtKC1 kann jedoch mit anderen Kanaluntereinheiten wie beispielsweise AKT1 funktionsfähige Heteromere bilden, wobei jedoch deren Eigenschaften geändert werden (Dreyer, 1997; Reintanz, 2002). So wiesen die Kaliumeinwärtsströme, die in Wurzelhaarprotoplasten gemessen wurden, in denen sowohl AKT1 als auch AtKC1 exprimiert werden, keinen Ca^{2+} -Block auf. In Wurzelprotoplasten der *atkc1*-Mutante jedoch, in der nur AKT1 als Einwärtsgleichrichter zur Verfügung steht, konnten die Kaliumeinwärtsströme durch Ca^{2+} spannungsabhängig geblockt werden (Reintanz, 2002). Der ausgeprägte Ca^{2+} -Block, der in Reis-Wurzelprotoplasten zu beobachten war, lässt demzufolge darauf schließen, dass die Beteiligung eines AtKC1-Orthologen an der Kaliumaufnahme in der Reiswurzel nur gering sein könnte. Die Isolierung des entsprechenden AtKC1-ähnlichen Kanals aus Reis und dessen Charakterisierung werden zukünftig zeigen, welchen Anteil verschiedene Kaliumkanäle in dieser Modellpflanze an der Nährstoffaufnahme aus dem Boden haben.

4.2.3 Bedeutung von OsAKT1 für die Kaliumhomöostase unter Salzstress

Wie bereits eingangs erwähnt, ist die Regulation der Kaliumaufnahme über die Wurzel speziell unter ungünstigen Wachstumsbedingungen wichtig. Nachdem OsAKT1 vermutlich den dominanten Kaliumaufnahmekanal in Reiswurzeln darstellt, wurde die Beteiligung dieses Proteins an der Aufrechterhaltung des Ionengleichgewichts in salzgestressten Keimlingen untersucht. Um die Relevanz der Kaliumaufnahme über die Wurzel für die Ionenhomöostase zu verdeutlichen, sollen im Folgenden kurz die Prozesse beschrieben werden, die durch Salzstress ausgelöst werden.

Obwohl Natrium von bestimmten Pflanzen als Mikronährstoff benötigt wird (Glenn, 1999), hemmen hohe Konzentrationen an NaCl im Boden das Wachstum der meisten Pflanzen. Die Versalzung des Bodens hat prinzipiell zwei Folgen: 1. Die hohe Ionenkonzentration in der Bodenlösung erniedrigt dort das Wasserpotential und erschwert somit die Aufnahme von Wasser und Nährstoffen über die Wurzel. (= osmotischer Stress). 2. Durch die Aufnahme der Salze in die Pflanze ändert sich das Verhältnis zwischen Kalium und Natrium im Cytosol; hohe intrazelluläre Chlorid-

bzw. Natriumkonzentrationen können toxisch wirken (= ionenspezifische Auswirkungen). Außerdem könnte die Toxizität von Natrium auch auf einer Akkumulation dieses Anions im Apoplasten beruhen. Gemäß der Örtli-Hypothese sollen erhöhte Natriumkonzentrationen im Zellwandraum und somit eine Erniedrigung des Wasserpotentials die irreversible Dehydrierung der Zellen zur Folge haben (Örtli, 1968). In der Tat konnte in Reispflanzen, die über die Wurzeln mildem Salzstress (50 mM NaCl) ausgesetzt waren, gezeigt werden, dass im Apoplasten der Blätter die Natriumkonzentration Werte um etwa 600 mM erreichte (Flowers, 1991). In der Praxis ist es häufig nicht möglich, den Schaden, den eine Pflanze unter Salzstress erleidet, einem der beschriebenen Faktoren zuzuordnen. In Gräsern konnte jedoch beobachtet werden, dass die Reaktion auf erhöhte Salzkonzentrationen im Boden in zwei Phasen unterteilt ist: Die anfängliche Hemmung des Wachstums tritt sehr schnell nach der Applikation von NaCl ein und wird durch das negativere Wasserpotential der Bodenlösung und somit Schwierigkeiten bei der Wasseraufnahme in die Wurzel bedingt. Von dieser ersten Phase sind nahezu alle Pflanzen gleich stark betroffen, wobei sich keine oder nur geringe Unterschiede in verschiedenen salztoleranten Sorten derselben Spezies zeigen. Während der zweiten Phase wird das Wachstum durch erhöhte cytosolische und apoplasmatische Na^+ -Konzentrationen gehemmt. Hier unterscheiden sich weniger salztolerante Spezies von salztoleranten dadurch, dass sie weniger gut in der Lage sind, eine Anhäufung toxischer Mengen an Na^+ in den Blättern zu vermeiden (Munns, 2002; Yeo, 1991). Um ein möglichst hohes K^+/Na^+ -Verhältnis beibehalten zu können, haben Pflanzen neben der Erhöhung der intrazellulären Kaliumkonzentration im Grunde drei Möglichkeiten: i) Vermeidung der Na^+ -Aufnahme in die Zelle, ii) aktiver Auswärtstransport von Na^+ und iii) aktive Absonderung von Natriumionen in die Vakuole. Das Zusammenspiel der hierfür verantwortlichen Transporter und Proteine ist in Abb. 31 schematisch dargestellt und soll im Folgenden etwas detaillierter beschrieben werden.

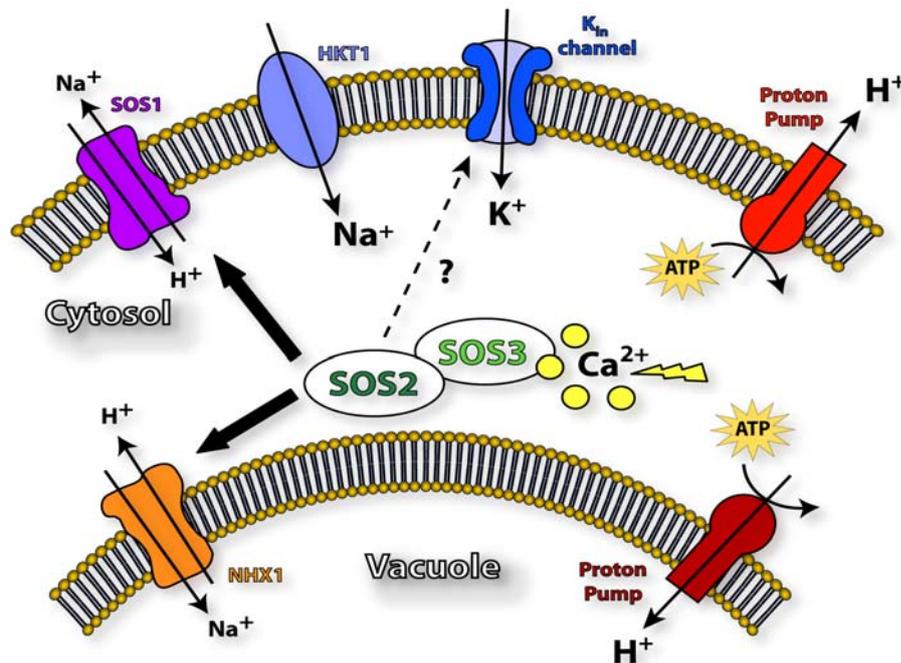


Abb. 31. Regulation der Ionenhomöostase durch den SOS-Signalweg (Signalkomponenten nach Zhu, 2002; Zhu, 2003).

Hohe intra- oder extrazelluläre Natriumkonzentrationen lösen ein cytosolisches Calciumsignal aus, durch welches der SOS3-SOS2-Proteinkinase-Komplex aktiviert wird. SOS3-SOS2 wiederum reguliert die Aktivität des Plasmamembran- Na^+/H^+ -Antiporters SOS1 und des vakuolären Na^+/H^+ -Antiporters NHX1, durch die der Export von Na^+ aus dem Cytosol erfolgt. Zudem wird durch SOS3-SOS2 möglicherweise die Expression einiger Gene und die Aktivität weiterer Transporter, wie der vakuolären H^+ -ATPase und in der Plasmamembran lokalisierter Ionenkanäle reguliert.

4.2.3.1 Wege der Natriumaufnahme in die Zelle

Durch das negative Membranpotential pflanzlicher Zellen wird der passive Einstrom von Natriumionen begünstigt. Na^+ kann die Membran beispielsweise über „high-affinity“-Kaliumtransporter wie HKT1 passieren. HKT1 wurde zuerst aus einer Wurzel-cDNA-Bank aus Weizen isoliert und nach Komplementation einer Kaliumaufnahme-defizienten Hefemutante als protonengetriebener „high-affinity“-Kaliumtransporter publiziert (Schachtman und Schroeder, 1994). Später wurde gezeigt, dass dieses Protein nicht den H^+/K^+ -Kotransport katalysiert, sondern hochaffinen K^+/Na^+ -Symport und niedrigaffinen Natriumtransport vermittelt. Erreicht die extrazelluläre Natriumkonzentration toxische Werte, wird der HKT1-abhängige Kaliumtransport blockiert und Natrium strömt in die Zelle (Rubio, 1995). Der HKT1-Orthologe in *Arabidopsis* hingegen konnte nach heterologer Expression in *Xenopus laevis* Oozyten als Natrium-selektiver Transporter charakterisiert werden (Uozumi,

2000). Auch in Reis wurden zwei HKT1-verwandte Transporter, OsHKT1 und OsHKT2 identifiziert. Während OsHKT1 wie AtHKT1 als Na^+ -Influx-Transporter fungiert, vermittelt OsHKT2 den Symport von K^+ und Na^+ über die Plasmamembran (Horie, 2001). In einem anderen Reis-Kultivar wurde beschrieben, dass OsHKT1 neben Na^+ auch noch andere Kationen wie K^+ , Rb^+ , Cs^+ und Li^+ transportiert (Golldack, 2002). In Einklang mit der Funktion von OsHKT1 für den Na^+ -Import in die Zelle ist die Transkription des entsprechenden Gens in salzgestressten Pflanzen im Vergleich zu Kontrollpflanzen erniedrigt (Golldack, 2002; Horie, 2001).

Generell ist festzuhalten, dass HKT1-orthologe Proteine die Aufnahme von Na^+ in die Zelle vermitteln. Im Hinblick auf die Toxizität von Natrium für pflanzliche Zellen verwundert es daher, dass diese Transporter im Laufe der Evolution beibehalten wurden. Ein möglicher Grund hierfür könnte die Bedeutung von HKTs für den Langstreckentransport von Na^+ zwischen Wurzel und Spross sein. In *athkt1*-Funktionsverlustmutanten konnte jedenfalls gezeigt werden, dass sich hier die Na^+ -Konzentration in Wurzeln salzgestresster Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp verringerte, wohingegen der Natriumgehalt in den Blättern gesteigert war (Mäser, 2002a). AtHKT1 scheint daher eine Rolle im Transport von Na^+ vom Spross in die Wurzeln zu spielen, möglicherweise über die Beladung des Phloems mit Na^+ -Ionen im Spross und die anschließende Entladung in der Wurzel, wobei dieser Kreislauf für die Tolerierung von Salzstress erforderlich zu sein scheint (Berthomieu, 2003, zusammengefasst in Horie und Schroeder, 2004 und Zhu, 2003). Obgleich Zhu, 2003 vorgeschlagen hat, dass auch die Aktivität von HKT-Transportern durch Komponenten des SOS-Signalweges (s. später) reguliert werden könnte, um in salzgestressten Pflanzen die Natriumaufnahme in die Zelle über HKT1-Orthologe zu blockieren, wurde von Rus, 2004 gezeigt, dass die Funktion von AtHKT1 nicht vom SOS-Weg abhängt.

Abgesehen von HKT1-ähnlichen Transportern kann Na^+ beispielsweise auch über Kanäle der KUP/HAK/KT (K⁺-uptake/High-affinity-K⁺/K⁺-Transporter) -Familie in die Zelle gelangen (zusammengefasst in Mäser, 2002b). Auch durch zyklische Nukleotide regulierte Ionenkanäle (CNGCs, Cyclic-nucleotide-gated channels) können den Import von Na^+ vermitteln (Talke, 2003). Ein aus Weizen isolierter Transporter, der keine strukturelle Ähnlichkeit zu anderen bekannten Ionenkanälen aufweist, LCT1 (Low-affinity Cation Transporter 1), wurde ebenfalls mit dem Einwärtstransport von Natrium in Verbindung gebracht (Schachtman, 1997). So

fürte die Expression von *LCT1* in salzsensitiven Hefen zu einer Hypersensitivität gegenüber NaCl und zur Erniedrigung des K^+/Na^+ -Verhältnisses, welche durch die gesteigerte Aufnahme von Na^+ und den Efflux intrazellulären Kaliums verursacht wurde (Amtmann, 2001).

4.2.3.2 Wege des Natriumexports aus dem Cytosol

Wie bereits erwähnt, können Pflanzen die cytosolische Natriumkonzentration durch den Export in den Apoplasten oder durch die Kompartimentierung von Na^+ in der Vakuole verringern und somit toxische Effekte vermeiden. Der energieabhängige Transport von Natrium über pflanzliche Membranen ist an einen elektrochemischen Gradienten gekoppelt, der durch die Aktivität von H^+ -ATPasen in Plasmalemma und Tonoplast und der vakuolären H^+ -PP_iase aufrechterhalten wird (Blumwald, 2000; Hasegawa, 2000).

Der Transport von Na^+ über die Tonoplastenmembran erfolgt über Na^+/H^+ -Antiporter der NHX-Familie (Blumwald, 2000; Fukuda, 1999; Yokoi, 2002). In Übereinstimmung mit deren potentieller Funktion für die Detoxifikation der Zelle wird die Transkription der Transporter *AtNHX1*, *AtNHX2* aus *Arabidopsis thaliana* und *OsNHX1* aus Reis durch die Behandlung der Pflanzen mit NaCl und ABA aktiviert (Yokoi, 2002). Die Überexpression von *AtNHX1* und *OsNHX1* führte außerdem zur Erhöhung der Salztoleranz der betreffenden Pflanzen (Apse, 1999; Fukuda, 2004). Auch *AtNHX1*-überexprimierende Raps- oder Tomatenpflanzen reagierten weniger empfindlich als Wildtyp-Pflanzen auf hohe Natriumkonzentrationen im Boden bzw. in der Nährlösung (Zhang, 2001; Zhang und Blumwald, 2001). Sowohl für *AtNHX1* als auch für *OsNHX1* wurde bereits eine Regulation durch den SOS3-SOS2-Proteinkinase-Komplex (s. unten) vorgeschlagen (Qiu, 2004; Zhu, 2002; Zhu, 2003).

Der Transport von Na^+ in den Apoplasten erfolgt in *Arabidopsis* über den in der Plasmamembran lokalisierten Na^+/H^+ -Antiporter SOS1 (Salt-overly-sensitive 1; Shi, 2000; Shi, 2002). Während *sos1*-Mutanten hypersensitiv auf erhöhte NaCl- oder LiCl-Konzentrationen reagieren (Wu, 1996; Zhu, 1998), kann durch die Überexpression dieses Gens die Salztoleranz der entsprechenden Pflanzen gesteigert werden (Shi, 2003). SOS1 wurde ursprünglich zusammen mit SOS2 und SOS3 bei der Suche nach NaCl-hypersensitiven Mutanten identifiziert (Wu, 1996). Während SOS1 signifikante Sequenzhomologien zu bereits bekannten in der Plasmamembran lokalisierten Na^+/H^+ -Antiportern aus Bakterien und Pilzen aufwies und den Natrium-Export in Kalluszellen zu vermitteln vermochte (Shi, 2002), übernehmen SOS2 und

SOS3 völlig andere Funktionen. SOS2 codiert für eine Proteinkinase (Liu, 2000), die durch das Ca^{2+} -bindende Protein SOS3 aktiviert wird (Halfter, 2000; Liu und Zhu, 1998). SOS3 könnte an der Perzeption des cytosolischen Calciumsignals in Reaktion auf Salzstress beteiligt sein, da es in Anwesenheit von Calcium die Phosphorylierungsaktivität von SOS2 induziert (Halfter, 2000). Die Aktivität des Na^+/H^+ -Antiporters SOS1 wiederum wird durch den Proteinkinase-Komplex aus SOS2 und SOS3 reguliert. In *sos2*- und *sos3*-Mutanten unterbleibt dementsprechend die Aktivierung von SOS1 durch erhöhte NaCl-Konzentrationen (Qiu, 2002). Nach heterologer Expression der SOS-Gene in Hefen konnte gezeigt werden, dass SOS1 durch SOS3-SOS2 phosphoryliert wird (Quintero, 2002). Auch die transkriptionelle Aktivierung von SOS1 in Antwort auf Salzstress scheint zumindest teilweise unter der Kontrolle von SOS2 und SOS3 zu stehen (Shi, 2000).

4.2.3.3 Regulation der OsAKT1-vermittelten Kaliumaufnahme unter Salzstress

Im Gegensatz zu den beschriebenen Transportmechanismen für Natriumionen ist die Regulation des Kaliumtransports in salzgestressten Pflanzen weniger gut untersucht. Zwar wurde bereits für verschiedene pflanzliche Kaliumtransporter eine transkriptionelle Regulation durch hohe Salzkonzentrationen beschrieben (s. 1.5), doch die Bedeutung dieser Expressionsänderungen konnte bislang nicht geklärt werden. Daher sollte in der vorliegenden Arbeit der Einfluss von NaCl-Stress auf die Aktivität von OsAKT1 näher untersucht werden.

Fünf Tage alte Reispflanzen, die auf salzhaltigem Medium gewachsen waren, wiesen erhebliche Wachstumsdefizite auf. Sowohl Wurzeln als auch Wurzelhaare waren signifikant kürzer als die der Kontrollpflanzen. Auch die Behandlung der Keimlinge mit einem Medium hoher Osmolarität führte jedoch ebenfalls zu einer Verzögerung des Wachstums (Abb. 26). Dieser Wachstumsphänotyp konnte mit einer Abnahme des in diesen Pflanzen gemessenen Kaliumgehalts korreliert werden (Abb. 27). In Übereinstimmung mit Golldack (2003) wurde weiterhin gezeigt, dass die Expression von *OsAKT1* unter Salzstress reprimiert wird, so dass die geringere Menge an Kalium in NaCl-behandelten Pflanzen auf die verringerte Aktivität von OsAKT1 in der Plasmamembran der Wurzelzellen zurückzuführen sein könnte. Diese Vermutung konnte in Patch-Clamp-Analysen an Wurzelprotoplasten salzgestresster Pflanzen

bestätigt werden: Tatsächlich waren hier die durch OsAKT1 vermittelten Kaliumeinströme im Vergleich zur Kontrolle erheblich reduziert (Abb 29).

Nachdem sowohl der Kaliumgehalt als auch das Wachstum in Keimlingen, die osmotischem Stress, aber nicht höheren NaCl-Konzentrationen ausgesetzt waren, ebenfalls reduziert war, ist davon auszugehen, dass ein Teil der Auswirkungen, die Salzstress auf die Reispflanzen hat, auf osmotische Effekte zurückzuführen ist. Wie bereits erwähnt, ist die Reaktion von Gräsern auf erhöhte Salzkonzentrationen im Boden in zwei Phasen gegliedert: In der ersten Phase ist das reduzierte Wachstum durch osmotischen Stress bedingt, erst später spielt die Toxizität des in der Pflanze akkumulierenden Natriums eine Rolle. Da die verwendeten Pflänzchen noch sehr jung waren (4-5 Tage) ist es durchaus wahrscheinlich, dass der osmotische Effekt der Salzbehandlung hier dominant war. Eine posttranslationale Regulation von OsAKT1 durch erhöhte intrazelluläre Natriumkonzentrationen, wie von Qi und Spalding, 2004 vorgeschlagen, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht bestätigt werden. Die hier vorliegenden Ergebnisse lassen vielmehr darauf schließen, dass die Expression von *OsAKT1* durch Salzstress reprimiert und somit auch die OsAKT1-Dichte in der Plasmamembran verringert wird. Die Abnahme der *OsAKT1*-Transkriptmenge könnte Ausdruck genereller Vitalitätseinbußen sein, die derart behandelte Pflanzen erleiden. Die Beeinträchtigungen in Wachstum und Kaliumhomöostase salzgestresster Keimlinge könnten demzufolge auf die verringerte Kaliumaufnahme über OsAKT1 zurückzuführen sein. Die Untersuchung von *OsAKT1*-überexprimierenden Pflanzen wird daher zeigen müssen, ob die erhöhte OsAKT1-vermittelte Kaliumaufnahme in die Wurzel die Salztoleranz von Reispflanzen zu erhöhen vermag.

5 Zusammenfassung

In vorausgegangenen Experimenten unseres Labors war bereits gezeigt worden, dass die Transkription des Kaliumaufnahme Kanals *ZMK1* durch IAA stimuliert wird und dass dieser eine wichtige Rolle für das differentielle Zellstreckungswachstum während der gravitropen Krümmung spielt. Dieser Annahme folgend wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob *ZMK1* auch in phototrop stimulierten Maiskeimlingen am differentiellen Wachstum der Koleoptile beteiligt ist. Im Hinblick auf diese Fragestellung wurden folgende Erkenntnisse gewonnen:

- i. Auch in photostimulierten Keimlingen folgt die Transkription von *ZMK1* dem endogenen IAA-Gradienten. Vor allem in der Koleoptilenspitze, wo die Umverteilung der freien IAA in die unbelichtete Flanke stattfindet, wurde der größte *ZMK1*-mRNA Gradient gemessen.
- ii. Der Krümmungswinkel photostimulierter Koleoptilen war erheblich kleiner als der ebenso lange gravitrop gereizter Keimlinge. Pflanzen, die auf einem Klinostaten einseitig mit Blaulicht bestrahlt worden waren, zeigten jedoch eine ähnlich starke Krümmung wie gravitrop gereizte Pflanzen. Der Einfluss der Schwerkraft verhinderte demzufolge eine stärkere Krümmung photostimulierter Koleoptilen.
- iii. Die ausgeprägtere Krümmungsreaktion von auf dem Klinostaten photostimulierten Maiskeimlingen war mit einer drastischen Auxinverschiebung in der Koleoptilenspitze und einer länger anhaltenden differentiellen Expression von *ZMK1* verbunden. Die Wachstumsantwort der Keimlinge konnte daher direkt mit der Verteilung freier IAA und der daraus resultierenden Regulation von *ZMK1* korreliert werden.
- iv. Die Wahrnehmung zweier verschiedener Reize (Schwerkraft, Blaulicht) mündet in einen gemeinsamen Signalweg, welcher zur Umverteilung endogenen Auxins innerhalb der Koleoptile und zur differentiellen Kaliumaufnahme über *ZMK1* in den gegenüberliegenden Flanken führt. Die hierdurch bedingte stärker ausgeprägte Zellstreckung in der unbelichteten Koleoptilhälfte hat schließlich die Krümmung des Keimlings zur Folge.

Mit dem Ziel, auch den *ZMK1*-orthologen Kaliumkanal in einer der wichtigsten Nutzpflanzen, Reis, zu charakterisieren, wurden molekularbiologische und

biophysikalische Analysen durchgeführt. Im Bezug auf die verfolgten Ziele dieser Arbeit lassen sich die gewonnenen Ergebnisse wie folgt zusammenfassen:

- v. Aus *Oryza sativa*-Keimlingsgewebe konnte das cDNA-Molekül *OsAKT1* isoliert und anhand der abgeleiteten Aminosäuresequenz der AKT1-Unterfamilie des *Shaker*- Typs pflanzlicher Kaliumkanäle zugeordnet werden.
- vi. Die Transkripte von *OsAKT1* wurden in Koleoptile und Wurzel 5 Tage alter Reiskeimlinge lokalisiert. Im Gegensatz zur Expression des *AKT1*-orthologen Kanals in Mais *ZMK1* blieb die Transkription von *OsAKT1* durch die Erhöhung exogenen Auxins in Koleoptilsegmenten unbeeinflusst. Demzufolge ist es unwahrscheinlich, dass *OsAKT1* ähnlich wie *ZMK1* eine wichtige Rolle während des auxininduzierten Streckungswachstums spielt.
- vii. Nach heterologer Expression in HEK293-Zellen wurde *OsAKT1* als spannungsabhängiger, kaliumselektiver Einwärtsgleichrichter charakterisiert, der durch Ca^{2+} und Cs^+ geblockt und durch extrazelluläre Protonen aktiviert wird. Ähnliche Eigenschaften konnten in Protoplasten beobachtet werden, die aus Keimlingswurzeln isoliert worden waren. Diese Ergebnisse legten den Schluss nahe, dass *OsAKT1* der dominante Kaliumaufnahme kanal in Reiwurzeln ist.
- viii. Keimlinge des verwendeten Reiskultivars waren in Reaktion auf Salzstress im Vergleich zu Kontrollpflanzen erheblich im Wachstum verzögert und wiesen einen geringeren Kaliumgehalt auf. Dieser Phänotyp wurde von einer Abnahme der *OsAKT1*-Transkripte und der Verringerung der durch *OsAKT1* getragenen Kaliumströme in Wurzelprotoplasten salzbehandelter Keimlinge begleitet. Dieser Zusammenhang deutet darauf hin, dass die *OsAKT1*-vermittelte Aufnahme von Kalium über die Wurzel essentiell für das pflanzliche Wachstum und die Ionenhomöostase salzgestresster Pflanzen ist.

6 Summary

Previous experiments from our lab had already demonstrated that the inward-rectifying K^+ channel *ZMK1* plays an important role for potassium uptake during cell elongation growth of gravistimulated maize coleoptiles. To investigate if this channel is involved in other auxin-regulated processes as well, the current work focused on the role of *ZMK1* for phototropic bending.

- i. Alike with gravistimulated plants, *ZMK1* expression also follows the IAA-redistribution in photostimulated maize seedlings. The gradient in *ZMK1*-mRNA was most pronounced in the coleoptile tip, where free IAA is translocated into the shaded coleoptile half.
- ii. The bending angle of photostimulated maize seedlings was much smaller than that reached after gravistimulation. Plants photostimulated on a clinostat, however, displayed a similar bending angle as seedlings responding to a gravistimulus, indicating that gravity restricts further bending of the coleoptile.
- iii. Stronger phototropic bending of plants illuminated on a clinostat was accompanied by dramatic translocation of free IAA in the coleoptile tip and prolonged differential expression of *ZMK1*. Thus, the growth response of maize seedlings could be directly correlated with IAA-redistribution in the coleoptile and the resulting differential regulation of *ZMK1* transcription.
- iv. The perception of two different stimuli (gravity, blue light) thus merges into a common signaling pathway, leading to IAA-redistribution and differential K^+ -uptake in the two flanks of the coleoptile. As a consequence, enhanced cell elongation growth in one half of the organ gives rise to gravi- or phototropic bending.

To investigate the role of the *ZMK1*-ortholog in one of the most important food crops, rice, the respective gene was isolated. Based on molecular and biophysical approaches the gene activity and the function of the gene product were analyzed.

- v. The cDNA of *OsAKT1* was isolated from rice seedlings. Based on the derived amino acid-sequence, *OsAKT1* could be grouped into the *AKT1*-family of plant *Shaker-K⁺*-channels.
- vi. Transcripts of *OsAKT1* were localized in root and coleoptile of 5-days-old rice seedlings. In contrast to *ZMK1*, *OsAKT1*-expression was not affected by

changes in IAA concentration. OsAKT1 therefore does not seem to play a major role in auxin-induced cell elongation processes.

- vii. Following heterologous expression in HEK293 cells, OsAKT1 was characterized as a voltage-dependent, K⁺-selective inward rectifier activated by extracellular protons and blocked by Ca²⁺ and Cs⁺. The K⁺ uptake channel measured in protoplast of root epidermal cells showed almost the same functional properties, indicating that OsAKT1 represents the dominant K⁺-uptake channel in rice roots.
- viii. Rice seedlings subjected to salt stress displayed severe growth reduction and reduced K⁺-concentrations both in roots and shoots. This phenotype was accompanied by decreased *OsAKT1*-expression and diminished K_{in}⁺-currents in root protoplasts. Therefore, OsAKT1-mediated K⁺-uptake of root cells seems to be essential for plant growth and ion homeostasis during salt stress.

7 Literaturverzeichnis

- Abel,S. and Theologis,A.** (1996) Early Genes and Auxin Action. *Plant Physiology* **111**:9-17.
- Ache,P., Becker,D., Ivashikina,N., Dietrich,P., Roelfsema,M.R.G., and Hedrich,R.** (2000) GORK, a delayed outward rectifier expressed in guard cells of *Arabidopsis thaliana*, is a K⁺-selective, K⁺-sensing ion channel. *FEBS Lett.* **486**:93-98.
- Altschul,S.F., Gish,W., Miller,W., Meyers,E.W., and Lipman,D.J.** (1990) Basic Local Alignment Search Tool. *Journal of Molecular Biology* **215**:403-410.
- Ambudkar,S.V., Dey,S., Hrycyna,C.A., Ramachandra,M., Pastan,I., and Gottesman,M.M.** (1999) Biochemical, cellular and pharmacological aspects of the multidrug transporter. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* **39**:361-398.
- Amtmann,A., Fischer,M., Marsh,E.L., Stefanovic,A., Sanders,D., and Schachtman,D.P.** (2001) The Wheat cDNA LCT1 Generates Hypersensitivity to Sodium in a Salt-Sensitive Yeast Strain. *Plant Physiology* **126**:1061-1071.
- Apse,M.P., Aharon,G.S., Snedden,W.A., and Blumwald,E.** (1999) Salt Tolerance Conferred by Overexpression of a Vacuolar Na⁺/H⁺ Antiport in *Arabidopsis*. *Science* **285**:1256-1258.
- Barbier-Brygoo,H., Ephritikhine,G., Klämbt,D., Ghislain,M., and Guern,J.** (1989) Functional Evidence for an Auxin Receptor at the Plasmalemma of Tobacco Mesophyll Protoplasts. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **86**:891-895.
- Barbier-Brygoo,H., Ephritikhine,G., Klämbt,D., Maurel,C., Palme,K., Schell,J., and Guern,J.** (1991) Perception of the auxin signal at the plasma membrane of tobacco mesophyll protoplasts. *The Plant Journal* **1**:83-93.
- Basset,M., Conejero,G., Lepetit,M., Fourcroy,P., and Sentenac,H.** (1995) Organization and expression of the gene coding for the potassium transport system AKT1 of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol.Biol.* **29**:947-958.
- Becker,D. and Hedrich,R.** (2002) Channelling auxin action: Modulation of ion transport by indole-3-acetic acid. *Plant Mol.Biol.* **49**:349-356.
- Bennett,M.J., Marchant,A., Green,H.G., May,S.T., Ward,S.P., Millner,P.A., Walker,A.R., Schulz,B., and Feldmann,K.A.** (1996) *Arabidopsis* AUX1 gene: A permease-like regulator of root gravitropism. *Science* **273**:948-950.
- Berleth,T., Krogan,N.T., and Scarpella,E.** (2004) Auxin signals -- turning genes on and turning cells around. *Current Opinion in Plant Biology* **7**:553-563.
- Berthomieu,P., Conejero,G., Nublat,A., Brackenbury,W.J., Lambert,C., Savio,C., Uozumi,N., Oiki,S., Yamada,K., Cellier,F., Gosti,F., Simonneau,T., Essah,P.A., Tester,M., Very,A.A., Sentenac,H., and Casse,F.** (2003) Functional analysis of AtHKT1 in *Arabidopsis* shows that Na⁺ recirculation by the phloem is crucial for salt tolerance. *EMBO J.* **22**:2004-2014.

- Bertl,A., Reid,J., Sentenac,H., and Slayman,C.** (1997) Functional comparison of plant inward-rectifier channels expressed in yeast. *J.Exp.Bot.* **48**:405-413.
- Birnboim,H.C. and Doly,J.** (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research* **7**:1513-1523.
- Blancaflor,E.B. and Masson,P.H.** (2003) Plant Gravitropism. Unraveling the Ups and Downs of a Complex Process. *Plant Physiology* **133**:1677-1690.
- Blilou,I., Xu,J., Wildwater,M., Willemsen,V., Paponov,I., Friml,J., Heidstra,R., Aida,M., Palme,K., and Scheres,B.** (2005) The PIN auxin efflux facilitator network controls growth and patterning in *Arabidopsis* roots. *Nature* **433**:39-44.
- Blumwald,E., Aharon,G.S., and Apse,M.P.** (2000) Sodium transport in plant cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1465**:140-151.
- Bradford,M.M.** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**:248-254.
- Briggs,W.R., Beck,C.F., Cashmore,A.R., Christie,J.M., Hughes,J., Jarillo,J.A., Kagawa,T., Kanegae,H., Liscum,E., and Nagatani et,a.** (2001) The phototropin family of photoreceptors. *Plant Cell* **13**:993-997.
- Briggs,W.R. and Christie,J.M.** (2002) Phototropins 1 and 2: versatile plant blue-light receptors. *Trends Plant Sci.* **7**:204-210.
- Buschmann,P.H., Vaidyanathan,R., Gassmann,W., and Schroeder,J.I.** (2000) Enhancement of Na⁺ Uptake Currents, Time-Dependent Inward-Rectifying K⁺ Channel Currents, and K⁺ Channel Transcripts by K⁺ Starvation in Wheat Root Cells. *Plant Physiology* **122**:1387-1398.
- Campanella,J.J., Olajide,A.F., Magnus,V., and Ludwig-Müller,J.** (2004) A Novel Auxin Conjugate Hydrolase from Wheat with Substrate Specificity for Longer Side-Chain Auxin Amide Conjugates. *Plant Physiology* **135**:2230-2240.
- Catala,C., Rose,J.K.C., and Bennett,A.B.** (1997) Auxin regulation and spatial localization of an endo-1,4-b-D-glucanase and a xyloglucan endotransglycosylase in expanding tomato hypocotyls. *The Plant Journal* **12**:417-426.
- Catala,C., Rose,J.K.C., and Bennett,A.B.** (2000) Auxin-Regulated Genes Encoding Cell Wall-Modifying Proteins Are Expressed during Early Tomato Fruit Growth. *Plant Physiology* **122**:527-534.
- Chen,J.G., Shimomura,S., Sitbon,F., Sandberg,G., and Jones,A.M.** (2001a) The role of auxin-binding protein 1 in the expansion of tobacco leaf cells. *The Plant Journal* **28**:607-617.
- Chen,J.G., Ullah,H., Young,J.C., Sussman,M.R., and Jones,A.M.** (2001b) ABP1 is required for organized cell elongation and division in *Arabidopsis* embryogenesis. *Genes Dev.* **15**:902-911.

- Chisnell, J.R. and Bandurski, R.S.** (1988) Translocation of radiolabeled indole-3-acetic acid and indole-3-acetyl-myoinositol from kernel to shoot of *Zea mays* L. *Plant Physiol.* **86**:79-84.
- Cholodny, N.** (1928) Beiträge zur hormonalen Theorie von Tropismen. *Planta* **6**:118-134.
- Christian, M., Steffens, B., Schenck, D., and Lüthen, H.** (2003) The diageotropic mutation of tomato disrupts a signalling chain using extracellular auxin binding protein 1 as a receptor. *Planta* **218**:309-314.
- Clark, J.M.** (1988) Novel non-templated nucleotide addition reactions catalyzed by procaryotic and eucaryotic DNA polymerases. *Nucleic Acids Research* **16**:9677-9686.
- Claussen, M., Lüthen, H., Blatt, M., and Böttger, M.** (1997) Auxin-induced growth and its linkage to potassium channels. *Planta* **201**:227-234.
- Cosgrove, D.J.** (2000) Expansive growth of plant cell walls. *Plant Physiol. Biochem.* **38**:109-124.
- Darwin, C.** (1880) *The Power of Movements in Plants*. London: John Murray, Albemarle Street.
- Deeken, R., Ivashikina, N., Czirjak, T., Philippar, K., Becker, D., Ache, P., and Hedrich, R.** (2003) Tumour development in *Arabidopsis thaliana* involves the Shaker-like K⁺ channels AKT1 and AKT2/3. *Plant J.* **34**:778-787.
- Deeken, R., Sanders, C., Ache, P., and Hedrich, R.** (2000) Developmental and light-dependent regulation of a phloem-localised K⁺ channel of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **23**:285-290.
- Dharmasiri, N., Dharmasiri, S., Jones, A.M., and Estelle, M.** (2003a) Auxin Action in a Cell-Free System. *Current Biology* **13**:1418-1422.
- Dharmasiri, N. and Estelle, M.** (2004) Auxin signaling and regulated protein degradation. *Trends in Plant Science* **9**:302-308.
- Dharmasiri, S., Dharmasiri, N., Hellmann, H., and Estelle, M.** (2003b) The RUB/Nedd8 conjugation pathway is required for early development in *Arabidopsis*. *EMBO J.* **22**:1762-1770.
- Dörner, P.** (2000) Root patterning: Does auxin provide positional cues? *Current Biology* **10**:R201-R203.
- Downey, P., Szabo, I., Ivashikina, N., Negro, A., Guzzo, F., Ache, P., Hedrich, R., Terzi, M., and Schiavo, F.L.** (2000) KDC1, a novel carrot root hair K⁺ channel: Cloning, characterization, and expression in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* **275**:39420-39426.
- Dreyer, I., Antunes, S., Hoshi, T., Müller-Röber, B., Palme, K., Pongs, O., Reintanz, B., and Hedrich, R.** (1997) Plant K⁺ channel alpha-subunits assemble indiscriminately. *Biophysical J.* **72**:2143-2150.

- Edlund,A., Eklöf,S., Sundberg,B., Moritz,T., and Sandberg,G.** (1995) A microscale technique for gas chromatography-mass spectrometry measurements of picogram amounts of indole-3-acetic acid in plant tissues. *Plant Physiol.* **108**:1043-1047.
- Epstein,E., Cohen,J.D., and Bandurski,R.S.** (1980) Concentration and Metabolic Turnover of Indoles in Germinating Kernels of *Zea mays* L. *Plant Physiol.* **65**:415-421.
- Felle,H., Peters,W., and Palme,K.** (1991) The electrical response of maize to auxins. *Biochim.Biophys.Acta* **1064**:199-204.
- Firn,R.D. and Digby,J.** (1979) A study of the autotropic straightening reaction of a shoot previously curved during geotropism. *Plant Cell Environ.* **2**:149-154.
- Flowers,T.J., Hajibagheri,M.A., and Yeo,A.R.** (1991) Ion Accumulation in the Cell-Walls of Rice Plants Growing Under Saline Conditions - Evidence for the Oertli Hypothesis. *Plant Cell and Environment* **14**:319-325.
- Frias,I., Caldeira,M.T., Perez-Castineira,J.R., Navarro-Avino,J.P., Cullianez-Macia,F.A., Kuppinger,O., Stransky,H., Pages,M., Hager,A., and Serrano,R.** (1996) A major isoform of the maize plasma membrane H⁺-ATPase: characterization and induction by auxin in coleoptiles. *Plant Cell* **8**:1533-1544.
- Friml,J.** (2003) Auxin transport - Shaping the plant. *Curr.Opin.Plant Biol.* **6**:7-12.
- Friml,J., Benkova,E., Blilou,I., Wisniewska,J., Hamann,T., Ljung,K., Woody,S., Sandberg,G., Scheres,B., Jürgens,G., and Palme,K.** (2002a) AtPIN4 mediates sink-driven auxin gradients and root patterning in *Arabidopsis*. *Cell* **108**:661-673.
- Friml,J. and Palme,K.** (2002) Polar auxin transport - old questions and new concepts? *Plant Molecular Biology* **49**:273-284.
- Friml,J., Wisniewska,J., Benkova,E., Mendgen,K., and Palme,K.** (2002b) Lateral relocation of auxin efflux regulator PIN3 mediates tropism in *Arabidopsis*. *Nature* **415**:806-809.
- Fuchs, I.** (1999) Untersuchung zur Expressionskontrolle von Kaliumkanalgenen durch das Phytohormon Auxin in der Koleoptile von *Zea mays* L. Staatsexamensarbeit, Bayerische Julius-Maximilians-Universität Würzburg
- Fuchs,I., Philippar,K., Ljung,K., Sandberg,G., and Hedrich,R.** (2003) Blue light regulates an auxin-induced K⁺ channel gene in the maize coleoptile. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **100**:11795-11800.
- Fukuda,A., Nakamura,A., Tagiri,A., Tanaka,H., Miyao,A., Hirochika,H., and Tanaka,Y.** (2004) Function, Intracellular Localization and the Importance in Salt Tolerance of a Vacuolar Na⁺/H⁺ Antiporter from Rice. *Plant and Cell Phys.* **45**:146-159.
- Fukuda,A., Nakamura,A., and Tanaka,Y.** (1999) Molecular cloning and expression of the Na⁺/H⁺ exchanger gene in *Oryza sativa*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression* **1446**:149-155.

- Fukuda,H.** (1997) Tracheary Element Differentiation. *The Plant Cell* **9**:1147-1156.
- Gädeke,N., Klein,M., Kolukisaoglu,Ü., Forestier,C., Müller,A., Ansorge,M., Becker,D., Mamnun,Y., Kuchler,K., Schulz,B., Müller-Röber,B., and Martinoia,E.** (2001) The *Arabidopsis thaliana* ABC transporter AtMRP5 controls root development and stomata movement. *EMBO J.* **20**:1875-1887.
- Gälweiler,L., Guan,C., Müller,A., Wisman,E., Mendgen,K., Yephremov,A., and Palme,K.** (1998) Regulation of polar auxin transport by AtPIN1 in *Arabidopsis* vascular tissue. *Science* **282**:2226-2230.
- Gaymard,F., Cerutti,M., Horeau,C., Lemaillet,G., Urbach,S., Ravallec,M., Devauchelle,G., Sentenac,H., and Thibaud,J.B.** (1996) The baculovirus/insect cell system as an alternative to *Xenopus* oocytes. First characterization of the AKT1 K⁺ channel from *Arabidopsis thaliana*. *J.Biol.Chem.* **271**:22863-22870.
- Gehring,C.A., McConchie,R.M., Venis,M.A., and Parish,R.W.** (1998) Auxin-binding-protein antibodies and peptides influence stomatal opening and alter cytoplasmic pH. *Planta* **205**:581-586.
- Geldner,N., Friml,J., Stierhof,Y.D., Jürgens,G., and Palme,K.** (2001) Auxin transport inhibitors block PIN1 cycling and vesicle trafficking. *Nature* **413**:425-428.
- Glenn,E.P., Brown,J.J., and Blumwald,E.** (1999) Salt tolerance and crop potential of halophytes. *Critical Reviews in Plant Sciences* **18**:227-255.
- Goldack,D., Quigley,F., Michalowski,C.B., Kamasani,U.R., and Bohnert,H.J.** (2003) Salinity stress-tolerant and -sensitive rice (*Oryza sativa* L.) regulate *AKT1*-type potassium channel transcripts differently. *Plant Mol.Biol.* **51**:71-81.
- Goldack,D., Su,H., Quigley,F., Kamasani,U.R., Munoz-Garay,C., Balderas,E., Popova,O.V., Bennett,J., Bohnert,H.J., and Pantoja,O.** (2002) Characterization of a HKT-type transporter in rice as a general alkali cation transporter. *The Plant J.* **31**:529-542.
- Goswami,K.K.A. and Audus,L.J.** (1976) Distribution of Calcium, Potassium and Phosphorus in *Helianthus annuus* Hypocotyls and *Zea mays* Coleoptiles in Relation to Tropic Stimuli and Curvatures. *Ann.Bot.* **40**:49-64.
- Gottesman,M.M., Fojo,T., and Bates,S.E.** (2002) Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nature Reviews.Cancer* **2**:48-58.
- Graham,F.L., Smiley,J., Russell,W.C., and Nairn,R.** (1977) Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* **36**:59-74.
- Gray,W.M., Kepinski,S., Rouse,D., Leyser,O., and Estelle,M.** (2001) Auxin regulates SCF^{TIR1}-dependent degradation of AUX/IAA proteins. *Nature* **414**:271-276.
- Gray,W.M., del Pozo,J.C., Walker,L., Hobbie,L., Risseuw,E., Banks,T., Crosby,W.L., Yang,M., Ma,H., and Estelle,M.** (1999) Identification of an SCF ubiquitin-ligase complex required for auxin response in *Arabidopsis thaliana*. *Genes Dev.* **13**:1678-1691.

- Guilfoyle, T.J. and Hagen, G.** (2001) Auxin response factors. *Journal of Plant Growth Regulation* **20**:281-291.
- Guilfoyle, T.J., Hagen, G., Ulmasov, T., and Murfett, J.** (1998) How Does Auxin Turn On Genes? *Plant Physiology* **118**:341-347.
- Hagen, G. and Guilfoyle, T.** (2002) Auxin-responsive gene expression: genes, promoters and regulatory factors. *Plant Molecular Biology* **49**:373-385.
- Hager, A. and Brich, M.** (1993) Blue-light-induced phosphorylation of a plasma-membrane protein from phototropically sensitive tips of maize coleoptiles. *Planta* **189**:567-576.
- Hager, A., Menzel, H., and Krauss, A.** (1971) Versuche und Hypothese zur Primärwirkung des Auxins beim Streckungswachstum. *Planta* **100**:47-75.
- Halfter, U., Ishitani, M., and Zhu, J.K.** (2000) The *Arabidopsis* SOS2 protein kinase physically interacts with and is activated by the calcium-binding protein SOS3. *PNAS* **97**:3735-3740.
- Hanahan, D.** (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology* **166**:557-580.
- Hartje, S., Zimmermann, S., Klonus, D., and Müller-Röber, B.** (2000) Functional characterisation of LKT1, a K⁺ uptake channel from tomato root hairs, and comparison with the closely related potato inwardly rectifying K⁺ channel SKT1 after expression in *Xenopus* Oocytes. *Planta* **210**:723-731.
- Hasegawa, P.M., Bressan, R.A., Zhu, J.K., and Bohnert, H.J.** (2000) Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant. Mol. Biol.* **51**:463-499.
- Henderson, J., Baulry, J.M., Ashford, D.A., Oliver, S.C., Hawes, C.R., Lazarus, C.M., Venis, M.A., and Napier, R.M.** (1997) Retention of maize auxin-binding protein in the endoplasmic reticulum: quantifying escape and the role of auxin. *Planta* **202**:313-323.
- Hertel, R., Thomson, K., and Russo, V.E.A.** (1972) *In vitro* auxin binding to particulate cell fractions from corn coleoptiles. *Planta* **107**:325-340.
- Hesse, T., Feldwisch, J., Balshusemann, D., Bauw, G., Puype, M., Vandekerckhove, J., Löbler, M., Klämbt, D., Schell, J., and Palme, K.** (1989) Molecular cloning and structural analysis of a gene from *Zea mays* (L.) coding for a putative receptor for the plant hormone auxin. *EMBO J.* **8**:2453-2461.
- Hollander, M.C. and Fornace, A.J.J.** (1990) Estimation of relative mRNA content by filter hybridization to a polythymidylate probe. *Biotechniques* **9**:174-179.
- Horie, T., Yoshida, K., Nakayama, H., Yamada, K., Oiki, S., and Shinmyo, A.** (2001) Two types of HKT transporters with different properties of Na⁺ and K⁺ transport in *Oryza sativa*. *Plant J.* **27**:129-138.
- Horie, T. and Schroeder, J.I.** (2004) Sodium Transporters in Plants. Diverse Genes and Physiological Functions. *Plant Physiology* **136**:2457-2462.

- Hoth,S., Dreyer,I., Dietrich,P., Becker,D., Müller-Röber,B., and Hedrich,R.** (1997) Molecular basis of plant-specific acid activation of K⁺ uptake channels. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **94**:4806-4810.
- Hutchison,K.W., Singer,P.B., McInnis,S., Diaz-Sala,C., and Greenwood,M.S.** (1999) Expansins Are Conserved in Conifers and Expressed in Hypocotyls in Response to Exogenous Auxin. *Plant Physiology* **120**:827-832.
- Iino,M.** (1991) Mediation of tropisms by lateral translocation of endogenous IAA in maize coleoptiles. *Plant Cell Environ.* **14**:279-286.
- Iino,M.** (1995) Gravitropism and phototropism of maize coleoptiles: evaluation of the Cholodny-Went theory and through effects of auxin application and decapitation. *Plant Cell Physiol.* **36**:361-367.
- Iino,M.** (2001) Phototropism in higher plants. In *Photomovement*, D.P.Häder and M.Lebert, eds (Amsterdam: Elsevier Science), pp. 659-811.
- Inoue,H., Nojima,H., and Okayama,H.** (1990) High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* **96**:23-28.
- Ivashikina,N., Becker,D., Ache,P., Meyerhoff,O., Felle,H.H., and Hedrich,R.** (2001) K⁺ channel profile and electrical properties of *Arabidopsis* root hairs. *FEBS Letters* **508**:463-469.
- Jones,A.M.** (1990) Location of transported auxin in etiolated maize shoots using 5-azidoindole-3-acetic acid. *Plant Physiology* **93**:1154-1161.
- Jones,A.M., Im,K.H., Savka,M.A., Wu,M.J., DeWitt,N.G., Shillito,R., and Binns,A.N.** (1998) Auxin-dependent cell expansion mediated by overexpressed auxin-binding protein 1. *Science* **282**:1114-1117.
- Kaldenhoff,R. and Iino,M.** (1997) Restoration of phototropic responsiveness in decapitated maize coleoptiles. *Plant Physiol.* **114**:1267-1272.
- Kepinski,S. and Leyser,O.** (2002) Ubiquitination and Auxin Signaling: A Degrading Story. *The Plant Cell* **14**:S81-S95.
- Kepinski,S. and Leyser,O.** (2004) Auxin-induced SCF^{TIR1}-Aux/IAA interaction involves stable modification of the SCF^{TIR1} complex. *PNAS* **101**:12381-12386.
- Kikuchi,S., Satoh,K., Nagata,T., Kawagashira,N., Doi,K., Kishimoto,N., Yazaki,J., Ishikawa,M., Yamada,H., Ooka,H., and et al.** (2003) Collection, mapping, and annotation of over 28,000 cDNA clones from japonica rice: The rice full-length cDNA consortium. *Science* **301**:376-379.
- Klein,M., Geisler,M., Suh,S.J., Kolukisaoglu,Ü., Azevedo,L., Plaza,S., Curtis,M.D., Richter,A., Weder,B., Schulz,B., and Martinoia,E.** (2004) Disruption of AtMRP4, a guard cell plasma membrane ABCC-type ABC transporter, leads to deregulation of stomatal opening and increased drought susceptibility. *The Plant Journal* **39**:219-236.

Knauss,S., Rohrmeier,T., and Lehle,L. (2003) The auxin-induced maize gene ZmSAUR2 encodes a short-lived nuclear protein expressed in elongating tissues. *J.Biol.Chem.* **278**:23936-23943.

Kozak,M. (1990) Downstream secondary structure facilitates recognition of initiator codons by eukaryotic ribosomes. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **87**:8301-8305.

Kutschera,U., Siebert,C., Masuda,Y., and Sievers,A. (1991) Effects of submergence on development and gravitropism in the coleoptile of *Oryza sativa* L. *Planta* **183**:112-119.

Lagarde,D., Basset,M., Lepetit,M., Conejero,G., Gaymard,F., Astruc,S., and Grignon,C. (1996) Tissue-specific expression of *Arabidopsis* AKT1 gene is consistent with a role in K⁺ nutrition. *The Plant Journal: for Cell and Molecular Biology* **9**:195-203.

Leyser,O. (2002) Molecular genetics of auxin signaling. *Annual Review of Plant Biology* **53**:377-398.

Liu,C.m., Xu,Z.h., and Chua,N.H. (1993) Auxin Polar Transport Is Essential for the Establishment of Bilateral Symmetry during Early Plant Embryogenesis. *The Plant Cell* **5**:621-630.

Liu,J., Ishitani,M., Halfter,U., Kim,C.S., and Zhu,J.K. (2000) The *Arabidopsis thaliana* SOS2 gene encodes a protein kinase that is required for salt tolerance. *PNAS* **97**:3730-3734.

Liu,J. and Zhu,J.K. (1998) A Calcium Sensor Homolog Required for Plant Salt Tolerance. *Science* **280**:1943-1945.

Ljung,K., Bhalerao,R.P., and Sandberg,G. (2001a) Sites and homeostatic control of auxin biosynthesis in *Arabidopsis* during vegetative growth. *The Plant Journal* **28**:465-474.

Ljung,K., Hull,A.K., Kowalczyk,M., Marchant,A., Celenza,J., Cohen,J.D., and Sandberg,G. (2002) Biosynthesis, conjugation, catabolism and homeostasis of indole-3-acetic acid in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology* **49**:249-272.

Ljung,K., Ostin,A., Lioussanne,L., and Sandberg,G. (2001b) Developmental Regulation of Indole-3-Acetic Acid Turnover in Scots Pine Seedlings. *Plant Physiology* **125**:464-475.

Löbler,M. and Klämbt,D. (1985) Auxin-binding protein from coleoptile membranes of corn (*Zea mays* L.). I. Purification by immunological methods and characterization. *J.Biol.Chem.* **260**:9848-9853.

Lohse,G. and Hedrich,R. (1992) Characterization of the plasma membrane proton ATPase from *Vicia faba* guard cells: Modulation by extracellular factors and seasonal changes. *Planta* **188**:206-214.

Lomax,T. (1995) Auxin Transport. In *Plant Hormones: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*, P.J.Davies, ed (Dordrecht, Netherlands: Kluwer), pp. 509-530.

- Maathuis,F.J.M. and Amtmann,A.** (1999) K^+ Nutrition and Na^+ Toxicity: The Basis of Cellular K^+/Na^+ Ratios. *Ann Bot* **84**:123-133.
- Mallory,A.C., Bartel,D.P., and Bartel,B.** (2005) MicroRNA-Directed Regulation of *Arabidopsis* AUXIN RESPONSE FACTOR17 Is Essential for Proper Development and Modulates Expression of Early Auxin Response Genes. *The Plant Cell* **17**:1360-1375.
- Marchant,A., Kargul,J., May,S.T., Muller,P., Delbarre,A., Perrot-Rechenmann,C., and Bennett,M.J.** (1999) AUX1 regulates root gravitropism in *Arabidopsis* by facilitating auxin uptake within root apical tissues. *EMBO J.* **18**:2066-2073.
- Marschner,H.** (1995) *Mineral Nutrition of higher plants*. London: Academic Press.
- Martinoia,E., Grill,E., Tommasini,R., Kreuz,K., and Amrhein,N.** (1993) ATP-dependent glutathione S-conjugate 'export' pump in the vacuolar membrane of plants. *Nature* **364**:247-249.
- Mäser,P., Eckelman,B., Vaidyanathan,R., Horie,T., Fairbairn,D.J., Kubo,M., Yamagami,M., Yamaguchi,K., Nishimura,M., and Uozumi,N.** (2002a) Altered shoot/root Na^+ distribution and bifurcating salt sensitivity in *Arabidopsis* by genetic disruption of the Na^+ transporter AtHKT1. *FEBS Letters* **531**:157-161.
- Mäser,P., Gierth,M., and Schroeder,J.I.** (2002b) Molecular mechanisms of potassium and sodium uptake in plants. *Plant and Soil* **247**:43-54.
- Mcclure,B.A. and Guilfoyle,T.** (1987) Characterization of A Class of Small Auxin-Inducible Soybean Polyadenylated Rnas. *Plant Molecular Biology* **9**:611-623.
- Mcclure,B.A. and Guilfoyle,T.** (1989) Rapid Redistribution of Auxin-Regulated RNAs During Gravitropism. *Science* **243**:91-93.
- Mouline,K., Very,A.A., Gaymard,F., Boucherez,J., Pilot,G., Devic,M., Bouchez,D., Thibaud,J.B., and Sentenac,H.** (2002) Pollen tube development and competitive ability are impaired by disruption of a *Shaker* K^+ channel in *Arabidopsis*. *Genes Dev.* **16**:339-350.
- Mulkey,T.J., Kuzmanoff,K.M., and Evans,M.L.** (1981) Correlations between proton-efflux patterns and growth patterns during geotropism and phototropism in maize and sunflower. *Planta* **152**:239-241.
- Müller,A., Guan,C., Gälweiler,L., Tanzler,P., Huijser,P., Marchant,A., Parry,G., Bennett,M., Wisman,E., and Palme,K.** (1998) AtPIN2 defines a locus of *Arabidopsis* for root gravitropism control. *EMBO J.* **17**:6903-6911.
- Munns,R.** (2002) Comparative physiology of salt and water stress. *Plant, Cell and Environment* **25**:239-250.
- Napier,R.M., David,K.M., and Perrot-Rechenmann,C.** (2002) A short history of auxin-binding proteins. *Plant Molecular Biology* **49**:339-348.
- Nicholas,K.B., Nicholas,H.B.Jr., and Deerfield,D.W.** (1997) GeneDoc: Analysis and Visualization of Genetic Variation. *EMBNEW.NEWS* **4**:14.

- Noh,B., Bandyopadhyay,A., Peer,W.A., Spalding,E.P., and Murphy,A.S.** (2003) Enhanced gravi- and phototropism in plant mdr mutants mislocalizing the auxin efflux protein PIN1. *Nature* **423**:999-1002.
- Noh,B., Murphy,A.S., and Spalding,E.P.** (2001) Multidrug Resistance-like Genes of *Arabidopsis* Required for Auxin Transport and Auxin-Mediated Development. *The Plant Cell* **13**:2441-2454.
- Nowacki,J. and Bandurski,R.S.** (1980) *Myo*-Inositol Esters of Indole-3-Acetic Acid as Seed Auxin Precursors of *Zea mays* L. *Plant Cell Physiol.* **65**:422-427.
- Okada,K., Ueda,J., Komaki,M.K., Bell,C.J., and Shimura,Y.** (1991) Requirement of the Auxin Polar Transport-System in Early Stages of *Arabidopsis* Floral Bud Formation. *Plant Cell* **3**:677-684.
- Örtli,J.J.** (1968) Extracellular salt accumulation, a possible mechanism of salt injury in plants. *Agrochimica* **12**:461-469.
- Palme,K. and Gälweiler,L.** (1999) PIN-pointing the molecular basis of auxin transport. *Current Opinion in Plant Biology* **2**:375-381.
- Palme,K., Hesse,T., Campos,N., Garbers,C., Yanofsky,M.F., and Schell,J.** (1992) Molecular Analysis of an Auxin Binding Protein Gene Located on Chromosome 4 of *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **4**:193-201.
- Parker,K.E. and Briggs,W.R.** (1990) Transport of IAA during gravitropism in intact maize coleoptiles. *Plant Physiol.* **94**:1763-1769.
- Parry,G., Delbarre,A., Marchant,A., Swarup,R., Napier,R., Perrot-Rechenmann,C., and Bennett,M.J.** (2001) Novel auxin transport inhibitors phenocopy the auxin influx carrier mutation *aux1*. *The Plant Journal* **25**:399-406.
- Philippar, K.** (1999a) K⁺-Kanäle der Koleoptile von *Zea Mays* L. und ihre Beteiligung an auxininduzierten Wachstumsprozessen. Dissertation, Bayerische Julius-Maximilians-Universität Würzburg.
- Philippar,K., Becker,D., Hedrich,R., Edwards,K., Ljung,K., and Sandberg,G.** (2000) ...response: Living with gravity. *Trends in Plant Science* **5**:86-87.
- Philippar,K., Fuchs,I., Lüthen,H., Hoth,S., Bauer,C., Haga,K., Thiel,G., Ljung,K., Sandberg,G., Böttger,M., Becker,D., and Hedrich,R.** (1999b) Auxin-induced K⁺ channel expression represents an essential step in coleoptile growth and gravitropism. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **96**:12186-12191.
- Philippar,K., Ivashikina,N., Ache,P., Christian,M., Lüthen,H., Palme,K., and Hedrich,R.** (2004) Auxin activates *KAT1* and *KAT2*, two K⁺-channel genes expressed in seedlings of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant J.* **37**:815-827.
- Pickart,C.M.** (2001) Mechanisms Underlying Ubiquitination. *Annual Review of Biochemistry* **70**:503-533.

- Pilot,G., Gaymard,F., Mouline,K., Cherel,I., and Sentenac,H.** (2003) Regulated expression of *Arabidopsis Shaker* K⁺ channel genes involved in K⁺ uptake and distribution in the plant. *Plant Molecular Biology* **51**:773-787.
- Qi,Z. and Spalding,E.P.** (2004) Protection of Plasma Membrane K⁺ Transport by the Salt Overly Sensitive1 Na⁺-H⁺ Antiporter during Salinity Stress. *Plant Physiology* **136**:2548-2555.
- Qiu,Q.S., Guo,Y., Dietrich,M.A., Schumaker,K.S., and Zhu,J.K.** (2002) Regulation of SOS1, a plasma membrane Na⁺/H⁺ exchanger in *Arabidopsis thaliana*, by SOS2 and SOS3. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **99**:8436-8441.
- Qiu,Q.S., Guo,Y., Quintero,F.J., Pardo,J.M., Schumaker,K.S., and Zhu,J.K.** (2004) Regulation of Vacuolar Na⁺/H⁺ Exchange in *Arabidopsis thaliana* by the Salt-Overly-Sensitive (SOS) Pathway. *J.Biol.Chem.* **279**:207-215.
- Quintero,F.J., Ohta,M., Shi,H., Zhu,J.K., and Pardo,J.M.** (2002) Reconstitution in yeast of the *Arabidopsis* SOS signaling pathway for Na⁺ homeostasis. *PNAS* **99**:9061-9066.
- Ramos,J.A., Zenser,N., Leyser,O., and Callis,J.** (2001) Rapid Degradation of Auxin/Indoleacetic Acid Proteins Requires Conserved Amino Acids of Domain II and Is Proteasome Dependent. *The Plant Cell* **13**:2349-2360.
- Rashotte,A.M., Brady,S.R., Reed,R.C., Ante,S.J., and Muday,G.K.** (2000) Basipetal Auxin Transport Is Required for Gravitropism in Roots of *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **122**:481-490.
- Rasmussen,R.P., Morrison,T., Herrmann,M., and Wittwer,C.T.** (1998) Quantitative PCR by Continuous Fluorescence Monitoring of a Double Strand DNA Specific Binding Dye. *Biochemica* **2**:8-11.
- Raven,J.A.** (1975) Transport of Indoleacetic Acid in Plant Cells in Relation to pH and Electrical Potential Gradients, and Its Significance for Polar IAA Transport. *New Phytologist* **74**:163-172.
- Reed,R.C., Brady,S.R., and Muday,G.K.** (1998) Inhibition of Auxin Movement from the Shoot into the Root Inhibits Lateral Root Development in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **118**:1369-1378.
- Reintanz,B., Szyroki,A., Ivashikina,N., Ache,P., Godde,M., Becker,D., Palme,K., and Hedrich,R.** (2002) AtKC1, a silent *Arabidopsis* potassium channel α -subunit modulates root hair K⁺ influx. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **99**:4079-4084.
- Rosen,E., Chen,R., and Masson,P.H.** (1999) Root gravitropism: a complex response to a simple stimulus? *Trends in Plant Science* **4**:407-412.
- Rubery,P.H. and Sheldrake,A.R.** (1974) Carrier-Mediated Auxin Transport. *Planta* **118**:101-121.
- Rubio,F., Gassmann,W., and Schroeder,J.I.** (1995) Sodium-Driven Potassium Uptake by the Plant Potassium Transporter HKT1 and Mutations Conferring Salt Tolerance. *Science* **270**:1660-1663.

Rück,A., Palme,K., Venis,M.A., Napier,R.M., and Felle,H.H. (1993) Patch-clamp analysis establishes a role for an auxin binding protein in the auxin stimulation of plasma membrane current in *Zea mays* protoplasts. *The Plant Journal* **4**:41-46.

Rus,A., Lee,B., Munoz-Mayor,A., Sharkhuu,A., Miura,K., Zhu,J.K., Bressan,R.A., and Hasegawa,P.M. (2004) AtHKT1 Facilitates Na⁺ Homeostasis and K⁺ Nutrition in Planta. *Plant Physiology* **136**:2500-2511.

Sambrook,J., Fritsch,E.F., and Maniatis,T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Sanger,F., Nicklen,S., and Coulson,A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **74**:5463-5467.

Sauter,M. (2000) Rice in deep water: "How to take heed against a sea of troubles". *Die Naturwissenschaften* **87**:289-303.

Schachtman,D.P., Kumar,R., Schroeder,J.I., and Marsh,E.L. (1997) Molecular and functional characterization of a novel low-affinity cation transporter (LCT1) in higher plants. *PNAS* **94**:11079-11084.

Schachtman,D.P. and Schroeder,J.I. (1994) Structure and transport mechanism of a high-affinity potassium uptake transporter from higher plants. *Nature* **370**:655-658.

Schwechheimer,C. and Deng,X.W. (2001) COP9 signalosome revisited: a novel mediator of protein degradation. *Trends in Cell Biology* **11**:420-426.

Seol,J.H., Feldman,R.M.R., Zachariae,W., Shevchenko,A., Correll,C.C., Lyapina,S., Chi,Y., Galova,M., Claypool,J., Sandmeyer,S., Nasmyth,K., Shevchenko,A., and Deshaies,R.J. (1999) Cdc53/cullin and the essential Hrt1 RING-H2 subunit of SCF define a ubiquitin ligase module that activates the E2 enzyme Cdc34. *Genes Dev.* **13**:1614-1626.

Shi,H., Ishitani,M., Kim,C., and Zhu,J.K. (2000) The *Arabidopsis thaliana* salt tolerance gene SOS1 encodes a putative Na⁺/H⁺ antiporter. *PNAS* **97**:6896-6901.

Shi,H., Lee,B.H., Wu,S.J., and Zhu,J.K. (2003) Overexpression of a plasma membrane Na⁺/H⁺ antiporter gene improves salt tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Nat Biotech* **21**:81-85.

Shi,H., Quintero,F.J., Pardo,J.M., and Zhu,J.K. (2002) The Putative Plasma Membrane Na⁺/H⁺ Antiporter SOS1 Controls Long-Distance Na⁺ Transport in Plants. *The Plant Cell* **14**:465-477.

Skowyra,D., Craig,K.L., Tyers,M., Elledge,S.J., and Harper,J.W. (1997) F-box proteins are receptors that recruit phosphorylated substrates to the SCF ubiquitin-ligase complex. *Cell* **91**:209-219.

Sorin,C., Bussell,J.D., Camus,I., Ljung,K., Kowalczyk,M., Geiss,G., McKhann,H., Garcion,C., Vaucheret,H., Sandberg,G., and Bellini,C. (2005) Auxin and Light Control of Adventitious Rooting in *Arabidopsis* Require ARGONAUTE1. *The Plant Cell* **17**:1343-1359.

- Staswick,P.E., Serban,B., Rowe,M., Tiryaki,I., Maldonado,M.T., Maldonado,M.C., and Suza,W.** (2005) Characterization of an *Arabidopsis* Enzyme Family That Conjugates Amino Acids to Indole-3-Acetic Acid. *The Plant Cell* **17**:616-627.
- Steffens,B., Feckler,C., Palme,K., Christian,M., Böttger,M., and Lüthen,H.** (2001) The auxin signal for protoplast swelling is perceived by extracellular ABP1. *The Plant Journal: for Cell and Molecular Biology* **27**:591-599.
- Su,H., Gollack,D., Katsuhara,M., Zhao,C., and Bohnert,H.J.** (2001) Expression and stress-dependent induction of potassium channel transcripts in the common ice plant. *Plant Physiol.* **125**:604-614.
- Su,H., Gollack,D., Zhao,C., and Bohnert,H.J.** (2002) The expression of HAK-Type K transporters is regulated in response to salinity stress in common ice plant. *Plant Physiol.* **129**:1482-1493.
- Swarup,R., Friml,J., Marchant,A., Ljung,K., Sandberg,G., Palme,K., and Bennett,M.** (2001) Localization of the auxin permease AUX1 suggests two functionally distinct hormone transport pathways operate in the *Arabidopsis* root apex. *Genes Dev.* **15**:2648-2653.
- Swarup,R., Marchant,A., and Bennett,M.J.** (2000) Auxin transport: Providing a sense of direction during plant development. *Biochemical Society Transactions* **28**:481-485.
- Szyroki,A., Ivashikina,N., Dietrich,P., Roelfsema,M.R.G., Ache,P., Reintanz,B., Deeken,R., Godde,M., Felle,H., Steinmeyer,R., Palme,K., and Hedrich,R.** (2001) KAT1 is not essential for stomatal opening. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **98**:2917-2921.
- Talke,I.N., Blaudez,D., Maathuis,F.J.M., and Sanders,D.** (2003) CNGCs: prime targets of plant cyclic nucleotide signalling? *Trends in Plant Science* **8**:286-293.
- Thompson,J.D., Higgins,D.G., and Gibson,T.J.** (1994) CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucl.Acids Res.* **22**:4673-4680.
- Tian,Q., Nagpal,P., and Reed,J.W.** (2003) Regulation of *Arabidopsis* SHY2/IAA3 protein turnover. *Plant Journal* **36**:643-651.
- Tiwari,S.B., Hagen,G., and Guilfoyle,T.** (2003) The Roles of Auxin Response Factor Domains in Auxin-Responsive Transcription. *The Plant Cell* **15**:533-543.
- Ulmasov,T., Hagen,G., and Guilfoyle,T.** (1997a) ARF1, a transcription factor that binds to auxin response elements. *Science* **276**:1865-1868.
- Ulmasov,T., Murfett,J., Hagen,G., and Guilfoyle,T.J.** (1997b) Aux/IAA Proteins Repress Expression of Reporter Genes Containing Natural and Highly Active Synthetic Auxin Response Elements. *The Plant Cell* **9**:1963-1971.
- Uozumi,N., Kim,E.J., Rubio,F., Yamaguchi,T., Muto,S., Tsuboi,A., Bakker,E.P., Nakamura,T., and Schroeder,J.I.** (2000) The *Arabidopsis* HKT1 gene homolog

mediates inward Na⁺ currents in *Xenopus laevis* oocytes and Na⁺ uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *Plant Physiol.* **122**:1249-1259.

Very,A.A. and Sentenac,H. (2003) Molecular Mechanisms and Regulation of K⁺ Transport in higher Plants. *Annual Review of Plant Biology* **54**:575-603.

Voges,D., Zwickl,P., and Baumeister,W. (1999) The 26S Proteasome: A Molecular Machine Designed for Controlled Proteolysis. *Annual Review of Biochemistry* **68**:1015-1068.

Waller,F., Furuya,M., and Nick,P. (2002) OsARF1, an auxin response factor from rice, is auxin-regulated and classifies as a primary auxin responsive gene. *Plant Mol.Biol.* **50**:415-425.

Ward,S.P. and Leyser,O. (2004) Shoot branching. *Current Opinion in Plant Biology* **7**:73-78.

Watad,A.-E.A., Reuveni,M., Bressan,R.A., and Hasegawa,P.M. (1991) Enhanced Net K⁺ Uptake Capacity of NaCl-Adapted Cells. *Plant Physiol.* **95**:1265-1269.

Weijers,D. and Jürgens,G. (2004) Funneling auxin action: specificity in signal transduction. *Current Opinion in Plant Biology* **7**:687-693.

Weijers,D. and Jürgens,G. (2005) Auxin and embryo axis formation: the ends in sight? *Current Opinion in Plant Biology* **8**:32-37.

Went,F.W. (1928) Wuchsstoff und Wachstum. *Receuil des Travaux Botaniques Neerlandais* **25**:1-116.

Went,F.W. and Thimann,K.V. (1937) *Phytohormones*. New York: Macmillan.

Wolt,J.D. (1994) *Soil Solution Chemistry: Applications to Environmental Science and Agriculture*. New York: John Wiley & Sons.

Woo,E.J., Marshall,J., Baulry,J., Chen,J.G., Venis,M., Napier,R.M., and Pickersgill,R.W. (2002) Crystal structure of auxin-binding protein 1 in complex with auxin. *EMBO J.* **21**:2877-2885.

Wright,R.M., Hagen,G., and Guilfoyle,T. (1987) An Auxin-Induced Polypeptide in Dicotyledonous Plants. *Plant Molecular Biology* **9**:625-634.

Wu,S.J., Ding,L., and Zhu,J.K. (1996) SOS1, a Genetic Locus Essential for Salt Tolerance and Potassium Acquisition. *The Plant Cell* **8**:617-627.

Yang,T. and Poovaiah,B.W. (2000) Molecular and Biochemical Evidence for the Involvement of Calcium/Calmodulin in Auxin Action. *J.Biol.Chem.* **275**:3137-3143.

Yeo,A.R., Lee,K.-S., Izard,P., Boursier,P.J., and Flowers,T.J. (1991) Short- and long-term effects of salinity on leaf growth in rice (*Oryza sativa* L.). *Journal of Experimental Botany* **42**:881-889.

- Yokoi,S., Quintero,F.J., Cubero,B., Ruiz,M.T., Bressan,R.A., Hasegawa,P.M., and Pardo,J.M.** (2002) Differential expression and function of *Arabidopsis thaliana* NHX Na⁺/H⁺ antiporters in the salt stress response. *The Plant Journal* **30**:529-539.
- Zhang,H.X. and Blumwald,E.** (2001) Transgenic salt-tolerant tomato plants accumulate salt in foliage but not in fruit. *Nat Biotech* **19**:765-768.
- Zhang,H.X., Hodson,J.N., Williams,J.P., and Blumwald,E.** (2001) Engineering salt-tolerant *Brassica* plants: Characterization of yield and seed oil quality in transgenic plants with increased vacuolar sodium accumulation. *PNAS* **98**:12832-12836.
- Zhu,J.K.** (2002) Salt and drought stress signal transduction in plants. *Ann.Rev.Plant Biol.* **53**:247-273.
- Zhu,J.K.** (2003) Regulation of ion homeostasis under salt stress. *Curr.Opin.Plant Biol.* **6**:441-445.
- Zhu,J.K., Liu,J., and Xiong,L.** (1998) Genetic Analysis of Salt Tolerance in *Arabidopsis*: Evidence for a Critical Role of Potassium Nutrition. *The Plant Cell* **10**:1181-1192.
- Zimmermann,S., Talke,I., Ehrhardt,T., Nast,G., and Müller-Röber,B.** (1998) Characterization of SKT1, an inwardly rectifying potassium channel from potato, by heterologous expression in insect cells. *Plant Physiol.* **116**:879-890.

Publikationen

Philippar,K., **Fuchs,I.**, Lüthen,H., Hoth,S., Bauer,C., Haga,K., Thiel,G., Ljung,K., Sandberg,G., Böttger,M., Becker,D., and Hedrich,R. (1999) Auxin-induced K⁺ channel expression represents an essential step in coleoptile growth and gravitropism. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 96:12186-12191.

Philippar,K., Büchenschütz,K., Abshagen,M., **Fuchs,I.**, Geiger,D., Lacombe,B., and Hedrich,R. (2003) The K⁺ channel KZM1 mediates potassium uptake into the phloem and guard cells of the C₄ grass *Zea Mays*. *J.Biol.Chem.* 278:16973-16981.

Fuchs,I., Philippar,K., Ljung,K., Sandberg,G., and Hedrich,R. (2003) Blue light regulates an auxin-induced K⁺ channel gene in the maize coleoptile. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 100:11795-11800.

Fuchs,I., Stölzle,S., Ivashikina,N. and Hedrich R. (2004) Rice K⁺ uptake channel OsAKT1 is sensitive to salt stress. *Planta* in press, DOI 10.1007/s00425-004-1437-9

Posterpräsentationen

Fuchs,I., Philippar,K., Hedrich,R. (2001) ZMK1, a mediator of tropisms in maize coleoptiles. 17th International Conference on Plant Growth Substances, Brno (Czech republic) 2001

Fuchs,I., Philippar,K., Hedrich,R. (2002) Molecular analysis of auxin-regulated K⁺ channels in maize. Deutsche Botanikertagung, Freiburg i. Br. 2002

Fuchs,I., Geiger,D., Philippar,K., Hedrich,R. (2002) Molecular and biophysical analysis of auxin-regulated channels in maize. DFG-Schwerpunktprogramm "Molecular Analysis of Phytohormone Action", 2nd International Conference, Hamburg 2002

Fuchs,I., Geiger,D., Philippar,K., Hedrich,R. (2002) Auxin activates K⁺ channels in maize coleoptiles and *Arabidopsis* hypocotyls. Viertes Kolloquium zum DFG-Schwerpunktprogramm "Molecular Analysis of Phytohormone Action", Freising 2004

Fuchs,I., Hedrich,R. (2004) Blue light regulates an auxin-induced K⁺ channel gene in the maize coleoptile. International Workshop on Plant Membrane Biology, Montpellier (France) 2004

Fuchs,I., Hedrich,R. (2004) Blue light regulates an auxin-induced K⁺ channel gene in the maize coleoptile. Deutsche Botanikertagung, Braunschweig 2004

Lebenslauf

Name Ines Fuchs
Geburtsdatum 30. Juli 1975
Geburtsort Aschaffenburg
Staatsangehörigkeit deutsch
Familienstand ledig

Ausbildung an Schulen und Universitäten:

1981-1985 Besuch der Grundschule Stockstadt/Main
1985-1994 Besuch des Karl-Theodor-von-Dalberg-Gymnasium
Aschaffenburg
Juni 1994 Erwerb der allgemeinen Hochschulreife
Oktober 1994 Beginn des Studiums der Biologie und der Chemie für Lehramt
an Gymnasien an der Universität Würzburg
August 1998 bis
Februar 1999 Anfertigung der Zulassungsarbeit unter der Anleitung von Prof.
Dr. R. Hedrich mit dem Thema
**"Untersuchung zur Expressionskontrolle von
Kaliumkanalgenen durch das Phytohormon Auxin in der
Koleoptile von *Zea Mays* L."**
am Lehrstuhl für Molekulare Pflanzenphysiologie und Biophysik
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg
Juli 2000 Studienabschluß: erstes Staatsexamen
September 2000 Beginn der experimentellen Arbeiten zur vorliegenden
Dissertation; seitdem wissenschaftliche Mitarbeiterin am
Lehrstuhl für Molekulare Pflanzenphysiologie und Biophysik der
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg unter der
Leitung von Prof. Dr. Rainer Hedrich

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation in allen Teilen selbst angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Ich habe die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form in anderen Prüfungsverfahren vorgelegt. Außerdem habe ich bislang noch keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht.

Würzburg, 13.05.2005

.....

Ines Fuchs