
1 EINLEITUNG

1.1 Das Hormonkonzept

In vielzelligen Organismen hat sich zur Steuerung und Synchronisation von physiologischen Prozessen und Entwicklungsvorgängen eine endogen produzierte Substanzgruppe etabliert. Nach einer klassischen Definition gehören zu diesen Botenstoffen oder auch Hormonen Substanzen, die in spezifischen, endokrinen Organen oder Einzelzellen (Drüsen) gebildet werden. Hormone werden in geregelten Mengen an die Blutbahn abgegeben und mit dem Kreislaufsystem transportiert. In den Zielgeweben entfalten sie ihre spezifische Wirkung. Diese Spezifität wird durch spezifische Rezeptorstrukturen im Zielorgan erreicht. Bereits geringste Hormonkonzentrationen reichen aus, um im Organismus Reaktionsgeschwindigkeiten und Umsatzraten von Stoffwechselprozessen im Sinne einer konzertierten Reaktion so aufeinander abzustimmen und zu verändern, dass sie die jeweils wechselnden Anforderungen des Gesamtorganismus optimal erfüllen (Wehner und Gering 1990).

Auch für pflanzliche Organismen wurden solche Regulatormoleküle nachgewiesen. Im Gegensatz zu der großen Vielfalt tierischer Hormone unterscheidet man bei Pflanzen zwischen folgenden 9 Molekülen und Molekülklassen (Davies 1995):

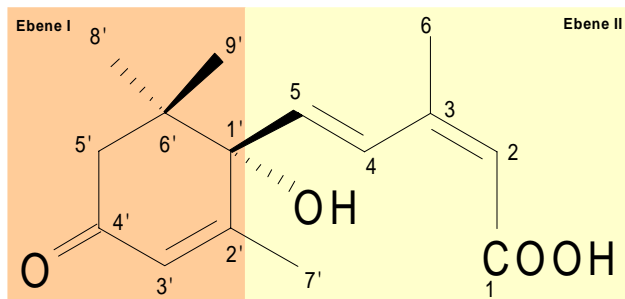
- Abscisinsäure
 - Auxine
 - Cytokinine
 - Gibberelline
 - Ethylen
-
- und, in eingeschränkter Weise, Jasmonate
 - Salicylsäure
 - Brassinosteroide
 - und Polyamine.

1.2 Abscisinsäure

Untersuchungen zum Blatt- und Fruchtabfall (Abscission) und der Knospenruhe führten zur Entdeckung eines Hormons, das die Bezeichnung Abscisinsäure (ABA) erhielt.

Baumwollfrüchte enthielten so große Mengen an ABA, dass dieses Hormon von Okhuma et al. (1963), Addicott et al. (1964) und Milborrow (1967) isoliert und die chemische Struktur aufgeklärt werden konnte (Abb. 1-1).

ABA gehört zu der Stoffklasse der Sesquiterpene. Sie besitzt am 1'C-Atom ein Chiralitätszentrum. Die natürlich vorkommende Form ist das (+)-cis-trans-



Enantiomer.

Abb. 1-1 (+)-cis-trans-Abscisinsäure, nummeriert nach Boyer et al. 1985. Das Molekül besteht aus 2 aufeinander senkrecht stehenden Ebenen I und II.

Das Molekül besteht aus 2 aufeinander senkrecht stehenden Ebenen I und II. Ebene I ist dabei der Hexen-Ring (C1' bis C6'), Ebene II die Kohlenstoffkette C1-C5 (Schmalle et al. 1977). Der zum Durchtritt von Poren sterisch relevante Durchmesser des Moleküls ist der Durchmesser der Ringes (8 - 11 nm, persönliche Mitteilung von Prof. Dr. C. Robl).

1.2.1 Biosynthese

Inzwischen ist allgemein anerkannt, dass Abscisinsäure nicht primär für den Fruchtfall verantwortlich ist (Reid 1995). ABA ist als Stresshormon bekannt geworden.

Unter ungünstigen Umweltbedingungen wie Salz-, Wasser- oder Kältestress erhöht sich die Konzentration der freien ABA in pflanzlichen Geweben (Chen et al. 1983, Blackmann und Davies 1985, Cornish und Zeevaart 1985, Lachno und Baker 1986, Clipson et al. 1988, Zhang und Davies 1989, Hartung et al. 1990, Hartung und

Die ABA-Biosynthese erfolgt im Cytosol der Mesophyllzellen aller pflanzlichen Gewebe (Hartung et al. 1999). Stimulus für die endogene ABA-Produktion ist das Absinken des Gewebewasserpotenzials unter den Schwellenwert von -0.5 bis -1.0 MPa (Hartung und Heilmeyer 1993, Schiller et al. 1997).

In höheren Pflanzen läuft die ABA-Biosynthese dabei auf zwei Wegen ab (Daeter 1994, Lichtenthaler et al. 1997).

Der direkte Weg schlägt eine Synthese über den Terpenoid-Sekundärstoffwechsel vor. Aus Mevalonsäure wird über Farnesylpyrophosphat ABA gebildet (Neill und Horgan 1984, Zeevaart und Creelmann 1988, Al-Babili et al. 1999).

In neueren Studien verfestigt sich die Bedeutung des indirekten Syntheseweges der ABA über den Abbau von Carotinoiden (Parry und Horgan 1992, Lee und Milborrow 1997, Tan et al. 1997, Cutler und Krocko 1999, Lichtenberg et al. 1999, Taylor et al. 2000). Zeaxanthin wird dabei zu all-trans-Violaxanthin umgebaut. Es folgt eine oxidative Spaltung zu Xanthoxin, deren genaue Edukte und Spaltungswege noch nicht bekannt sind. Xanthoxin (oder Xanthoxal) kann entweder über den ABA-Aldehyd zur Abscisinsäure oxidiert werden (Taylor et al. 2000) oder es erfolgt eine Oxidation über eine molybdän-abhängige Aldehydoxidase zur Xanthoxinsäure, die dann in ABA umgewandelt werden kann (Lee und Milborrow 1997).

1.2.2 Physiologische Wirkungen und deren Regulation

Die Wirkungen von Abscisinsäure auf pflanzliche Gewebe unterscheiden sich hinsichtlich der Lag-Phase, die zwischen erhöhter ABA-Biosynthese und dem Eintreten des Hormoneffekts liegt.

Bei Effekten, die erst Stunden oder Tage nach Hormonapplikation auftreten, wird angenommen, dass ABA die hierfür nötige Genexpression moduliert. Pflanzen wird es somit ermöglicht, sich langfristig an ungünstige Umweltbedingungen anzupassen. Während der Samenreifung, besonders in der mittleren und späteren Entwicklungsphase treten hohe ABA-Konzentrationen auf. Dies gewährleistet die Aufrechterhaltung der Zellwandstabilität (Hetherington und Quatrano 1991) und verhindert so ein vorzeitiges Auskeimen des Embryos. Weiterhin induziert ABA die Synthese von Polypeptiden, die dem Samen als Speicherstoffe dienen (Bray und

Beachy 1985, Chandler und Robertson 1994). Im späten Teil der Embryogenese werden verstärkt LEA (**L**ate **E**mbr-yogenesi**s** **A**bundant)-Proteine gebildet. Diese LEA-Proteine und auch ihre Untergruppe der Dehydrine werden als stabilisierende Elemente cytosolischer Proteine, Membranoberflächen sowie Zellstrukturen (Nukleoli) diskutiert (Close und Lammers 1993) und spielen deshalb in Geweben, die starke Dehydrierung überleben, eine große Rolle (Samen: Baker et al. 1988, Bartels et al. 1988; poikilohydrische Pflanzen: Bartels et al. 1990, Schiller et al. 1997).

Weiterhin induziert ABA Knospenruhe (Madison und Rappaport 1968), Frosttoleranz (Churchill et al. 1992), Heterophyllie (Trewavas und Jones 1991, Hellwege et al. 1994), Salztoleranz (Singh et al. 1987) sowie verschiedene Wundreaktionen (Hetherington und Quatrano 1991, Kolattukudy und Agrawal 1974).

Bei Keimlingen bewirkt ABA in einem bestimmten Konzentrationsbereich vermindertes Sprosswachstum mit gleichzeitig verstärktem Wurzelwachstum (Müller et al. 1989, Saab et al. 1990, Trewavas und Jones 1991).

In Flechten erhöht ABA die relative Quantenausbeute der Chlorophyll-Fluoreszenz nach permanenter Durchfeuchtung bzw. Submersion (Dietz 1999).

Etwa 70 Gene oder Genprodukte werden positiv durch ABA reguliert (Chandler und Robertson 1994). Nicht allen Proteinen konnte sofort oder bis heute eine bestimmte Funktion zugewiesen werden. Man benannte sie daher nach Entwicklungscharakteristika (z.B. LEA-Proteine), nach der Expressionsregulation (z.B. *rab*-Gene: responsive to ABA; *dhn*-Gene: dehydration induced) oder ihr Aminosäuremuster beschreibend (z.B. *Em*-Gene: early methionin). Auch negative Kontrolle ist möglich. Gene, die für Fotosynthese- oder stärkeabbauende Enzyme kodieren, werden ABA-induziert vermindert transkribiert.

Zu Beginn der Signaltransduktion bindet Abscisinsäure an Rezeptoren, die sich außerhalb (Hornberg und Weiler 1984, Knox et al. 1995, Wang et al. 1995, Pedron et al. 1998, Desikan et al. 1999) oder auch innerhalb einer Pflanzenzelle befinden können. Diese aktivieren *second-messengers*, kurzlebige, intrazelluläre Signalmoleküle wie z.B. Inositol-Triphosphat (IP₃; *Vicia faba*, Lee et al. 1996) oder verschiedene Proteinphosphatasen (PP) und Proteinkinasen (PK), wobei die MAP

(Mitogen Activated Protein)-Kinase eine besondere Rolle spielt (Li und Assmann 1996, Sheen 1996, Shinozaki und Yamaguchi-Shinozaki 1997, Mori und Muto 1997, Hey et al. 1997, Hirt 1997, MacRobbie 1997, Mizoguchi et al. 1997). Diese *second-messenger* bewirken eine Veränderung des cytosolischen Ca^{2+} -Gehaltes. Auch cyclische ADP-Ribose kann ABA-Effekte durch Ca^{2+} -Freigabe vermitteln (Wu et al. 1997).

PKs und PPs, die teilweise Ca^{2+} -abhängig sind, aktivieren nun Transkriptionsfaktoren (TF). TFs sind Kernproteine oder *trans-acting*-Elemente, die an Regulationsstellen (*cis-acting*-Elemente) der DNA binden können (Abb. 1-2). TFs wie z.B. *EmBP1* aus Weizen, *TAF-1* aus Reis (Chandler und Robertson 1994) oder *MYB* und *MYC* aus *Arabidopsis thaliana* (Abe et al. 1997) sind wiederum durch ABA und Trockenstress induzierbar. Ihre Bindung in der Promotorregion von ABA-induzierbaren Genen verschiedener Spezies erfolgt an ein hoch konserviertes ABA-*cis-acting*-Element (ABRE: ABA Responsive Element) mit der Sequenz PyrimidinACGTGGC (Neill und Burnett 1999). Diese Gensequenz wurde in geringfügig abgewandelter Form in der Promotor-Region ABA-regulierter Gene verschiedener Pflanzenarten gefunden (Leung und Giraudat 1998, Thomas et al. 1997).

TFs werden entweder im Cytosol aktiviert und wandern dann in den Nukleus oder sind bereits an einer ABRE-Region gebunden und werden hier aktiviert (Neill und Burnett 1999). Es folgt die Transkription von ABA induzierten Genen (Abb. 1-2).

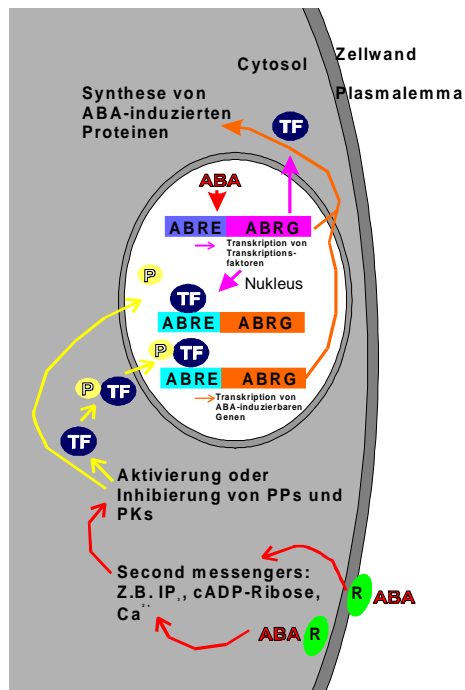


Abb. 1-2 Die Perzeption von ABA erfolgt an ABA-Rezeptoren (R), die entweder innerhalb oder außerhalb des Cytosols lokalisiert sein können. ABA induziert Genexpression sowohl über einen direkten, second-messenger-abhängigen Mechanismus, der keine Proteinbiosynthese benötigt, als auch über die Synthese von Transkriptionsfaktoren (TF). TFs binden sich an Regulationsbereiche der DNA-Sequenz (cis-acting-Element oder ABRE: ABA Response Element) und bewirken dort, durch Proteinphosphatasen (PP) oder -kinasen (PK) aktiviert, Konformationsänderungen, die die Transkriptionsaktivität modulieren. ABA-induzierbare Gene werden abgelesen (ABRG: ABA Responsive Gene). Die Synthese von ABA-induzierbaren Proteinen beginnt.

Abbildung verändert nach Neill und Burnett 1999

Neben diesen Regulationsmechanismen, die den Organismus auf eine langfristige Anpassung an sich verändernde Umweltbedingungen vorbereiten, gibt es ABA-Effekte, die sich innerhalb weniger Minuten auswirken.

Sie dienen im weiteren Sinne der Aufrechterhaltung eines ausreichenden Wasserstatus der Pflanze.

ABA stimuliert Ionenabgabe in die Xylemgefäße (Karmoker und van Steveninck 1978, Glinka 1980, Fiscus 1981, Fiscus 1982a, Fournier et al. 1987, Atkinson et al. 1992, Quintero et al. 1999) verbunden mit einer Veränderung der hydraulischen Wurzeleitfähigkeit (Markhart et al. 1979, Fiscus 1981 und 1982a, Glinka 1980, Glinka und Abir 1989, Fournier et al. 1987, Ludewig et al. 1988, BassiriRad und Radin 1992, Zhang et al. 1995, Jeschke et al. 1997b, Quintero et al. 1998 und 1999).

Als ABA-regulierbare und aktivierbare Membranproteine werden in diesem Zusammenhang Aquaporine diskutiert (Chrispeels und Maurel 1994, Kaldenhoff et al. 1996, Maurel 1997, Eckert et al. 1999).

Der wohl bekannteste und am besten untersuchte ABA-Effekt ist der hormon-induzierte Schluss der Stomata. Bei dieser schnell eintretenden Reaktion wird über das *second-messenger*-System (Abb. 1-2) und mittels PKs und PPs der zellinterne Ca^{2+} -Spiegel erhöht. Dies führt letztendlich zu einer Aktivierung auswärts gerichteter und zu einer Inhibierung einwärts gerichteter K^+ -Kanäle. Die Stomata verlieren schnell an Turgor und schließen sich (Assmann 1993, MacRobbie 1998).

1.3 Transport von Phytohormonen

Abscisinsäure und auch die weiteren pflanzlichen Regulatormoleküle passen nun trotz großer Übereinstimmungen nicht in das klassische, für tierische Organismen definierte, Hormonkonzept.

Wie bereits für ABA dargelegt, bewirkt ein Pflanzenhormon nicht nur einen spezifischen Effekt, sondern besitzt ein breites Wirkungsspektrum. Die Synthese erfolgt nicht in spezialisierten Zellen, sondern in gewöhnlichen Gewebezellen, die auch selbst auf das produzierte Hormon reagieren können.

Da im pflanzlichen Organismus oft keine Differenzierung zwischen Synthese- und Wirkort möglich ist und Pflanzen auch kein zentral koordiniertes Stoff- und Informationstransportsystem wie den Blutkreislauf besitzen, wurde von Trewavas (1981) argumentiert, dass auch das Hormonkriterium *Transport* für die Wirkungsweise von Phytohormonen keine Rolle spielt.

Hier handelt es sich um eine These, die nach dem aktuellen Stand der Wissenschaft zumindest für Auxine so nicht mehr aufrecht erhalten werden kann.

Das Auxin Indol-3-Essigsäure (IES) wird in jungen, apikal gelegenen Pflanzengewebe produziert. Ihr Langstreckentransport erfolgt via Phloem in Richtung der Wurzeln (Davies 1995, Cambridge und Morris 1996).

IES reguliert fundamentale, zelluläre Prozesse, die Zellteilung, -streckung und –differentiation beinhalten. Im Gewebe wird das Auxin symplastisch von Zelle zu Zelle geleitet. Ein aktiver, polarer Transport der IES im Zielgewebe ist für die Regulation des Gravitropismus in den Wurzeln und in Gras-Koleoptilen unabdingbar. In Gras-Koleoptilen führen apikal lokalisierte IES-Aufnahme-

Transporter sowie basale IES-Effluxcarrier zu einem polaren Hormontransport in Richtung der Effluxcarrier (Jones 1998, Leyser 1999). In Wurzelzellen können diese Effluxcarrier je nach Veränderung der Schwerkraftperzeptionsstatolithen asymmetrisch in der Zellmembran umverteilt werden. Die Effluxcarrier werden bei horizontaler Wurzellage verstärkt an der Wurzelseite lokalisiert, die dem Schwerkraftreiz zugewandt ist. Auf diese Weise akkumuliert sich IES in dieser Wurzelseite und hemmt die betreffenden Wurzelzellen in ihrem Wachstum. Als Konsequenz wächst die Pflanzenwurzel senkrecht auf den Schwerkraftreiz zu (Leyser 1999, Jones 1998, Dolan 1998). Die molekularen Transportstrukturen konnten in den letzten Jahren gefunden und charakterisiert werden (Chen et al. 1998, Gälweiler et al. 1998, Luschig et al. 1998, Müller et al. 1998).

Gibberelline und Cytokinine werden als Langstreckensignale via Phloem und Xylem transportiert (Beck und Wagner 1994, Davies 1995, Oden et al. 1995, Ali et al. 2000, 1997, Kamboj et al. 1998, Dieleman et al. 1997).

Gesicherte Erkenntnisse über den Gibberellin- und Cytokinin-Transport in pflanzlichen Geweben gibt es nicht. Ein symplastischer, basi- und acropetaler Transport des Gibberellins A₁ in *Phaseolus coccineus*-Internodien, vergleichbar mit dem polaren IES-Transport, ließ sich nicht verifizieren (Phillips und Hartung 1973). In *Chara contraria* wurde ein symplastischer Transport für das Gibberellin GA₃ postuliert (Kwiatkowska und Malinowski 1995).

Für Zeatin-Riboside, die den Hauptteil an transportierten Cytokinin in *Urtica dioica* (Beck und Wagner 1994) und *Rosa hybrida* (Dieleman et al. 1997) darstellen, gibt es Anhaltspunkte, dass sie im Gewebe teilweise apoplastisch mit dem Wasserfluss transportiert werden könnten. Dielemann et al. (1997) fanden keine signifikanten Konzentrationsunterschiede des Cytokinins im Blutungssaft von *Rosa hybrida* während der Lichtperiode (verstärkte Transpiration) im Vergleich zu der Dunkelperiode (keine Transpiration). Beck und Wagner 1994 konnten durch Verstärkung der Wasserflussrate durch *Urtica dioica* einen verstärkten Cytokininfluss induzieren. Ein rein symplastischer Cytokinin-Transport sollte unter diesen Bedingungen eine Verdünnung bewirken. Der Nachweis einer direkten Relation zwischen Cytokinin- und Wasserfluss steht aber noch aus.

Abscisinsäure spielt eine große Rolle als Wurzel-Spross-Signal (Blackman und Davies 1985, Davies und Zhang 1991, Bano et al. 1993, Hartung und Jeschke 1999).

Stressbedingungen wie Trockenheit, Salinität oder Nährstoffmangel erhöhen die Wurzel-ABA-Gehalte und verstärken das ABA-Signal in den Spross (Wolf et al. 1990, Peuke et al. 1994, Jeschke et al. 1997a, Hartung und Jeschke 1999). Im Xylem wird dieses Hormonsignal direkt an die apoplastische Seite der Stomata geleitet, die dann aufgrund des ABA-Signals geschlossen werden (Hartung et al. 1998, Hartung et al. 1999a und b, Zhang et al. 1987).

Über den Transport von ABA im Wurzelgewebe gab es zu Beginn der vorliegenden Arbeit keine gesicherten Erkenntnisse.

Von Else et al. (1994 und 1995) und Jackson et al. (1996) wurde ein symplastischer Transport postuliert. Die Annahme eines reinen zellulären ABA-Transportes in der Wurzel führte jedoch nach Berechnungen eines Computer-Modells von Slovik et al. (1995) zu dramatischen Hormon-Schwankungen im Schließzellenapoplasten, sobald sich die Transpirationsrate änderte.

Ein geeignetes Hormonsignal, das den für Pflanzen essenziellen Stomataschluss vermittelt, sollte gegenüber Schwankungen im Wasserfluss stabil sein.

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Steudle und Mitarbeiter (z.B. Steudle et al. 1987, Steudle und Brinckmann 1989, Frensch und Steudle 1989, Steudle 1993, Steudle 1994a und b, Henzler und Steudle 1995, Frensch et al. 1996, Steudle und Frensch 1996, Steudle und Peterson 1998, Steudle et al. 1999) etablierten ein komplexes, den anatomischen und physiologischen Anforderungen gerecht werdendes Modell der Pflanzenwurzel: das *Composite Transport Model* für Wurzeln

Sie forderten, um experimentell gesicherte Wurzeltransportkoeffizienten zu erklären, einen apoplastischen Bypass für Wasser und gelöste Nährionen. Dies bedeutet, dass Wurzeln keine perfekten Barrieren sind, da durch ihr Zellwandnetz unselektiv Substanzen in den Wurzelzentralzylinder gelangen können. Speziell unter hydrostatischen Druckgradienten werden im Wasser gelöste Substanzen durch den „Solvent-drag“ des Wasserstroms in die Xylemgefäße mitgerissen.

Es war nun interessant zu untersuchen, ob ein solcher apoplastischer Bypass durch die Wurzel auch für pflanzliche Hormone wie Abscisinsäure von Bedeutung ist.

Diese, neben der symplastischen Beförderung, zusätzliche Transportmöglichkeit der Abscisinsäure sollte das Wurzel-Spross-Stresssignal unter transpirierenden Bedingungen stabilisieren. Es sollte versucht werden, den relativen apoplastischen Beitrag zum Gesamt-ABA-Transport und dessen Effektivität unter physiologischen Bedingungen zu bestimmen.

Ein weiterer interessanter Gesichtspunkt dieser Untersuchungen war die Tatsache, dass der Aspekt des ABA-Gewebetransports in der Wurzel noch nicht experimentell in das quantitative Modell des pflanzlichen ABA-Transportes von Hartung und Mitarbeitern (z.B. Daeter und Hartung 1990, Hartung und Slovik 1991, Slovik et al. 1992, Slovik und Hartung 1992a bis c, Daeter et al. 1993, Daeter und Hartung 1993, Slovik et al. 1995, Hartung et al. 1998, Hartung et al. 1999) einbezogen war.

Die Eigenschaften apoplastischer Barrieren wie Endo- und Exodermis sollten, erfolgt der ABA-Transport auch in der Wurzelzellwand, einen signifikanten Einfluss auf den Hormontransport besitzen. Von Schreiber und Mitarbeitern (Schreiber et al. 1994,

Schreiber 1996, Schreiber et al. 1999, Zeier und Schreiber 1997, Zeier 1998, Zeier und Schreiber 1998 a und b, Zeier et al. 1999 a und b) konnten die quantitativen und qualitativen Zusammensetzungen von Hypo- und Endodermis isolaten verschiedener Pflanzenspezies analysiert werden. Die große Variabilität der untersuchten Pflanzenspezies deutete auf unterschiedlich große Beiträge zum apoplastischen Hormontransport hin. Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war es deshalb, den ABA-Transport mit der „Stärke“ der apoplastischen Barrieren zu korrelieren und dabei Unterschiede zwischen verschiedenen Pflanzenspezies zu beachten.

Weitere Faktoren, die Auswirkungen auf den ABA-Transport im Apoplasten haben sollten, sind die pH-Gradienten zwischen Cytosol, Apoplast und Rhizosphäre. ABA ist eine schwache Säure und reichert sich in alkalischen Kompartimenten nach dem Anionenfallenmechanismus an (Daeter 1994, Slovik et al. 1995). Es war daher interessant zu untersuchen, inwieweit Veränderungen des Rhizosphären-pH-Wertes oder der pH-Gradienten im Wurzelgewebe Einfluss auf die apoplastische Transportkomponente besitzen.

Apoplastischer ABA- und Wasserfluss sollten nach dem Modell von Steudle 1993 gekoppelt sein. Zudem ist bekannt, dass ABA die hydraulische Leitfähigkeit variiert. In der Literatur wurden sich widersprechende ABA-Wirkungen auf den Wasserfluss durch Wurzeln postuliert. Daher war es wichtig, unter Verwendung neuer Messtechniken zur Bestimmung der hydraulischen Leitfähigkeit (Wurzeldrucksonde, Zelldrucksonde) den ABA-Effekt konzentrations- und zeitabhängig sowohl auf Wurzel- als auch auf Zellebene zu untersuchen.

Als regulative Strukturen des Wassertransportes auf Zellebene gelten Aquaporine (Maurel 1997). Aquaporine wiederum sind ABA-induzierbar (Kaldenhoff et al. 1996). Das Zusammenspiel von Wasser- und ABA-Transport in Pflanzenwurzeln unter verschiedenen Umweltbedingungen und gegenseitiger Beeinflussung sollte korreliert und quantitativ beurteilt werden.