

**Charakterisierung von ZmAUX2  
als Auxin-induzierter, potentieller Transkriptionsfaktor  
aus *Zea mays* und seine Beteiligung beim  
Streckungswachstum**

DISSERTATION  
ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES DER NATURWISSENSCHAFTEN  
(DR. RER. NAT.)  
DER NATURWISSENSCHAFTLICHEN FAKULTÄT III  
– BIOLOGIE UND VORKLINISCHE MEDIZIN –  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

vorgelegt von  
Stefan Knauss  
aus Strümpfelbach  
Februar 2002

Promotionsgesuch eingereicht am:

Die Arbeit wurde angeleitet von: Prof. Dr. Lehle

Prüfungsausschuss:	Prof. Dr. Kurtz	(Vorsitzender)
	Prof. Dr. Lehle	(1. Gutachter)
	Prof. Dr. Schmitt	(2. Gutachter)
	Prof. Dr. Hegemann	(3. Prüfer)

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>1</b>
<b>2. EINLEITUNG.....</b>	<b>3</b>
2.1 DIE SÄUREWACHSTUMSHYPOTHESE.....	3
2.2 EXPANSINE.....	4
2.3 AUXIN-BINDEnde PROTEINE.....	5
2.4 AUXINTRANSPORT.....	7
2.5 AUXIN-SIGNALWEGE.....	9
2.6 SCHNELL AUXIN-INDUZIERTe GENE.....	10
2.6.1 Die <i>ACS</i> -Genfamilie.....	10
2.6.2 Die <i>GST</i> -Genfamilie.....	10
2.6.3 Die <i>GH3</i> -Genfamilie.....	11
2.6.4 Die <i>Aux/IAA</i> -Genfamilie.....	12
2.6.5 Die <i>SAUR</i> -Genfamilie.....	15
<b>3. ERGEBNISSE.....</b>	<b>19</b>
3.1 SPEZIFISCHE INDUKTION VON <i>ZMAUX2</i> DURCH AUXIN.....	19
3.1.1 Einfluss von Brassinolid .....	19
3.1.2 Ethylen und Methyljasmonsäure induzieren <i>ZmaUX2</i> nicht.....	20
3.2 KORRELATION DER <i>ZMAUX2</i> -TRANSKRIPTMENGE MIT DER KOLEOPTIL- BZW. MESOKOTYLELONGATION IM LICHT BZW. IM DUNKELN.....	21
3.2.1 Abhängigkeit der Elongation von den Lichtverhältnissen.....	21
3.2.2 <i>ZmaUX2</i> wird im Mesokotyl transkribiert.....	22
3.3 HALBWERTSZEIT DES <i>ZMAUX2</i> -GENPRODUKTES.....	23
3.4 GUS-REPORTERGENSTUDIEN IN TABAK UND <i>ARABIDOPSIS</i> .....	24
3.4.1 Organspezifität.....	26
3.4.2 Gewebsspezifität.....	27
3.4.3 Einfluss von Auxin auf die Reporterexpression.....	27
3.4.4 Öffnung des Hypokotylhakens.....	27
3.4.5 Geotrope und phototrope Krümmungsreaktionen.....	28
3.5 TRANSPOSON-MUTAGENESE VON <i>ZMAUX2</i> IN MAIS.....	29
3.5.1 Keimungs- und Überlebensrate.....	31
3.5.2 Reduziertes Koleoptilenwachstum der Mutanten.....	32
3.5.3 Reduziertes Sprosswachstum der Mutanten.....	33
3.5.4 Verminderte Endgröße der Mutanten.....	34
3.5.5 Verlängerte vegetative Phase der Mutanten.....	35
3.5.6 Vererbbarkeit des Mutantenphänotyps.....	36
3.5.7 Epidermiszellen der Mutanten.....	37
3.5.8 Geotropische Reaktion der TUSC-Pflanzen.....	38
3.5.9 Wachstum während des Krümmungstests zur Geotropie.....	41
3.6 ÜBEREXPRESSION DES <i>ZMAUX2</i> -GENS IN MAIS.....	42
3.6.1 Keim- und Überlebensraten.....	44
3.6.2 Koleoptil- und Mesokotylwachstum.....	44

3.6.3 Sprosswachstum.....	47
3.6.4 Gravitrope Reaktion.....	49
3.7 PROMOTORSTUDIEN DES <i>ZMAUX2</i> IN MAIS MITTELS REPORTERGENFUSION.....	49
3.7.1 Koleoptilwachstum.....	50
3.7.2 Mesokotylwachstum.....	51
3.7.3 Sprosswachstum.....	52
3.8 <i>ZMAUX2</i> -EXPRESSION DURCH EINEN TETRACYCLIN-INDUZIERBARER PROMOTOR.....	52
3.9 KERNLOKALISATION DES <i>ZMAUX2</i> -GENPRODUKTES.....	56
3.9.1 Transiente Transformation von Tabak-Protoplasten.....	57
3.9.2 Mikrobeschuss von Zwiebelepidermiszellen.....	58
3.10 „MOBILITY SHIFT ASSAY“ MIT EINER PUTATIVEN ZIELSEQUENZ.....	60
3.11 CALMODULINBINDUNG VON <i>ZMAUX2</i> -PROTEIN.....	60
<b>4. DISKUSSION.....</b>	<b>63</b>
5.1 SPEZIFITÄT DER PHYTOHORMON-INDUKTION DES <i>ZMAUX2</i> .....	63
5.2 <i>IN VIVO</i> NACHWEIS DES GENPRODUKTES.....	65
5.3 HALBWERTSZEIT.....	65
5.4 EXPRESSIONSMUSTER DES <i>ZMAUX2</i> .....	65
5.5 Promotor-GUS-Konstrukte im homologen System und „transgene silencing“.....	70
5.6 Überexpression des <i>ZmAUX2</i> -Gens .....	71
5.7 Calmodulinbindung .....	74
5.8 Kernlokalisierung .....	75
5.9 Ein putatives Zielgen .....	76
<b>5. MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>77</b>
5.1 MATERIAL.....	77
5.1.1 Verwendete Organismen, Vektoren und Oligonukleotide.....	77
5.1.2 Chemikalien und Enzyme .....	78
5.1.3 Häufig verwendete Lösungen und Puffer.....	80
5.1.4 Medien.....	80
5.1.5 Computerprogramme .....	83
5.2 METHODEN.....	83
5.2.1 Physiologische Methoden.....	83
5.2.1.1 <i>Anzucht und Präparation von Maiskoleoptilen</i> .....	83
5.2.1.2 <i>Inkubation der Koleoptilsegmente mit Hormonen</i> .....	83
5.2.1.3 <i>Biotest für die Auxinwirkung</i> .....	84
5.2.1.4 <i>Versuche zu tropischen Krümmungsreaktionen</i> .....	84
5.2.1.5 <i>Messung der Sprosshöhe</i> .....	84
5.2.1.6 <i>GUS-Aktivitätstest</i> .....	84
5.2.1.7 <i>Tetracyclininduktion</i> .....	84
5.2.2 Molekularbiologische Methoden.....	85
5.2.2.1 <i>RNA-Isolierung</i> .....	85
5.2.2.2 <i>Plasmidisolierung aus Bakterien</i> .....	85
5.2.2.3 <i>Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren</i> .....	85
5.2.2.4 <i>Northernblot-Analyse</i> .....	86
5.2.2.5 <i>Amplifikation von DNA mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR)</i> ....	86

---

5.2.2.6	<i>Enzymatische Behandlung von DNA</i>	86
5.2.2.7	<i>DNA-Analyse</i>	87
5.2.3	Biochemische Methoden	87
5.2.3.1	„Pulse-Chase“-Experimente	87
5.2.3.2	„Mobility Shift Assay“ mit dem ZMK1-Promotor	88
5.2.3.3	Calmodulinbindungsstudien	88
5.2.4	Herstellung rekombinanter Organismen	89
5.2.4.1	Transformation von <i>Escherichia coli</i>	89
5.2.4.2	Transformation von <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	89
5.2.4.3	Transformation von <i>Arabidopsis thaliana</i>	89
5.2.4.4	Transformation von <i>Nicotiana tabacum</i>	90
5.2.4.5	Transformation von <i>Zea mays</i>	91
5.2.4.6	TUSC-Programm der Firma Pioneer-Hi-Bred	91
5.2.4.7	Transiente Transformation von Tabak-Protoplasten	92
5.2.4.8	Mikrobombardierung von Zwiebelepidermiszellen	93
<b>6.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>94</b>
<b>7.</b>	<b>ANHANG</b>	<b>105</b>
7.1	ABKÜRZUNGEN	105
7.2	SEQUENZ DES GENOMISCHEN KLONS VON ZMAUX2	106

Pobres das flores nos canteiros dos jardins regulares.  
Parecem ter medo da polícia...  
Mas tão boas que florescem do mesmo modo  
E têm o mesmo sorriso antigo  
Que tiveram para o primeiro olhar do primeiro homem  
Que as viu aparecidas e lhes tocou levemente  
Para ver se eles falavam...

(Fernando Pessoa)

Arme Blumen auf abgezirkelten Gartenbeeten.  
Sie scheinen Angst vor der Polizei zu haben...  
Aber so gütig sind sie, dass sie genauso blühen  
und das gleiche uralte Lächeln behalten,  
das sie dem erste Blick des ersten Menschen zeigten,  
der sie sprießen sah und sie leicht berührte,  
um zu sehen, ob sie auch sprechen könnten...

## 1. Zusammenfassung

Das Phytohormon Auxin spielt eine zentrale Rolle in Wachstum und Entwicklung der Pflanzen. Zumindest einige der Auxin-regulierten Vorgänge werden über die Aktivierung von Genen kontrolliert. Eine Gruppe solcher Auxin-induzierter Gene, die *SAUR*-Genfamilie, ist seit nunmehr 20 Jahren bekannt; ihre Genprodukte konnten bisher aber nicht *in vivo* nachgewiesen werden und über ihre Funktion wurde nur auf Grund korrelativer Daten spekuliert.

Die Elongation von Maiskoleoptilsegmenten ist einer der am besten charakterisierten Vorgänge, die von Auxin vermittelt werden. In unserer Arbeitsgruppe war es gelungen, ein in Maiskoleoptilsegmenten durch Auxin induzierbares, der *SAUR*-Genfamilie verwandtes Gen zu klonieren. Ziel der vorliegenden Arbeit war dieses als *ZmAUX2* bezeichnete Gen und seine Funktion näher zu charakterisieren.

Die Transkription des *ZmAUX2*-Gens wird ausschließlich durch Auxin induziert, nicht jedoch durch Ethylen, Methyljasmonsäure oder Brassinolid und konnte in Koleoptile und Mesokotyl lokalisiert werden. Dabei korrelierte die *ZmAUX2*-Transkriptmenge jeweils sehr gut mit den unterschiedlichen Elongationsraten im Licht bzw. im Dunkeln.

Die *ZmAUX2*-Promotoraktivität wurde durch *GUS*-Reporterstudien in *Arabidopsis* und Tabak untersucht. In den transgenen Pflanzen konnte eine *GUS*-Aktivität vor allem in elongierenden Bereichen des Hypokotyls, des Epikotyls sowie der Blattstiele detektiert werden. Während Krümmungsbewegungen wurde jeweils auf der stärker elongierenden Flanke eine höhere *GUS*-Aktivität nachgewiesen, unabhängig davon ob die Krümmungsbewegung endogen gesteuert war, wie im Falle des Öffnens des Hypokotylhakens, oder ob sie als Reaktion auf einen Reiz erfolgte, wie nach lateraler Belichtung oder nach gravitroper Stimulation. Sprossquerschnitte zeigten, dass der *ZmAUX2*-Promotor das *GUS*-Reporter gen vor allem in der Epidermis und in subepidermalen Cortextbereichen induzierte, also in den Geweben, die limitierend für das Streckungswachstum sind.

Die ersten über eine reine Korrelation hinausgehenden Hinweise auf die Funktion eines *SAUR*-verwandten Gens konnten durch Transposon-mutagenisierte Maispflanzen erhalten werden, deren *ZmAUX2*-Gen disruptiert war. Koleoptilen dieser Pflanzen elongierten langsamer als die der Kontrollpflanzen und reagierten schlechter auf einen gravitropen Reiz. Während der weiteren Entwicklung zeichneten sich diese Pflanzen durch Zwergwüchsigkeit aus. Der aus den Expressionsstudien gezogene Schluss, *ZmAUX2* wie auch andere *SAUR*-Gene seien für die Auxin-vermittelte Elongation wichtig, konnte durch diese Transposon-Mutanten erstmals direkt belegt werden.

Transgene Maispflanzen, die *ZmAUX2* überexprimierten, zeigten ebenfalls eine veränderte Elongation der Koleoptile und des Mesokotyls, was ein weiterer Beleg für die Beteiligung von *ZmAUX2* in der Auxin-vermittelten Elongation darstellt.

Durch metabolische Markierung von Maiskoleptilen und anschließende Immunpräzipitation konnte erstmals das *ZmAUX2*-Genprodukt und damit das erste Genprodukt der *SAUR*-Genfamilie *in vivo* nachgewiesen werden. Mit der in „pulse chase“-Experimenten ermittelte Halbwertszeit von fünf bis sieben Minuten ist *ZmAUX2* ähnlich labil wie die Aux/IAA-Genprodukte. *ZmAUX2* gehört damit zu den kurzlebigen eukaryotischen Proteinen überhaupt. Diese Kurzlebigkeit und das zweigeteilte Kernlokalisationsignal, das in *ZmAUX2* detektiert werden konnte, führten zur Annahme, das *ZmAUX2*-Gen könnte für einen

Transkriptionsfaktor kodieren. Hinweise für die Kernlokalisierung des ZmAUX2-Genprodukts konnten mittels einer ZmAUX2-GUS-Reporter-Fusion in Zwiebelepidermiszellen erhalten werden.

Für eine über die Rolle eines einfachen Gliedes der Signalkette vom Auxin zur Elongation hinausgehende Funktion des ZmAUX2 spricht seine nachgewiesene Calmodulinbindung. ZmAUX2 könnte ein Integrationspunkt verschiedener Signalketten sein, die zum einen vom Auxin über die *Aux/IAA*-Gene und zum anderen von einem geotropen Reiz über Calmodulin die Elongation beeinflussen.

## 2. Einleitung

Phytohormone steuern nahezu alle Differenzierungsprozesse im Leben der Pflanzen. Die pflanzliche Entwicklung wird durch die Phytohormone aber nicht in ein starres Programm gezwungen; vielmehr sind gerade sie es, die es der Pflanze erlauben, auf ihre Umwelt zu reagieren. Solche Reaktionen sind meist mit Wachstum verbunden; so wurde das erste entdeckte Phytohormon auch Auxin genannt (griech. *auxanein*: wachsen). Im Wachstum wird die Verzahnung von Entwicklung und Umweltreaktion besonders deutlich. Fast jeder Entwicklungsprozess ist mit Wachstum verbunden. „Sich entwickeln“ und „heranwachsen“ werden sogar häufig synonym benutzt. Erst durch Wachstum werden aber auch Reaktionen wie die Krümmung zum Licht oder die Ausrichtung zur Schwerkraft möglich. Nur durch eine auf die Umwelt reagierende Entwicklung wird so eine optimale Anpassung an den Standort erreicht, dem die sessile Pflanze nicht entfliehen kann.

Bereits DARWIN (1880) hat die Wachstumsreaktion einer sich nach dem Lichte krümmenden *Phalaris canariensis*-Koleoptile beschrieben und auf eine räumliche Trennung von Reizperzeption und Reaktion geschlossen. Auf DARWINS Untersuchungen aufbauend schloss WENT (1928) aus Experimenten mit *Avena sativa*-Koleoptilen zum erstenmal auf die Existenz eines niedermolekularen, als Auxin bezeichneten Mediators, der das Signal vom Ort der Wahrnehmung auf den Ort der Reaktion überträgt. Inzwischen ist die chemische Struktur vieler natürlicher und synthetischer Auxine aufgeklärt und Indol-3-Essigsäure (IAA) als das verantwortliche Phytohormon für die Zellstreckung im *Avena*-Krümmungstest identifiziert. Weiter stellte sich heraus, dass Auxine neben der Umweltreaktion, die zur Entdeckung geführt hat, auch sehr viele Entwicklungsvorgänge im Leben der Pflanze beeinflussen. Auxine spielen eine Rolle bei der Zellteilung und -elongation, bei der Wurzel- und Blattentwicklung, bei der Induktion der Leitbündeldifferenzierung ebenso wie bei der Apikaldominanz. Um eine solche Vielzahl unterschiedlicher Effekte über Auxin steuern zu können, müssen die Zellen bereits Informationen darüber enthalten, wie auf ein Auxinsignal reagiert werden soll. Die Zellen verfügen über ein ihrem Ort und ihrem Entwicklungszustand entsprechenden Kompetenzmuster, so dass Auxin die jeweils adäquate Reaktion hervorrufen kann. Zudem agiert Auxin nicht allein, vielmehr entscheidet ein ausbalanciertes Verhältnis verschiedener Phytohormone zueinander über die weitere Entwicklung, was die Erforschung der Wirkungsweise sehr erschwert. So ist über die Wirkungsmechanismen immer noch wenig bekannt, und als einfaches, inzwischen gut charakterisiertes Modellsystem hat die Koleoptile immer noch ihre Bedeutung.

Kontrollierend für das Längenwachstum von Koleoptilen wirken die Epidermis und subepidermale Schichten. Sie verhindern eine unkontrollierte Ausdehnung der inneren Zellschichten. Für die einzelnen Zellen wiederum stellt die Zellwand das kontrollierende Element dar (COSGROVE, 1997). Auxin erhöht die Extensibilität von Zellwänden, was zu einer Zellstreckung durch Wasseraufnahme führt.

### 2.1 Die Säurewachstumshypothese

Erklärt wurde diese Extensibilitätsänderung nähergehend erstmals durch die Säurewachstumshypothese (RAYLE & CLELAND, 1970; RAYLE & CLELAND, 1977; CLELAND, 1980; CLELAND *et al.*, 1991). Formuliert wurde sie auf Grund von Beobachtungen, nach denen eine Ansäuerung des Apoplasten Koleoptilen zum Elongieren bringen kann, und Auxin auch tatsächlich zu einer Erniedrigung des pH-Wertes im Apoplasten führt. Die Säurewachstumshypothese versteht die

Zellelongation als Folge der durch Auxin hervorgerufenen Ansäuerung des Apoplasten. Für das Ausschleusen von Protonen über die Plasmamembran wird eine  $H^+$ -ATPase verantwortlich gemacht. Auch das Pilzgift Fusicoccin steigert sowohl den Protonenausstrom als auch das Wachstum von Spross- und Koleoptilsegmenten, was für einen Zusammenhang von Ansäuerung und Elongation spricht. Komponenten der Primärwand – Xyloglukane und Zellulosemikrofibrillen – sollen sich bei erniedrigtem pH-Wert voneinander lösen, so dass die gelockerte Zellwand dem Turgor der Zelle einen geringeren Widerstand entgegengesetzt und auf diese Weise ein Expandieren ermöglicht. Es ist allerdings klar, dass das Säurewachstum nur ein Teilaspekt der Auxin-induzierten Elongation sein kann. Eine Ansäuerung des Mediums führt im Gegensatz zu Auxin nur zu einer kurzfristigen Elongation und ist in *Avena*-Koleoptilen bereits nach 60-100 Minuten vorüber (Übersicht in RAYLE & CLELAND, 1992 und KUTSCHERA, 1994).

## 2.2 Expansine

Vermitteln könnten eine Elongation nach Ansäuerung die sogenannten Expansine, kodiert von einer großen Genfamilie, bestehend aus den beiden Hauptklassen  $\alpha$ - und  $\beta$ -Expansine, die bis auf eine Ausnahme (die sich von Pflanzen ernährende *Helix pomatia*) auf die *Embryophyta* beschränkt ist. Sie scheinen nicht nur bei der Zellwandstreckung, sondern auch in der Morphogenese, der Fruchtreifung, der Samenkeimung und beim Pollenschlauchwachstum immer dort eine Rolle zu spielen, wo es auf eine Auflockerung der Zellwand ankommt (COSGROVE, 2000; LEE *et al.*, 2001).

Entdeckt wurden die  $\alpha$ -Expansine als Proteine, die, zugesetzt zu aufgekochten Gurkenhypokotylsegmenten, deren Fähigkeit auf Ansäuerung mit Extension zu antworten, wiederherstellen. Dabei liegt das Optimum der Reaktion zwischen pH 4,5 und 5, wie es die Säurewachstumshypothese postulierte (MCQUEEN-MASON *et al.*, 1992; LI *et al.*, 1993; TAI, 1994). Inzwischen konnte die Expression der Expansine mit einer Reihe von Wachstumsreaktionen korreliert werden. So reagiert der Sumpfsauerampfer *Rumex palustris* auf Überflutung mit starker Blattelongation, gleichzeitig wird die Transkription des Expansins RpEXP1 stark erhöht. Im nah verwandten *Rumex acetosa*, der nicht zu einer Elongation als Reaktion auf Überflutung in der Lage ist, konnte dagegen keine erhöhte Transkriptmenge von Expansinen nach einer Überflutung nachgewiesen werden (VRIEZEN *et al.*, 2000). Im Hypokotyl von *Pinus taeda* wird durch exogenes Auxin die Transkription eines Expansins bis zu 100fach gesteigert (HUTCHINSON *et al.*, 1999). Die aussagestärksten Korrelationen fand man aber im Vergleich der unterschiedlich stark elongierenden Flanken während einer gravitropen Krümmungsreaktion, denn hier werden Gewebe verglichen, die sich tatsächlich nur in der unterschiedlich schnellen Zellstreckung unterscheiden. Im Tomatenspross konnten nach gravitroper Stimulation höhere Expansin-Transkriptmengen in der unteren, stärker elongierenden Flanke nachgewiesen werden als in der oberen (CADERAS *et al.*, 2000). In der Maiswurzel konnte mittels Antikörper in der oberen, stärker elongierenden Flanke eine höhere Expansinmenge detektiert werden (ZHANG & HASENSTEIN, 2000). Neben solchen Korrelationen sprechen bereits erste Ergebnisse aus Versuchen mit transgenen Pflanzen für eine zentrale Rolle der Expansine bei der Zellwandstreckung. So konnte mit Expansin-antisense-mRNA das Wachstum von *Arabidopsis*-Blattstielen inhibiert werden, eine Überexpression führte aber zu etwas längeren Blattstielen, größeren Blattspreiten und größeren Zellen (CHO & COSGROVE, 2000).

Die Expansine scheinen jedoch keine Hydrolyse oder Proteolyse zu vermitteln (MCQUEEN-MASON *et al.*, 1992; MCQUEEN-MASON & COSGROVE, 1995). Auch zu einer Transglykosylierung von

Xyloglukanen sind sie wohl nicht befähigt (MCQUEEN-MASON *et al.*, 1993). Xyloglukane werden für eine Vernetzung der Zellulosemikrofibrillen verantwortlich gemacht, durch Transglykosylierung könnte eine Lockerung des Netzes erreicht werden. Die Expansine scheinen aber eher ein Gleiten der Zellulosemikrofibrillen zu ermöglichen, indem sie die Wasserstoffbrücken zwischen den Polysacchariden der Zellwand lösen (MCQUEEN-MASON & COSGROVE, 1994). Die Wandstabilität wird dabei nicht zerstört, da die gelösten Wasserstoffbrücken sofort durch neue ersetzt werden können. Unterstützt wird dieses Modell dadurch, dass bisher keine Hydrolasen, keine Proteasen und auch keine Xyloglukan-Transglykosylasen gefunden wurden, die die Zellwandrelaxation imitieren können (COSGROVE, 2000).

Wie aber kann Auxin die Expansine aktivieren?

### 2.3 Auxin-Bindende Proteine

Aus Reis konnte ein Auxin-bindendes Protein (57 kDa), ABP<sub>57</sub>, isoliert werden, das direkt mit der pflanzlichen Plasmamembran-H<sup>+</sup>-ATPase interagiert und diese aktiviert (KIM *et al.*, 1998b). Die Affinität zur H<sup>+</sup>-ATPase wird durch IAA-Bindung verstärkt (KIM *et al.*, 2001). Ganz im Sinne der Säurewachstumshypothese könnte Auxin also direkt mit ABP<sub>57</sub> die Aktivität der Plasmamembran-H<sup>+</sup>-ATPase steigern und durch die daraus folgende Ansäuerung könnten Expansine in ihr pH-Optimum geraten.

In Mais konnte nach Auxingabe eine Zunahme der Transkriptmenge einer Plasmamembran-H<sup>+</sup>-ATPase um das dreifache nachgewiesen werden (FRIAS *et al.*, 1996). Auch über Genaktivierung könnte Auxin also für eine Ansäuerung sorgen und auf die Expansine wirken.

Daneben spielt sicher auch die durch Auxin bewirkte Genaktivierung der Expansine eine Rolle (siehe oben, HUTCHINSON *et al.*, 1999). So wurden sogenannte „Auxin Responsive Elements“ (AuxREs), die eine durch Auxin induzierte Transkription vermitteln, in den Promotoren verschiedener Expansine gefunden. Das für ein Expansin kodierende *LeExp2* aus Tomate, das in elongierenden Zonen des Hypokotyls transkribiert wird (CATALÁ *et al.*, 2000), hat zwei AuxREs im Promotorbereich (CADERAS *et al.*, 2000). Auch konnte gezeigt werden, dass exogenes Auxin tatsächlich die *LeExp2*-Transkription in Hypokotylsegmenten stimuliert (CATALÁ *et al.*, 2000).

Welches Auxin-bindende Protein für eine solche Auxin-induzierte Expression verantwortlich ist, konnte bisher noch nicht geklärt werden. Neben dem oben erwähnten ABP<sub>57</sub> sind noch eine Reihe weiterer Auxin-bindender Proteine, sowohl lösliche als auch Membran-gebundene, identifiziert worden. Ihre Funktion in der Auxinperzeption, im Auxintransport oder im Metabolismus ist aber noch wenig verstanden (Übersicht in JONES, 1994).

Die Rolle des am besten charakterisierten, ursprünglich aus Maiskoleoptilen isolierten ABP1 (LÖBLER & KLÄMBT, 1985) in der Auxinperzeption wurde lange Jahre kontrovers diskutiert (HERTEL, 1995; VENIS, 1995). Obwohl ABP1 keine Transmembranspanne trägt, sehr wohl aber ein sogenanntes KDEL-Signal, das für einen Verbleib im Endoplasmatischen Reticulum (ER) verantwortlich gemacht wird, und ABP1 auch größtenteils im ER zu finden ist, wurde postuliert, ABP1 müsse eine Rezeptorfunktion an der Plasmamembran erfüllen. Dies schloss man aus Versuchen mit ABP1-Antiseren, die Auxin-induzierte Reaktionen verhindern konnten. So scheinen ABP1-Antiseren in Maiskoleoptilsegmenten eine Auxin-induzierte Elongation zu verhindern (LÖBLER & KLÄMBT, 1985). Diese Reaktion konnte zwar nicht von anderen Labors bestätigt werden, aber die durch Auxin ausgelöste Hyperpolarisation der Plasmamembran – das früheste Ereignis während der Auxin-induzierten Zellelongation – konnte durch ABP1-Antiseren in Tabakprotoplasten ebenfalls gehemmt werden, während Fusicoccin eine Hyperpolarisation hervorruft, die nicht durch ABP1-Antiseren verhindert

werden kann. Antikörper gegen die Plasmamembran  $H^+$ -ATPase hemmen jedoch die Wirkung sowohl von Fusicoccin als auch von Auxin (BARBIER-BRYGOO *et al.*, 1989). Weiter imitierte ein spezifischer Antikörper gegen die Auxinbindungsstelle des ABP1 eine Auxinantwort (VENIS *et al.*, 1992; STEFFENS *et al.*, 2001). Da davon auszugehen ist, dass die Antikörper nicht ins Cytoplasma gelangen, wurde ein „docking“-Protein postuliert, das in der Plasmamembran verankert ist, durch die Bindung eines Auxin-ABP1-Komplexes aktiviert wird und das Signal in die Zelle weiter gibt (KLÄMBT, 1990). Eine starke Bindung von exogenem ABP1 an Plasmamembranvesikel von Maiskoleoptilen wurde auch nachgewiesen (SCHIEBL *et al.*, 1997), und in immunocytochemische Untersuchungen an Maiskoleoptilen konnte ABP1 zu geringen Mengen an der Plasmamembran lokalisiert werden (BRONSEMA *et al.*, 1998), die Hauptmenge war jedoch wie zu erwarten im ER zu finden. Nach Berechnungen von HENDERSON *et al.* (1997) sollen weniger als 2 % des ABP1 bis an die Plasmamembran gelangen. DIEKMANN *et al.* (1995) berichteten sogar von einer durch Auxin stimulierten Clusterbildung des ABP1 in der Plasmamembran. Neuere Arbeiten mit monoklonalen Antikörpern bestätigen, dass ABP1 aktiv als Auxinrezeptor an der Plasmamembran wirkt. Wie die polyklonalen Seren können verschiedene monoklonale Antikörper im Tabakprotoplastensystem die Auxininduktion verhindern oder imitieren (LEBLANC *et al.*, 1999). Durch die Verwendung monoklonaler Antikörper kann ausgeschlossen werden, dass in den Seren vorhandene Antikörper, die gar nicht gegen ABP1 gerichtet sind, diesen Effekt auslösen. Genaue Bindungsstudien mit diesen monoklonalen Antikörpern und der Einfluss von Auxin auf diese Bindungen deuten darauf hin, dass Auxinbindung eine Konformationsänderung in ABP1 bewirkt. Bestimmte monoklonale Antikörper erkennen das Protein mit gebundenem Auxin nicht mehr, obwohl sie nicht an der Auxinbindungsstelle binden und deshalb durch Auxin sterisch gehindert wären (DAVID *et al.*, 2001). Dies bestätigt eine Annahme SHIMOMURAS *et al.* (1986), die auf eine Konformationsänderung bereits aus Zirkulardichroismus-Spektroskopie-Messungen schlossen.

Um mehr ABP1 an die Zelloberfläche zu dirigieren, wurde es im KDEL-Signal mutiert und in Tabak überexprimiert (BAULY *et al.*, 2000). Die Mutationen im KDEL-Signal konnten zwar mehr ABP1 ins Dictyosom lenken, an der Plasmamembran wurde aber keine Zunahme an ABP1 detektiert. Gleichwohl bewirkte die ABP1-Überexpression eine gesteigerte Reaktion auf Auxin, was erneut die Frage aufwirft, ob ABP1 nicht auch eine Funktion im Innern der Zelle erfüllt

Diskutiert wird, dass ABP1 als Chaperon bereits im ER den Transport von Zellwandbestandteilen zur Zellwand reguliert. Außer den Zellulosebausteinen durchlaufen alle Vorläufer der Zellwand das ER. So könnten wachstumslimitierende Faktoren bereits im ER mit ABP1 Auxin-abhängig interagieren (CHEN *et al.*, 2001). Andererseits könnte das ER auch nur als Speicher dienen, aus dem je nach physiologischem Zustand ABP1 an die Zelloberfläche segregiert wird und erst dort zum aktiven Rezeptor wird (SHIMOMURA *et al.*, 1999).

Das Cytoplasma wird als Ort der Auxinperzeption ebenfalls diskutiert. Der Befund, dass nur das die Cytoplasmamembran durchquerende Auxinanalogen NAA den Defekt in der gravitropen Reaktion einer *aux1*-Mutante komplementieren konnte, nicht aber das Auxinanalogen 2,4-D, das die Cytoplasmamembran nicht durchqueren kann, wurde in dieser Richtung gedeutet (YAMAMOTO & YAMAMOTO, 1998). ABP1 wird tatsächlich auch im Cytoplasma gefunden (BRONSEMA *et al.*, 1998), die weiteren identifizierten, Auxin-bindenden Proteine könnten aber ebenso eine cytosolische Auxinperzeption übernehmen.

Die Disruption und die Überexpression des ABP1 lieferten inzwischen neue Hinweise dafür, dass ABP1 tatsächlich an der Signaltransduktion, die zu einer Zellelongation führt, beteiligt

ist. Die Entwicklung eines *Arabidopsis*-Embryos, der nach T-DNA-Disruption kein ABP1-Protein mehr bilden kann, blieb im globulären Stadium stehen. Die Zellen strecken sich nicht richtig und teilen sich nicht in der richtigen Orientierung. Wird in Zellen einer Tabak-suspensionskultur die ABP1-Expression durch ein *antisense*-Konstrukt verhindert, so verlieren auch diese Zellen ihre Fähigkeit, auf Auxingabe mit einer Streckung zu reagieren (CHEN *et al.*, 2001). Durch eine konstitutive ABP1-Überexpression in *Arabidopsis* können Blattbereiche auf Auxingabe mit Zellexpansion reagieren, die dies normalerweise nicht können. Der Habitus der Pflanzen unterscheidet sich allerdings nicht von dem des Wildtyps, jedoch sind die Zellen größer (JONES *et al.*, 1998). Dies bestätigt die Beobachtung, dass die Basiseinheit der Morphologie nicht die Zelle ist, da Blätter der selben Morphologie und Größe von weniger, aber dafür größeren Zellen gebildet werden können.

ABP1 spielt wohl sicher eine wichtige Rolle in der Auxinantwort, die Wirkungsweise und der Ort seiner Aktivität bedarf aber noch einer weiteren Aufklärung.

Versuche mit Auxin-Transport-Inhibitoren wurden lange Zeit als Hinweise auf eine intrazelluläre Wahrnehmung des Auxinsignals gewertet (STEFFENS *et al.*, 2001). Letzten Endes zeigen sie aber nur, dass der Auxintransport eine wichtige Komponente in der Auxin-physiologie spielt.

#### 2.4 Auxintransport

Vom Hauptsyntheseort, dem Apex, wird Auxin basipetal mit einer Geschwindigkeit von 10-20 mm/h bis zur Basis transportiert. In der Wurzel wird Auxin dann zentral, akropetal bis zur Wurzelspitze geleitet, und von dort in der Epidermis und anschließenden Cortexzellen basipetal weitergegeben (JONES, 1998; SCHOPFER & BRENNICKE, 1999).

Nach dem chemie-osmotischen Modell des polaren Auxintransportes, wird Auxin undissoziiert (der vorherrschenden Form im sauren Apoplasten) über einen Auxin-Transporter oder auch direkt durch die Membran aufgenommen. Im eher basischen Cytosol dissoziiert Auxin und kann somit nicht wieder über die Aufnahmewege aus der Zelle heraus. Auxin kann somit bis zu 20fach in der Zelle akkumuliert werden. Die antreibende Kraft ist allein der elektrochemische Gradient über die Plasmamembran. Verlassen werden kann die Zelle nur basal über einen Efflux-Transporter, der Auxin in der deprotonierten Form transportiert. (Übersicht in JONES, 1998) Diese zunächst nur postulierte Asymmetrie des Efflux-Transporters konnte durch Immunlokalisationsexperimente bestätigt werden (GÄLWEILER *et al.*, 1998).

Als ein Bestandteil des Efflux-Transporters identifiziert wurde AtPIN1 („*Arabidopsis thaliana* pin-formed“, auch AGR1 „agravitropic“ oder EIR1 „ethylene insensitive root“), das Homologien zu bakteriellen Transportern zeigt (CHEN *et al.*, 1998; GÄLWEILER *et al.*, 1998). Mindestens 14 *AtPIN1*-verwandte Gene sind in *Arabidopsis* zu finden (SWARUP *et al.*, 2000). AtPIN1 wurde in der basalen Membran von Xylemparenchymzellen lokalisiert, wo es den basipetalen Transport ermöglichen soll. AtPIN2 wurde in der oberen Membran von Epidermis- und Cortexzellen der Wurzel gefunden. In der Wurzeelongationszone soll der Auxintransport in diesen Zellen ja auch tatsächlich basipetal nach oben führen (MÜLLER *et al.*, 1998). Lange wurde angenommen, dass der polare Transport allein durch diese Asymmetrie in der Lokalisation der Efflux-Transporter zustande kommt (PALME & GÄLWEILER, 1999; SCHOPFER & BRENNICKE, 1999). Neueste Untersuchungen zur Lokalisation des Influx-Transporters zeigten auch für diesen eine asymmetrische Verteilung (SWARUP *et al.*, 2001). Als Influx-Transporter wurde AUX1 identifiziert (BENNETT *et al.*, 1996), das in *Arabidopsis* noch drei weitere Verwandte hat, LEX1 bis LEX3 („like AUX1“) (SWARUP *et al.*, 2000). AUX1 ist den pflanzlichen Aminosäure-Permeasen verwandt. Da Auxin aus Tryptophan synthetisiert

werden kann, ist eine Evolution eines Auxintransporters aus einem Tryptophantransporter durchaus wahrscheinlich.

AUX1 konnte in der oberen Membran von Protophloemzellen der Wurzel lokalisiert werden, wohingegen bei gleichzeitiger Färbung AtPIN1 an der unteren Plasmamembran detektiert wurde (SWARUP *et al.*, 2001). Diese Lokalisation spricht zudem für einen Ferntransport über das Phloem. Protophloemzellen haben noch keine Siebplatten ausgebildet. Eine Entladung des Phloems könnte in diese Zellen über AUX1 erfolgen, außerdem ist Auxin tatsächlich in  $\mu\text{M}$ -Konzentrationen im Phloem detektiert worden (BAKER, 2000 nach SWARUP *et al.*, 2001). Daneben ist AUX1 auch in der Columella der lateralen Wurzelkappe und der Epidermis gefunden worden (SWARUP *et al.*, 2001).

Neueste Ergebnisse zeigen (GELDNER *et al.*, 2001), dass die zur Untersuchung der Auxin-Transporter verwendeten Inhibitoren gar nicht spezifisch die Auxin-Transporter hemmen, sondern auf den Vesikel-Transport wirken. Auch andere Plasmamembranproteine werden durch diese Inhibitoren in ihrer Lokalisation gestört, und Brefeldin A (BFA) kann die physiologische Wirkung solcher Inhibitoren, beispielsweise auf Wurzelelongation bzw. -gravitropismus, imitieren. Weitere Versuche mit dem Vesikeltransport-Inhibitor BFA zeigten, dass der Efflux-Transporter rasch zwischen Plasmamembran und einem noch nicht identifizierten endosomalem Kompartiment zirkuliert (GELDNER *et al.*, 2001). Über dieses schnelle Zirkulieren des Efflux-Transporters könnte natürlich der Auxin-Transport schnell und effektiv reguliert werden.

Flavonoide können den Auxintransport beeinflussen (BROWN *et al.*, 2001). Zudem binden Flavonoide an NBP („Naphthylphthalaminsäure bindendes Protein“), das wiederum mit dem Auxin-Efflux-Transporter in Verbindung steht (Übersicht in MUDAY & DELONG, 2001). Über NBP scheint aber nicht wie bisher angenommen die Aktivität des Efflux-Transporters, sondern dessen Lokalisation reguliert zu werden (GIL *et al.*, 2001; LUSCHNIG, 2001).

Auch Phosphorylierung scheint eine wichtige Rolle bei der Regulation des Auxin-Transporters zu spielen. So ist in der Auxin-Transport-Mutante *rcn1* („roots curl in NPA“), die nur langsam auf gravitrope Reizung reagiert, die regulatorische Untereinheit A der Proteinphosphatase 2A defekt (RASHOTTE *et al.* 2001). Ist die PINOID1-Kinase mutiert so zeigen die Pflanzen einen ähnlichen Phänotyp, wie Pflanzen mit inaktivem PIN1 Efflux-Transporter. Zudem reduzieren Kinase-Inhibitoren den Auxin-Efflux ohne den Influx zu tangieren (MUDAY & DELONG, 2001).

Der Auxin-Transport scheint also über viele Faktoren beeinflussbar zu sein. Zellen könnten über eine veränderte Transporterverteilung sowohl ihre intrazelluläre Auxinkonzentration beeinflussen, und damit ihre Empfindlichkeit auf die extrazelluläre Auxinkonzentration verändern. Sie könnten aber auch den Auxin-Transport beeinflussen und über eine veränderte Lokalisation der Transporter auch die bereits in der ersten Hälfte des vorigen Jahrhunderts von Went postulierte Querverschiebung des Auxins während einer tropischen Krümmungsbewegung bewerkstelligen. Dafür gibt es allerdings noch keinen wirklich sicheren Anhaltspunkt. Hingegen wird schon lange kontrovers diskutiert, ob die gemessenen Auxinkonzentrationsunterschiede und der Zeitverlauf ihres Auftauchens (PHILIPPAR *et al.*, 1999) die Krümmungsbewegung ausreichend erklären können (FIRN & DIGBY, 1980). Es bedarf relativ hoher exogener Auxinkonzentrationen ( $10^{-5}\text{M}$ ), um die gravitrope Reaktion zu hemmen. Werden physiologischen Konzentrationen ( $10^{-6}$ - $10^{-7}\text{M}$ ) verwendet, die ausreichen müssten, um die geringen Konzentrationsunterschiede aufzuheben, krümmt sich die Koleoptile normal, obwohl ihr Längenwachstum sehr wohl gesteigert ist (EDELMANN, 2001). EDELMANN schlägt

deshalb ein Modell vor, in dem Auxin für einen Strom von Zellwand-relaxierenden Substanzen in Vesikeln zur Zellwand sorgt, was zum bekannten Elongationswachstum führt. Die dortige Entladung in die Zellwand soll aber während der gravitropen Reaktion an der oberen Seite gehemmt sein. Dort sammeln sich nach seinen Beobachtungen sogenannte osmiophile Partikel an; der Transport dieser Partikel an die Zellwand scheint dabei nicht verändert zu sein. Die angesammelten osmiophilen Partikel könnten für die beobachtbare, verstärkte gravitrope Krümmung verantwortlich sein, die nach einer kurzen Vorinkubation der Koleoptilen im umgekehrten gravitropen Feld auftritt (EDELDMANN & SAMAJOVA, 1999). Auxin steuert nach diesem Modell zwar das Wachstum, indem es zu einer Sekretion von Zellwand relaxierenden Faktoren führt, diese Sekretion kann aber während der gravitropen Reaktion an der oberen Flanke gehemmt werden.

Ein gravitroper Stimulus muss also nicht direkt auf die Auxinkonzentration wirken, sondern könnte die Auxinantwort in der nachgeschalteten Signaltransduktion beeinflussen. Es gibt immer noch wenig Anhaltspunkte welche Signalwege dies sein könnten.

### 2.5 Auxin-Signalwege

In *Catharanthus roseus*-Zellkulturen, die in der G1-Phase arretiert waren, konnte nach Zugabe von Auxin eine Zunahme von Inositol-(1,4,5)-trisphosphat und Inositolbisphosphat festgestellt werden; Inositol-(1,4,5)-trisphosphat konnte in *C. roseus*-Mikrosomen eine  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung bewirken (ETTLINGER & LEHLE, 1988). Dies deutet auf eine Aktivierung der Phospholipase C durch Auxin mit nachgeschalteter Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$  hin. Eine Erhöhung der cytoplasmatischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration nach Auxingabe konnte in Maiskoleoptilen gemessen werden (FELLE, 1988; GEHRING *et al.*, 1990a), wenngleich bei diesen Messungen auch die Spezifität des Auxinsignals fraglich blieb. Überzeugender konnten erhöhte Calciumkonzentrationen auf der jeweils stärker elongierenden Flanke während einer photo- bzw. geotropen Reaktion nachgewiesen werden (GEHRING *et al.*, 1990b). Neuere Arbeiten deuten aber darauf hin, dass die Inositol-(1,4,5)-trisphosphat-Freisetzung und ein eventuell nachgeschaltetes  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal nach geotroper Reizung noch vor einer Auxinumverteilung auftritt, und eher ein Element in der Signaltransduktion des gravitropen Reizes und nicht des Auxins darstellt (PERERA *et al.*, 2001). Interessant ist in diesem Zusammenhang die Entdeckung, dass die früh Auxin-induzierten *SAUR*-Gene Calmodulin Calcium-abhängig binden (YANG & POOVAIAH, 2000). Der gravitrope Stimulus könnte also eventuell erst hier in die Auxin vermittelte Elongation eingreifen. Calcium ist aber ein Signal, das in vielen verschiedenen Signaltransduktionswegen eine Rolle spielt und geradezu entgegengesetzte Wirkungen haben kann. Hinweise wie solch unterschiedliche Wirkungen durch ein und dieselbe Substanz erzielt werden könnten, gaben neueste Arbeiten, nach denen Information in den unterschiedlichen Oszillationsmustern liegt (ALLEN *et al.*, 2001).

Auxin kann auch die Phospholipase  $A_2$  stimulieren. So wurde in Sojabohnen-Mikrosomen nach Auxingabe eine gesteigerte Aktivität der Phospholipase  $A_2$  gemessen (SCHERER & ANDRÉ, 1993). In Suspensionskulturen konnte eine Freisetzung von Lysophosphatidylcholin (LPC) aus Phosphatidylcholin nach Auxingabe festgestellt werden, eine Reaktion, die durch die Phospholipase  $A_2$  katalysiert wird (PAUL *et al.*, 1998). Wird die Phospholipase  $A_2$  spezifisch gehemmt, so wird dadurch auch das Auxin-induzierte Hypokotylstreckungswachstum in *Cucurbita pepo* gehemmt (SCHERER & ARNOLD, 1997). Weiter spricht die gemessene Zunahme der Elongationsrate in Maiskoleoptilen nach Inkubation mit LPC, die nicht durch Auxin weiter gesteigert werden kann, für eine Rolle der Phospholipase  $A_2$  in der Auxin-induzierten

Koleoptilelongation (YI *et al.*, 1996). Zudem konnte Lysophosphatidylcholin die Proteinkinase der Plasmamembran *in vitro* aktivieren (SCHERER *et al.* 1993).

Eine Aktivierung der Phospholipase A<sub>2</sub> könnte durch ein G-Protein vermittelt werden (PAUL *et al.*, 1998). Ebenso gibt es Hinweise, dass das postulierte „docking“-Protein für das ABP1 (siehe oben) ein G-Protein ist. So kann ein C-terminales Peptid des ABP1 eine GTP $\gamma$ S-Bindung an Maismesokotyl-Mikrosomen stimulieren (MILLNER *et al.*, 1996).

Über G-Proteine könnte eine MAPK-Kaskade angeschaltet und über diese die Phospholipase stimuliert werden (ZWERGER & HIRT, 2001). Zwar konnten die von MIZOGUCHI *et al.* (1994) gemessene MAPK-Aktivität, die in Tabaksuspensionskulturen nach Auxinzugabe gemessen wurden, von TENA und RENAUDIN (1998) als nicht Auxin-spezifisch charakterisiert werden – der gemessene Effekt kann allein durch Ansäuerung, wie sie in den Versuchen durch die Indol-3-Essigsäure zustande kam, erzielt werden – MOCKAITIS und HOWELL (2000) konnten aber eine MAPK-Aktivierung durch Auxin in *Arabidopsis*-Wurzeln messen, die nicht durch einen Ansäuerungseffekt erklärt werden kann. Diese MAPK-Reaktion ist in *axr4*-Mutanten („auxin resistant“), die eine verringerte Sensitivität gegenüber Auxin zeigen, reduziert, obwohl diese Mutanten auf andere Stimuli mit einer normalen MAPK-Aktivierung reagieren (MOCKAITIS & HOWELL, 2000).

Ein weiterer, sicher sehr wichtiger Aspekt der Signalübertragung ist der schnelle Proteinabbau, zumindest einer Gruppe von schnell Auxin-induzierten Genen, der Aux/IAA-Familie (siehe unten).

## **2.6 Schnell Auxin-induzierte Gene**

Eine rasche Auxin-induzierte Transkription von Genen konnte bereits 1982 von ZURFLUH & GUILFOYLE nachgewiesen werden. Inzwischen sind eine ganze Reihe solcher Gene kloniert und charakterisiert worden, die auch bei durch Cycloheximid gehemmter Proteinbiosynthese durch Auxin induziert werden, so dass sie der primären Auxinantwort zugerechnet werden können.

### **2.6.1 Die ACS-Genfamilie**

Nur für eine Klasse dieser Gene der Primärantwort ist die Funktion bereits bekannt. Es handelt sich um Aminocyclopropan-Carboxylat-Synthase-Gene, deren Genprodukte den limitierenden Schritt in der Ethylenbiosynthese von S-Adenosylmethionin zum ACC katalysieren. Die ACS-Genfamilie kodiert für kurzlebige, cytosolische Proteine, die gewebespezifisch reguliert sind. Über diese ACS-Proteine scheint die Ethylensynthese Auxin-abhängig gesteuert zu sein, wodurch eine Verzahnung von Auxin- und Ethylenwirkung zustande kommt (Übersicht in ABEL & THEOLOGIS, 1996). Allerdings sind wohl nicht alle Mitglieder der Familie an einer primären Auxinantwort beteiligt.

### **2.6.2 Die GST-Genfamilie**

Eine zweite, schnell durch Auxin induzierte Genfamilie zeigt Homologien zur Glutathion-S-Transferase. Für einzelne Mitglieder dieser GST-ähnlichen Familie, zu der auch die *par*-Gene („protoplast-auxin-regulated“) gehören, wurde zwar nachgewiesen, dass sie tatsächlich eine Glutathion-S-Transferase-Aktivität besitzen, allerdings ist ihre eigentliche Funktion noch unklar. Eine bekannte Funktion von Glutathion-S-Transferasen ist die Entgiftung xenobiotischer und endogener toxischer Substanzen. Damit verwandt ist ihre Schutzfunktion vor schädlichen, oxidativen Reaktionen, wie sie nach Pathogeninfektionen und mechanischen Traumata auftauchen. Auch in Folge der vielen durch Auxin induzierten metabolischen und

zellphysiologischen Prozesse fallen viele oxidierende Nebenprodukte an, die durch eine GST-Aktivität unschädlich gemacht werden könnten (ABEL & THEOLOGIS, 1996). Es wurde auch diskutiert, ob das meist als Induktor verwendete 2,4-D als xenobiotisch erkannt wird und deshalb zu einer Induktion der GSTs führt. Induziert werden die GSTs neben 2,4-D auch durch biologisch inaktive Auxinanaloga wie 2,3-D, elektrophile Substanzen, Schwermetalle und Stressbedingungen (ULMASOV *et al.*, 1994; 1995b). Desweiteren konnten Salicylsäure und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> als Induktoren wirken, wie mittels *GST6*-Promotor-Luziferase-Fusionen gezeigt wurde (CHEN & SINGH, 1999). Das Signal des oxidativen Stresses könnte dabei über eine MAPK-Kaskade vermittelt werden (KOVTURN *et al.*, 2000). Die *GST*-Familie scheint also weniger an einer spezifischen Auxinsignaltransduktion beteiligt zu sein als vielmehr an einer Stressantwort, die auch durch Auxin ausgelöst werden kann.

Allerdings ist die *GST*-Familie nicht sehr einheitlich, so zeigen *parA* und eine Gruppe *parA* ähnlicher Gene nur begrenzte Homologien zu *parB*, für das die GST-Aktivität zunächst gezeigt werden konnte. Für *parA* selbst konnte nur eine geringe GST-Aktivität nachgewiesen werden. Die Tatsache, dass *parA* im Kern zu finden ist, sowie seine Ähnlichkeit zu einem prokaryotischen Protein, das einen Komplex mit der RNA-Polymerase bildet, gaben Anlass zu Spekulationen über eine Funktion in der Expressionsregulation (TAKAHASHI *et al.*, 1995).

Zudem ist nicht klar, ob Auxine überhaupt an das katalytische Zentrum der GSTs binden. Tierische GSTs haben auch eine Bindedomäne, die für den innerzellulären Transport hydrophober und amphiphatischer Moleküle wichtig ist. BINLANG und STURM (1995) schlugen ein Modell vor, in dem Auxin an eine solche Domäne bindet, wodurch die Auxinkonzentration in den Zellen kontrolliert werden könnte. Es wurde auch vorgeschlagen, Auxin reguliere durch eine solche Bindung das Redox-Potential in den Zellen. Weiter könnte Auxin über GST-kontrollierten, reaktiven Sauerstoff eine Genexpression regulieren (Übersicht in ABEL & THEOLOGIS, 1996).

Neben ihrer Rolle in der Stressantwort erscheint es möglich, dass einige Mitglieder der *GST*-Familie durchaus eine spezifische Funktion in der Auxinreaktion haben.

### 2.6.3 Die *GH3*-Genfamilie

Als erstes Auxin-induziertes Gen einer Familie, die in *Arabidopsis* aus mindestens zehn Mitgliedern besteht, wurde *GH3*, das für ein 70 kDa Protein kodiert, in einem differentiellen Screening identifiziert (HAGEN *et al.*, 1984). Bereits fünf Minuten nach einer Auxinzugabe konnte eine erhöhte Transkription nachgewiesen werden (HAGEN & GUILFOYLE, 1985). Anders als die *GST*-Gene werden *GH3*-Gene spezifisch nur durch biologisch aktive Auxine induziert; auch Cycloheximid führt zu keiner *GH3*-Induktion, verhindert eine Auxininduktion aber nicht (FRANCO *et al.*, 1990). Die *GH3*-Gene sind also primäre Gene der Auxinantwort. Mit Antikörpern konnte eine cytosolische Lokalisation von *GH3* nachgewiesen werden.

Expressionsstudien mit einem *GH3*-Promotor-GUS-Konstrukt wiesen auf eine Beteiligung von *GH3* in gravi- bzw. phototropen Krümmungsreaktionen hin (LI *et al.*, 1999). Das *GH3* verwandte Gen, *FIN219* („far red insensitiv“), scheint eine Rolle in der Phytochrom A vermittelten Lichtinaktivierung von COP1 („constitutively photomorphogenic“) zu spielen, einem zentralen Repressor der Photomorphogenese (HSIEH *et al.*, 2000). In einer Mutante *dfl1-D* („dwarf in light“), in der das zu *GH3* homologe *DFL1*-Gen überexprimiert ist, konnte ein vermindertes Sprosswachstum im Licht, nicht aber im Dunkeln beobachtet werden. Das *DFL1*-Gen selbst wird aber nicht durch Licht reguliert. Es könnte aber mit einem lichtabhängigen Partner interagieren und als Heterodimer die Zellelongation hemmen (NAKAZAWA *et al.*, 2001).

Reguliert werden könnten *GH3*-Gene über eine MAPK-Kaskade. So konnte in Mais-Protoplasten die Induktion durch Auxin eines über einen *GH3*-Promotor kontrollierten Reportergens spezifisch mittels einer MAPKK-Kinase, NPK1 („*Nicotiana* protein kinase“), reprimiert werden (KOVTON *et al.*, 1998). Die NPK1 homologen Proteine ANP1, 2 und 3, („*Arabidopsis* NPK1 like protein kinase“) aus *Arabidopsis*, die ebenfalls eine *GH3*-Promotor-Aktivität reprimieren können, wirken wohl in einer durch oxidativen Stress aktivierten MAPK-Kaskade (KOVTON *et al.*, 2000). *GH3*-Proteine könnten also wichtige Integrationspunkte sowohl in der Licht-, der Stress- und Auxin-Reaktion darstellen.

#### 2.6.4 Die *Aux/IAA*-Genfamilie

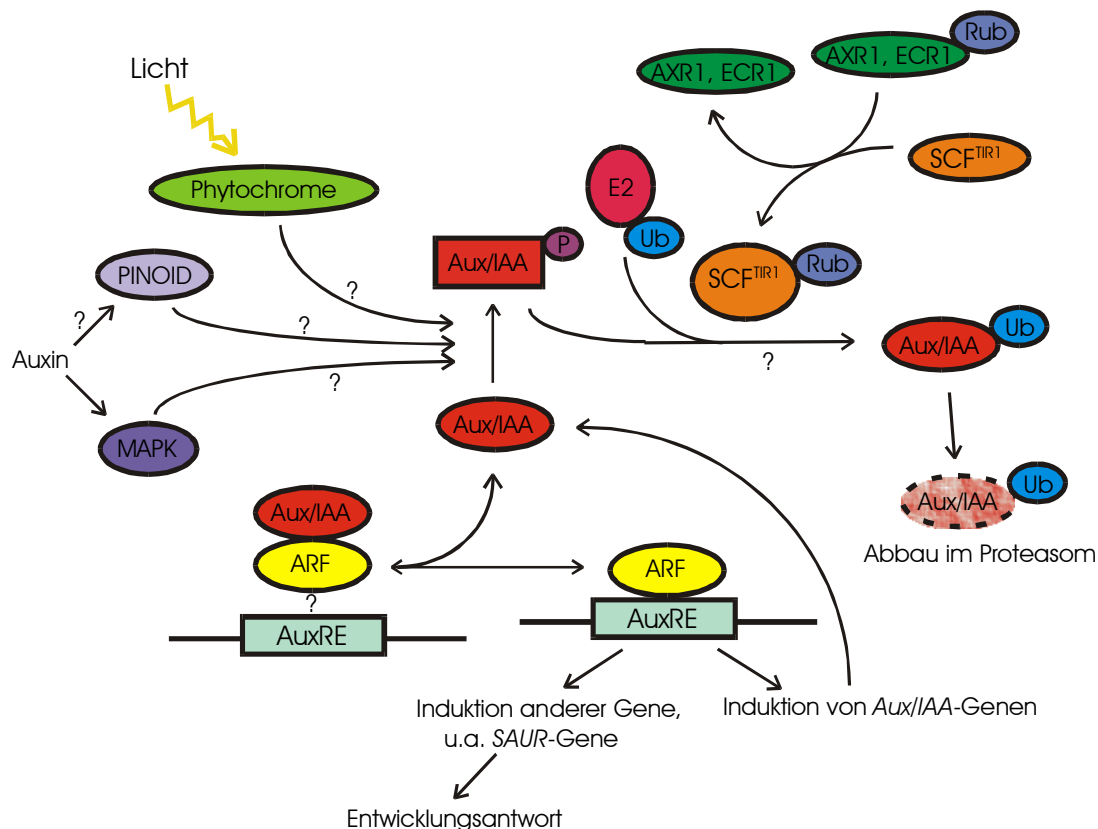
Die Gen-Familie der ersten Auxinantwort, über deren Regulation bisher am meisten bekannt ist, ist die *Aux/IAA*-Familie. Es handelt sich dabei um 19-36 kDa große Kernproteine, die vier konservierte Domänen, I-IV, besitzen, mit einem Kernlokalisierungssignal in Domäne IV. Im *Arabidopsis*-Genom sind 25 solcher *Aux/IAA*-Gene aufgespürt worden, die alle vier Domänen besitzen, und vier weitere, denen ein oder zwei Domänen fehlen (REED, 2001). In „yeast two hybrid“-Experimenten konnte gezeigt werden, dass die Domänen III und IV eine Homo- bzw. Heterodimerisierung zwischen *Aux/IAA*- und eine Heterodimerisierung zwischen *Aux/IAA*- und ARF-Proteinen ermöglichen (OUELLET *et al.*, 2001). Die ARF-Proteine („auxin response factor“) weisen C-terminal ebenfalls die Domänen III und IV auf, sind aber nicht Auxin-induzierbar. N-terminal zeigen ARF-Proteine eine DNA-Bindedomäne, die an die Sequenz TGTCTC von AuxREs („auxin responsive elements“) bindet (ULMASOV *et al.*, 1997). AuxREs sind in vielen Auxin-induzierbaren Genen zu finden, und vermitteln zusammen mit einem konstitutiven Element die Auxininduzierbarkeit, wie in Reporterstudien gezeigt wurde (ULMASOV *et al.*, 1995a). Der mittlere Bereich konnte in ARF5, -6, -7 und -8 für eine Transkriptionsaktivierung verantwortlich gemacht werden. In ARF1 scheint dieser jedoch eine reprimierende Wirkung zu haben (ULMASOV *et al.*, 1999).

Die *Aux/IAA*-Gene werden nur durch Auxin und Cycloheximid induziert, was zur Postulierung eines kurzlebigen Repressors führte. Für eine solche Induktion durch De-reprimierung spricht, dass in transgenem Tabak, der ein Konstrukt aus einem *Ps-IAA4/5*-Promotor bzw. *Ps-IAA6*-Promotor und dem GUS-Reportergen trägt, die GUS-Transkription auch durch Cycloheximid induziert wird. Daneben führt Cycloheximid zu einer Stabilisierung der Transkripte dieser *Aux/IAA*-Gene, wie Induktionsversuche bei gleichzeitiger Gabe von Transkriptioninhibitoren zeigten. Dies würde für eine kurzlebige, spezifische RNase sprechen; fällt sie nach Cycloheximidinkubation weg, so würden die *Aux/IAA*-Transkripte nicht mehr so schnell abgebaut. Ein Translationsarrest könnte über einen noch nicht verstandenen Mechanismus ebenfalls zu einer solchen Stabilisierung der Transkripte führen. (KOSHIBA *et al.*, 1995)

Für die *Aux/IAA*-Genprodukte konnte eine Halbwertszeit von sechs bis acht Minuten gemessen werden (ABEL *et al.*, 1994). Diese Kurzlebigkeit lässt sich auch auf einen Reporter übertragen. Fusioniert man das *PsIAA6*-Gen der Erbse mit der Luziferase, so wird auch diese zum schnellen Abbau bestimmt. Wird aber in der *PsIAA6*-Domäne II Prolin 61 zu Leucin mutiert oder Valin 62 zu Glycin, so ist das Fusionsprotein weit weniger kurzlebig (WORLEY *et al.* 2000; RAMOS *et al.*, 2001). Mit spezifischen Proteasom-Inhibitoren konnte gezeigt werden, dass dieser schnelle Abbau Proteasom-abhängig ist (RAMOS *et al.* 2001). Eine solche Abhängigkeit könnte auch erklären, warum Mutationen in den Komponenten des SCF<sup>TIR1</sup>-Ubiquitinligasekomplexes („SKP1, CDC53 or cullin, F-box protein“) Auxin-induzierte Reaktionen beeinflussen. Eine Überexpression von TIR1 („auxin transport inhibitor response“) führt

sogar zu einer erhöhten Auxinantwort mit einer gesteigerten Expression Auxin-induzierbarer Gene (GRAY *et al.*, 1999). Die Cullin-Komponente dieses Komplexes ist wiederum durch AXR1 („auxin resistant“) und ECR1 („E1 C-terminus related“) reguliert. Das dem N-Terminus des E1-Protein („ubiquitin-activating-enzyme“) ähnliche AXR1 bildet mit ECR1 ein Heterodimer, welches das Ubiquitin-ähnliche Molekül Rub („related to ubiquitin“) auf SCF<sup>TIR1</sup> überträgt (DEL POZO & ESTELLE, 1999). Ist AXR1 mutiert, so ist auch die Transkription der *Aux/IAA*-Gene und weiterer Auxin-induzierbarer Gene anderer Familien, die ebenfalls ein AuxRE-Elemente tragen, nach Auxingabe beeinträchtigt (TIMPTE *et al.*, 1995, ABEL *et al.*, 1995a/b).

Für ein IAA1-Luziferase-Fusionsprotein konnte gezeigt werden, dass dieser schnelle Abbau Auxin-abhängig ist (ZENSER *et al.*, 2001). Analog konnte für ein IAA17-Luziferase-Fusionsprotein sogar eine Auxin-Dosisabhängigkeit der Stabilität nachgewiesen werden (TIWARI *et al.*, 2001). In Hefe und tierischen Systemen wird die Ubiquitinierung durch Phosphorylierung gesteuert (GRAY & ESTELLE, 2000). Eine Phosphorylierung des SHY2/IAA3-Proteins („short hypocotyl“) konnte *in vivo* bereits nachgewiesen werden (COLÓN-CARMONA *et al.*, 2000). Die Phosphorylierung könnte durch MAP-Kinasen sowie der PINOID-Kinase vermittelt werden (siehe oben).



**Abb. 2-1 Rolle der Aux/IAA-Gene**  
Verändert nach REED, 2001.

Die Aux/IAA-Proteine könnten also mit den an den AuxREs sitzenden ARF-Transkriptionsfaktoren wechselwirken und dadurch auch ihre eigene Transkription reprimieren (Abb. 2-1). Sie könnten also selbst die kurzlebigen Repressoren sein, die nach den Induktionsversuchen mit Cycloheximid postuliert wurden (siehe oben). Eine reprimierende Wirkung konnte für 16 verschiedene Aux/IAA-Genprodukte kürzlich tatsächlich durch Überexpressionen in

Karotten-Protoplasten, die ein Auxin-induzierbares GUS-Reporterkonstrukt enthielten, gezeigt werden (TIWARI *et al.*, 2001).

Auxin könnte über eine MAP-Kinasekaskade oder über die PINOID-Kinase zu einer Phosphorylierung der Aux/IAA-Proteine führen und sie dadurch dem Ubiquitin-abhängigen Abbau im Proteasom preisgeben. Sie würden als Repressor wegfallen. Paradoxerweise würde Auxin also zu einer gesteigerten Transkription der *Aux/IAA*-Gene führen, aber gleichzeitig die Aux/IAA-Proteinkonzentration durch Instabilisierung senken. Ein solches System bietet den Vorteil, dass es sowohl sehr schnell angeschaltet als auch sehr schnell wieder herunter reguliert werden kann. Andere Auxin-induzierbare Gene mit einem AuxRE im Promotor, auch solche der ersten Auxinantwort, könnten durch den Abbau der Aux/IAA-Proteine ebenfalls angeschaltet werden. Zudem könnte dieses System direkt über die Aux/IAA-Genprodukte reguliert werden oder aber über das Ubiquitinierungs- und Abbausystem, wie die Mutante *axr1* zeigte (siehe oben).

Aux/IAA-Proteine konnten *in vitro* auch durch Phytochrom A phosphoryliert werden (COLÓN-CARMONA *et al.*, 2000), somit könnte auch Licht den Abbau der Aux/IAA-Proteine durch Phosphorylierung beeinflussen.

Phytochrom A könnte die *Aux/IAA*-Gene daneben über ein weiteres Promotorelement der *Aux/IAA*-Gene beeinflussen, das D1-Element (NAGAO *et al.*, 1993). Erst kürzlich konnte GmGT-2 identifiziert werden, ein Transkriptionsfaktor der GT-2-Familie, der an das D1-Element des Soja-*Aux/IAA*-Gens *Aux28* bindet. GmGT-2 wird möglicherweise Phytochrom-abhängig in Licht herunter reguliert. Mit dem lichtabhängigen Verschwinden der *GmGT-2*-Transkripte korreliert das Verschwinden der *Aux28*-Transkripte (O'GRADY *et al.*, 2001).

Das Flavoprotein NPH1 („nonphototropic hypocotyl“), das als für den Phototropismus verantwortlicher Photorezeptor diskutiert wird, hat eine Licht regulierte Kinaseaktivität (CHRISTIE *et al.*, 1998). Eine Phosphorylierung von Aux/IAA-Proteinen durch NPH1 konnte allerdings noch nicht gezeigt werden. Auch die Entdeckung, dass eine in IAA19 defekte Mutante *msg2* („massugu“) nur schwach auf laterales Licht reagiert, spricht für eine wichtige Rolle der Aux/IAA-Gene im Phototropismus (REED, 2001).

Andererseits gibt es auch Hinweise, dass Licht zu einer Stabilisierung von Aux/IAA-Proteinen führen könnte. So entwickeln Keimlinge, die in einer Domäne II mutiert sind (*axr2-1*, *axr3-1*, *shy2-1* und *shy2-2*) und die dadurch ein stabilisiertes Aux/IAA-Protein exprimieren, auch im Dunkeln Blätter (NAGPAL *et al.*, 2000; KIM *et al.*, 1996; KIM *et al.*, 1998a; REED *et al.*, 1998). Desweiteren könnten Aux/IAA-Proteine über die am schnellen Abbau beteiligten Faktoren lichtabhängig reguliert werden. So scheint COP9, ein Multiproteinkomplex, der die Photomorphogenese negativ reguliert, mit SCF<sup>TIR1</sup> zu interagieren und damit PSIAA6 zu destabilisieren (SCHWECHHEIMER *et al.*, 2001).

Die oben erwähnte lichtabhängige Regulation des *GH3*-Gens könnte durch die Aux/IAA-Proteine vermittelt werden. Auch *GH3* besitzt wie alle schnell Auxin-induzierbaren Gene, mit Ausnahme der *GST*-Familie, ein AuxRE-Promotorelement.

Die vielen Möglichkeiten zur Dimerisierung der Aux/IAA-Proteine und der ARF-Proteine, ihre unterschiedlichen, sich aber teilweise überlappenden Expressionsmuster, die unterschiedlichen inhibitorischen oder aktivierenden Wirkungen und die negative Feedback-Regulation bilden ein komplexes Netz, das zur Integration vieler verschiedener Faktoren fähig ist und so eine komplexe, organ- und gewebsspezifische Regulation ermöglicht. Reguliert werden könnten über dieses Netzwerk alle Gene, die ein AuxRE-Element in ihrem Promotor tragen, obwohl eine Bindung von ARF-Proteinen an Promotorelemente außerhalb der *Aux/IAA*-Familie noch nicht gezeigt wurde. Solche Gene könnten für Transkriptionsfaktoren

kodieren, die weitere Gene aktivieren, welche schließlich eine Zellwandrelexation vermitteln. Die *SAUR*-Gene zeigen viele Charakteristika, die für solche Transkriptionsfaktoren zu fordern wären.

### 2.6.5 Die *SAUR*-Genfamilie

Die letzte Gruppe der schnell Auxin-induzierten Gene – die Gruppe der *SAUR*-Gene („small auxin up RNA“) – bildet eine ähnlich große Genfamilie wie die *Aux/IAA*-Familie. Im *Arabidopsis*-Genom konnten über 30 putative *SAUR*-Gene detektiert werden. Die ersten *SAUR*-Transkripte wurden im Hypokotyl von *Glycine max* detektiert, wo sie sich nach Inkubation mit exogenem Auxin bereits nach 2,5 Minuten anhäufen. Sie gehören damit zu den am schnellsten induzierbaren Genen. In *Glycine max* sind fünf identifizierte *SAUR*-Gene in einem Cluster von 7 kb in jeweils alternierender Orientierung angeordnet; sie werden nicht durch Introns unterbrochen (McCLURE *et al.*, 1989). Daneben wurden die *SAUR*-Gene bisher auch in *Vigna radiata* (YAMAMOTO *et al.*, 1992), *Pisum sativum* (GUILFOYLE *et al.*, 1993), *Nicotiana tabacum* (ROUX *et al.*, 1998), *Malus domestica* (WATILLON *et al.*, 1998), *Raphanus sativus* (ANAI *et al.*, 1998) und *Zea mays* (ROHRMEIER 1995; YANG & POOVAIAH, 2000) gefunden. Die meist nur 0,5 kb großen *SAUR*-Gene kodieren für sehr kleine, lösliche Proteine von 9-10 kDa (ABEL & THEOLOGIS, 1996) – in Mais bis 16,6 kDa (YANG & POOVAIAH, 2000). Ein Vergleich verschiedener *SAUR*-Sequenzen zeigt die Homologie der einzelnen Mitglieder zueinander (Abb. 2-2). Im mittleren Bereich (in Abb. 2-2 mit Sternen markiert, umfasst 38 Aminosäuren von Arg<sup>57</sup> bis Cys<sup>94</sup> in *ZmAUX2*) beträgt die Gesamtidentität der verglichenen Sequenzen 82 %, über die gesamten Sequenzen sind es 39 %.

*SAUR*-Gene zeigen den *Aux/IAA*-Genen ähnliche Expressionsmuster. Beide Familien sind vor allem in stark elongierenden Geweben exprimiert. Dabei unterscheiden sich die jeweils spezifischen Expressionsmuster der einzelnen Mitglieder einer Familie, überlappen aber auch stark. Beide Familien scheinen an tropischen Reaktionen beteiligt zu sein. So häufen sich *Aux/IAA*-Transkripte wie auch *SAUR*-Transkripte in der unteren, stärker elongierenden Flanke des *Arabidopsis*- bzw. Soja-Hypokotyls während einer gravitropen Krümmung an (WYATT *et al.*, 1993; McCLURE & GUILFOYLE, 1989). Weiter zeigen sowohl Mutanten, die in einem *Aux/IAA*-Gen (z.B. *axr2*) defekt sind, als auch solche, die eine veränderte *Aux/IAA*-Expression (z.B. *axr1*; ABEL *et al.*, 1995b) aufweisen, eine veränderte Expression von *SAUR*-Genen (TIMPTE *et al.*, 1994; TIMPTE *et al.*, 1995), was ebenfalls auf einen engen Zusammenhang der beiden Familien hinweist.

Dieser Zusammenhang könnte natürlich durch die AuxREs, die sowohl in *Aux/IAA*-Promotoren als auch in den Promotorbereichen der *SAUR*-Gene vorhanden sind, vermittelt werden (siehe oben). Es ist anzunehmen, dass ARFs auch an die AuxREs der *SAUR*-Gene binden, und dass diese Bindung von *Aux/IAA*-Proteinen beeinflusst werden kann. Ob die *SAUR*-Gene jedoch auf die *Aux/IAA*-Gene wirken können, ist noch unbekannt.

Ein weiteres Promotorelement, das in *Aux/IAA*- wie auch in *SAUR*-Genen zu finden ist, ist das D1-Element (NAGAO *et al.*, 1993). Über dieses könnten die *Aux/IAA*-Gene wie auch die *SAUR*-Gene ein Phytochrom-Signal erhalten, und so auf veränderte Lichtbedingungen reagieren (siehe oben).

Die bisher innerhalb der schnell Auxin-regulierten Gene nur für *SAUR*-Gene gezeigte Calmodulinbindung (YANG & POOVAIAH, 2000) könnte ein weiteres Regulationselement darstellen (siehe oben).

ZmAUX2p	.....MINAKKIAHLAKKWQRMACI	RRRCLTLGA	29			
GmSAUR-6B	.....	MGFRLPGIRK.A	11			
GmSAUR-10A5	.....	MGFRIAGIVRRT	12			
GmSAUR-15A	.....	MGFRLPGIRK.A	11			
GmSAUR-X10A	.....	MGFRLPGIRK.T	11			
VrSAUR-ARG7	.....	MGFRLPGIRK.T	11			
AtSAUR-AC1	.....	MAFLRSF	7			
ZmSAUR1	MEEYQQVHQQQQQGGGRGSNKIRDIVRLQQ	LLKKWKKLAT	40			
Consensus		MGFRLPGIRK T				
ZmAUX2p	ASANGADECCSSVAR	KGHC	AVYTADGA....	RFEVPLACL	65	
GmSAUR-6B	SFSANQ	ASSKAVDVEKGYL	AVYVGEKM...	RRFVIPVSYL	48	
GmSAUR-10A5	SFYTTQ	AASKRVDV	PKGYAAVYVGDKM...	RRFTIPVSYL	49	
GmSAUR-15A	.....	SKAADAPKGYL	AVYVGEKL...	KRFVIPVSYL	40	
GmSAUR-X10A	SI	AANQASSKSV	EVVPGYLVVYVGDKM...	RRFLIPVSYL	48	
VrSAUR-ARG7	LS	ARNEASSKVL	DAPKGYLAVYVGENM...	KRFVIPVSHL	48	
AtSAUR-AC1	LG	AKQII	RRSSSTPRGFMAVYVGEN	DQKKRYVVPVSYL	47	
ZmSAUR1	VT	PSAASSGGRSSV	PRGSFAVYVGEEM...	RRFVIPTEYL	77	
Consensus	A	ASSK	DVPKGYLAVYVGEKM	RRFVIPVSYL		
ZmAUX2p	ST	PVFE	LLQMS	EEEEFGFAGGDGRITL	PCDAAVMEYALCL	105
GmSAUR-6B	NK	PSFQ	DLLSQ	AAAAEFGYHHPNGGLT	IPCSEDFVQHITSF	88
GmSAUR-10A5	NE	PSFQ	ELLSQ	AAAAEFGYDHPMGLT	IPCKEEF LNVT	TAH
GmSAUR-15A	NQ	PSFQ	DLLSQ	AAAAEFGYDHPMGLT	IPCSEDFVQCITSC	80
GmSAUR-X10A	NQ	PSFQ	DLLNQ	AAAAEFGYDHPMGLT	IPCKEDEF	FLTVTSH
VrSAUR-ARG7	NQ	PLFQ	DLLSQ	AAAAEFGYDHPMGLT	IPCSEDLFQHITS	88
AtSAUR-AC1	NQ	PLFQ	QLLSK	EEEEFGYDHPMGLT	IPCHESLFFTVTSQ	87
ZmSAUR1	GH	WAFADLL	REAAAAEFGFR	HEGALR.	IPCDVDSFQGI	LRL
Consensus	NQ	PSFQ	DLLSQ	AAAAEFGYDHPMGLT	IPC ED FQ ITS	
ZmAUX2p	L	RRGASAELEQ	AFLSTMAISCHCASHL	LAPYVGATQQIA		143
GmSAUR-6B	LN					90
GmSAUR-10A5	LNEL					93
GmSAUR-15A	LN					82
GmSAUR-X10A	LNDL					92
VrSAUR-ARG7	LSAQ					92
AtSAUR-AC1	IQ					89
ZmSAUR1	V	QQGQGGRRNEPAAMCD	CDSCS	SETEILCR		147
Consensus	LN					

**Abb. 2-2 Sequenzvergleich der SAUR-Genprodukte**

Berücksichtigt wurden Sequenzen aus *Glycine max* (Gm) (McCLURE *et al.*, 1989), *Vigna radiata* (Vr) (YAMAMOTO *et al.*, 1992), *Arabidopsis thaliana* (At) (GIL *et al.*, 1994) und *Zea mays* (Zm) (ROHRMEIER, 1995; YANG & POOVAIAH, 2000). Homologielevel 100 %: rot; > 75 %: blau; > 50 %: grün.

Eine weitere Besonderheit der SAUR-Gene ist ein DST-Element („down stream“), das im 3' nicht-translatierten Bereich zu finden ist. Es wird für die Kurzlebigkeit der Transkripte verantwortlich gemacht. Mit Halbwertszeiten von zehn Minuten gehören die SAUR-mRNAs zu den instabilsten Transkripten, die in Pflanzen gefunden wurden (McCLURE & GUILFOYLE, 1989; FRANCO *et al.*, 1990). Eine solche Instabilität ist wichtig für Faktoren, die an schnellen transienten Regulationen beteiligt sind. Im Gegensatz dazu haben Aux/IAA-Transkripte eine verhältnismäßig lange Halbwertszeit von 60 bis 75 Minuten (KOSHIBA *et al.*, 1995). Das DST-Element kann Kurzlebigkeit auf Reportergene übertragen (GIL & GREEN, 1996). Kürzlich konnten zwei Mutanten, *dst1* und *dst2*, charakterisiert werden, die im DST-vermittelten Abbau defekt sind. Es konnte nachgewiesen werden, dass solche Mutanten erhöhte Mengen an SAUR-AC1-mRNA aufweisen, allerdings zeigten diese Pflanzen keinen abnormen Phänotyp (JOHNSON *et al.*, 2000).

Die Kurzlebigkeit der *SAUR*-Transkripte scheint allerdings nicht ausschließlich durch das DST-Element vermittelt zu werden. Auch der offene Leserahmen scheint zu einer Destabilisierung beizutragen. In transgenen Tabakpflanzen, die ein Konstrukt mit der kodierenden Sequenz des *SAUR-6B*-Gens aus Soja unter der Kontrolle eines *CaMV 35S*-Promotors trugen, kam es nach Cycloheximid-Inkubation zu einer Anhäufung von *SAUR*-mRNA (LI *et al.*, 1994b). Dies wurde mit einem labilen Faktor, einer RNase, erklärt, die *SAUR*-mRNA erkennt. Nach der Ausdünnung eines solchen Faktors bei gehemmter Proteinbiosynthese würde die *SAUR*-Transkriptmenge zunehmen. Wie bereits erwähnt, könnte auch ein Transkriptionsarrest bei veränderter Translation eine solche Anhäufung erklären (KOSHIBA *et al.*, 1995). Interessanterweise konnten LI *et al.* (1994b) keine Induktion der Transkription durch Cycloheximid feststellen, wenn sie ein Konstrukt mit einem *SAUR*-Promotor (*SAUR-6B* bzw. *SAUR-15A*) vor einem *GUS*-Reportergen in Tabak einbrachten, was gegen einen kurzlebigen Repressor, wie ihn die *Aux/IAA*-Gene kodieren könnten, sprechen würde. GIL und GREEN (1996) jedoch konnten eine solche Zunahme der Transkriptmenge nach Cycloheximid messen. Sie verwendeten den *SAUR-AC1*-Promotor, der ebenfalls vor das *GUS*-Gen kloniert worden war. Weiter konnte inzwischen gezeigt werden, dass in der *axr3*-Mutante, in der IAA17 stabilisiert vorliegt (RAMOS *et al.*, 2001), *SAUR-AC1* durch Auxin verstärkt induziert wird (LEYSER *et al.*, 1996). Bestimmte *SAUR*-Gene könnten also spezifisch von bestimmten Aux/IAA-Genprodukten kontrolliert werden.

Mit Antikörpern, die gegen rekombinantes SAUR-Protein hergestellt wurden, konnte bisher kein SAUR-Protein *in vivo* nachgewiesen werden, was für eine kurze Halbwertszeit auch der SAUR-Proteine spricht (GUILFOYLE, 1999).

In unserer Arbeitsgruppe konnten zwei Gene der *SAUR*-Verwandtschaft aus Mais kloniert werden (ROHRMEIER, 1995). Mit cDNA-Sonden aus mit Auxin induzierten bzw. an Auxin verarmten Maiskoleoptilen wurde eine cDNA-Bank, die aus Auxin-induzierten Maiskoleoptilen gewonnen war, differentiell hybridisiert. Es konnten zwei Sequenzen mit offenen Leserahmen kloniert werden, *ZmAUX2* und *ZmAUX8*, die in ihrer Basenabfolge zu 91 % identisch sind; sie können deshalb in Northernblotanalysen nicht voneinander unterschieden werden. Auch in ihrer Proteinsequenz sind sich die beiden mit einer Gesamtidentität von 88 % und einer Ähnlichkeit von 91 % sehr ähnlich. *ZmAUX2* kodiert mit 435 Basenpaaren (bp) für ein aus 144 Aminosäuren bestehendes Protein von 15,3 kDa mit einem berechneten isoelektrischen Punkt von pH 7,3. Bei *ZmAUX8* sind es 459 bp, die für ein 16,4 kDa Protein aus 152 Aminosäuren mit einem isoelektrischen Punkt von pH 7,8 kodieren. Sie sind somit etwas größer als die aus dikotylen Pflanzen isolierten *SAUR*-Gene. Auch *ZmSAUR1*, das einzige weitere aus monokotylen Pflanzen isolierte Gen der *SAUR*-Verwandtschaft, ist mit 147 Aminosäuren und 16,6 kDa etwas größer als die übrige *SAUR*-Verwandtschaft. Die Gesamtidentitätswerte zu den *SAUR*-Genen liegt auf Proteinebene zwischen 30 % und 40 %, im mittleren, konservierten Bereich (Arg<sup>57</sup> bis Cys<sup>94</sup>, in Abb. 2-2 mit Sternen markiert) zwischen 40 % und 50 %. Damit sind die Werte nicht sehr hoch. Allerdings sind die stark konservierten Aminosäuren, insbesondere geladene und hydrophobe, aber auch Helixbrechende wie Prolin, auch in den *ZmAUX*-Genprodukten zu finden, so dass auf eine ähnliche Sekundärstruktur geschlossen werden kann, was auch durch Strukturvorhersagen bestätigt wurde. Die Ähnlichkeit zu *ZmSAUR1* fällt jeweils am geringsten aus, auch wenn beispielsweise bei *ZmSAUR1* das Tyrosin im stark konservierten Motiv EEEFGY wie bei den *ZmAUX*-Genprodukten durch ein Phenylalanin ersetzt ist und damit eine Besonderheit

für Mais darstellt. Auch ein *SAUR*-typisches DST-Element konnte im 3' nichttranslatierten Bereich der *ZmAUX*-Gene identifiziert werden.

Die Durchsuchung einer genomischen Mais-Genbank führte zur Isolierung einer Sequenz, die zu 97 % mit der *ZmAUX2*-cDNA identisch ist, und dessen offener Leserahmen für ein Protein kodiert, das eine Identität von 92 % zeigt. Die Unterschiede, die sich in 17 Nukleotid- mit daraus folgenden 11 Aminosäureaustauschen manifestieren, könnten durch die Verwendung verschiedener Maiszuchtlinien bei der Herstellung der Banken begründet sein. Sie betreffen weder die konservierten Regionen der kodierenden Sequenz, noch das DST-Element, noch ein zweigeteiltes Kernlokalisationssignal, das auch in anderen *SAUR*-Genen gefunden werden kann (ROHRMEIER, 1995; YANG & POOVAIAH, 2000). Im Promotorbereich des genomischen *ZmAUX2* wurden AuxRE-Elemente, ähnlich denen der *SAUR*-Gene, gefunden. Auch ein DUE/NDE-Element, das zusammen mit den AuxRE-Elementen wohl die Auxin-induzierbarkeit der *SAUR*-Gene vermittelt und für das eine Bindung von Kernproteinen in „gel mobility shift assays“ nachgewiesen werden konnte (LI *et al.*, 1994a), wurde im *ZmAUX2*-Promotor gefunden. Ebenso kann ein D1-Element identifiziert werden (Abb. 2-3). Auch der Promotor zeigt demnach die typischen Eigenschaften der *SAUR*-Gene.

GmAUX28-D1 : (-664) CATCT . **ACAGTTACT**AGCTAGT  
 ZmAUX2-D1 : (-545) TATCT**GACAGTTCCTC**GACAGC

**Abb. 2-3: Sequenzvergleich D1-Element von *GmAUX28* und *ZmAUX2***

Das zentrale D1-Motiv ist fett dargestellt. Auch in *AtAUX2-27* ist im zentralen Motiv das A durch ein C ersetzt (NAGAO *et al.*, 1993). *GmAUX28-D1* nach O'GRADY *et al.*, 2001.

Induziert werden konnten die *ZmAUX*-Gene in Maiskoleoptilsegmenten bisher nur durch biologisch aktive Auxine (IAA, NAA und 2,4-D) und Cycloheximid, nicht jedoch durch das biologisch inaktive Auxinanalogen 3,5-D, nicht durch Kinetin oder Abscisinsäure. Die Auxin-induktion ist sehr schnell. Bereits zehn Minuten nach Zugabe von Auxin zu an Auxin verarmten Maiskoleoptilsegmenten konnte eine höhere *ZmAUX*-Transkriptmenge nachgewiesen werden als in einer *in situ* Probe (ROHRMEIER, 1995). Das Wiedererscheinen des *ZmAUX*-Signals in der Northernanalyse findet demnach deutlich vor dem Einsetzen der Zellelongation statt, das eine Latenzzeit von etwa 16 Minuten hat (BERGFELD *et al.*, 1988). Die *ZmAUX*-Transkriptmenge steigt bis 20 Minuten nach Auxingabe stark an und nimmt auch danach noch etwas zu.

Detektiert wurden *ZmAUX*-Transkripte bisher nur in der Koleoptile, nicht aber im Primärblatt oder in der Wurzel.

In *E. coli* konnte ein rekombinantes Fusionsprotein aus Maltosebindeprotein und *ZmAUX2*-Protein exprimiert werden. Antikörper gegen dieses Fusionsprotein konnten aus Kaninchen gewonnen werden. Ein Nachweis der *ZmAUX*-Proteine in Mais gelang damit bisher allerdings nicht, was eine sehr kurze Halbwertszeit des *ZmAUX2*-Genproduktes vermuten ließ.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, das *ZmAUX2*-Genprodukt *in vivo* nachzuweisen und seine Halbwertszeit zu bestimmen. In Northernblot-Analysen sollte die *ZmAUX2*-Induktion und Expression näher untersucht werden. Der weiteren Charakterisierung der Expression sollten Promotor-GUS-Fusionen dienen. Über die Funktion des *ZmAUX2*-Proteins sollten schließlich Mutanten, deren endogenes *ZmAUX2*-Gen disruptiert wurde und transgene Pflanzen, die *ZmAUX2* überexprimieren sollten, Aufschluss geben.

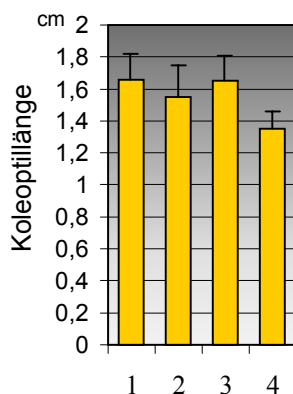
## 3. Ergebnisse

### 3.1 Spezifische Induktion von *ZmAUX2* durch Auxin

Das im Zentrum dieser Arbeit stehende *ZmAUX2*-Gen wird nach exogener Auxingabe in elongierenden Maiskoleoptilen transkribiert. In Northernblot-Analysen konnte gezeigt werden, dass *ZmAUX2* durch die Auxine IAA, NAA (Naphtyl-1-Essigsäure) und 2,4-D (2,4-Dichlorphenoxyessigsäure) spezifisch induziert wird. Durch Kinetin (ein Cytokinin), ABA (Abscisinsäure) und 3,5-D (3,5,-Dichlorphenoxyessigsäure), ein physiologisch inaktives Strukturanalogon zu 2,4-D, konnte jedoch keine Erhöhung der *ZmAUX*-Transkriptmenge erzielt werden (ROHRMEIER, 1995).

#### 3.1.1 Einfluss von Brassinolid

In Wachstumstests, die ursprünglich zur Untersuchung der Auxinwirkung entwickelt wurden, zeigen die erst 1979 identifizierten Brassinosteroide eine dem Auxin ähnliche, die Zell-elongation fördernde Wirkung (GROVE *et al.*, 1979). Auch Mais-Mesokotyl-Segmente reagieren auf Brassinolidgabe mit Elongation (YOPP *et al.*, 1981). Es lag deshalb nahe die Brassinolidwirkung auch im Biotest der Koleoptile auf Auxinwirkung zu untersuchen. So wurden subapikale 1 cm lange Maiskoleoptilsegmente 20 h in Brassinolid- bzw. IAA-Lösungen inkubiert (5.2.1.3). Als Negativkontrolle diente eine Methanol-Lösung, da Brassinolid in Methanol gelöst war. Brassinolid führte tatsächlich zu einer Elongation der Koleoptilsegmente, die der durch Auxin hervorgerufenen vergleichbar war (Abb. 3-1). Unterzieht man die Werte einem nichtparametrischen Test (Mann Whitney Test, 5.1.5) unterscheiden sich die Induktionen durch Brassinolid und Auxin nicht signifikant voneinander. (Im Vergleich 0,2  $\mu\text{M}$  Brassinolid mit 10  $\mu\text{M}$  IAA ergab sich  $P = 0,9873$ ). Der Unterschied zu der Kontrolle ist jedoch signifikant. (Im Vergleich 0,2  $\mu\text{M}$  Brassinolid mit der Kontrolle ergab sich  $P < 0,0001$ ).

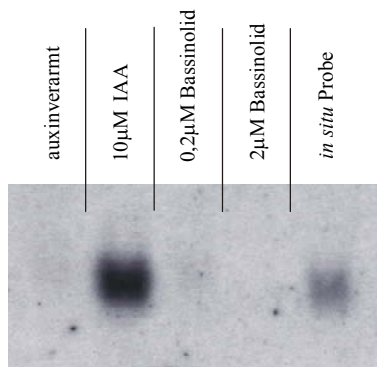


**Abb. 3-1 Brassinolid wirkt auf die Koleoptilelongation**  
 Je 12 bzw. 13 subapikale 1 cm lange Maiskoleoptilsegmente wurden für 20 h mit 0,2  $\mu\text{M}$  Brassinolid (1), 2  $\mu\text{M}$  Brassinolid (2), 10  $\mu\text{M}$  IAA (3), 0,05% Methanol (4) als Negativkontrolle, inkubiert und anschließend vermessen.

Während mit Auxin jedoch bereits nach etwa 4 h ein Effekt zu beobachten war, konnte Brassinolid in einer Konzentration von 0,2  $\mu\text{M}$  die Auxinwirkung erst nach der Inkubation von 20 h vollständig imitieren (Abb. 3-1). Dieser Effekt des Brassinolid wurde jedoch nicht weiter verfolgt.

Stattdessen wurde untersucht, ob Brassinolid, ähnlich wie Auxin, zu einer schnellen Induktion der *ZmAUX*-Gene führt. Zur Hormoninkubation wurden subapikale Maiskoleoptilsegmente (5.2.1.1, 5.2.1.2) in Subpopulationen zu je 40 Stück aufgeteilt. Eine *in situ* Probe, die die *ZmAUX2*-Transkriptmenge in sich elongierenden Koleoptilen ohne exogene Einwirkung festhalten sollte, wurde sofort in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Eine Subpopulation wurde in 0,2 µM Brassinolid, eine in 2 µM Brassinolid, eine in 10 µM IAA als Positivkontrolle und eine zur Auxinverarmung nur in Wasser 100 min lang inkubiert. Danach wurde aus den geernteten Koleoptilen Gesamt-RNA isoliert (5.2.2.1). Die Ausbeute betrug dabei zwischen 100 und 200 µg.

Die anschließende Northernblot-Analyse (5.2.2.4) mit einer *ZmAUX2*-Sonde zeigte deutlich die durch IAA-Inkubation stark erhöhte Menge an *ZmAUX*-mRNA; der *in situ*-Pegel war im Vergleich dazu gering. In den mit Brassinolid inkubierten Koleoptilsegmenten konnte, wie auch in der Negativkontrolle, keine *ZmAUX*-mRNA nachgewiesen werden (Abb. 3-2).

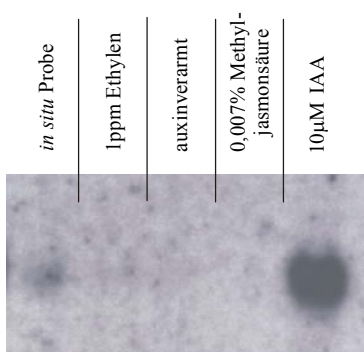


**Abb. 3-2: Spezifität der Induktion der *ZmAUX*-Gene, Test auf Brassinolid**

Subapikale Maiskoleoptilsegmente wurden mit Brassinolid bzw. IAA inkubiert. Eine Northern-Analyse schloss sich an. Auf das 1,4 % Agarose-Gel wurden je 50 µg Gesamt-RNA pro Spur aufgetragen, und mit dem *ZmAUX2*-Gen als Sonde hybridisiert.

### 3.1.2 Ethylen und Methyljasmonsäure induzieren *ZmAUX2* nicht

Auch Ethylen und Methyljasmonat regulieren das Pflanzenwachstum und haben teilweise dem Auxin ähnliche Wirkungen. So wird die Adventivwurzelbildung sowohl durch Auxin als auch durch Ethylen stimuliert. Die Sprosselongation wird bei den meisten Pflanzen durch Ethylen zwar gehemmt, bei Reis jedoch hat Ethylen eine steigernde, also zum Auxineffekt parallele Wirkung (KIEBER & ECKER 1993). Auch Methyljasmonsäure scheint ebenso wie Auxin eine Rolle bei der Reaktion auf Verwundungen (KODA & KIKUTA, 1994) und bei der Zellexpansion (TAKAHASHI *et al.* 1994) zu spielen. Eine Induktion der *ZmAUX*-Gene durch Ethylen und Methyljasmonsäure konnte in weiteren Northernblot-Analysen aber nicht nachgewiesen werden (Abb. 3-3).



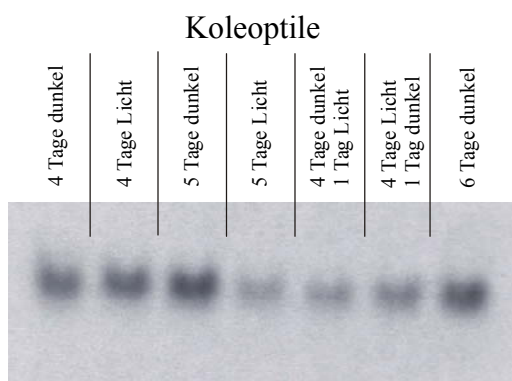
**Abb. 3-3: Spezifität der Induktion der *ZmAUX*-Gene; Test auf Ethylen und Methyljasmonsäure**

Subapikale Maiskoleoptilsegmente wurden mit Ethylen, Methyljasmonsäure bzw. IAA inkubiert. Eine Northern-Analyse schloss sich an. Auf das 1,4 % Agarose-Gel wurden je 50 µg Gesamt-RNA pro Spur aufgetragen, und mit dem *ZmAUX2*-Gen als Sonde hybridisiert.

Für eine schnelle Induktion durch andere Pflanzenhormone als Auxine gibt es also keine Anhaltspunkte.

### 3.2 Korrelation der *ZmAUX2*-Transkriptmenge mit der Koleoptil- bzw. Mesokotylelongation im Licht bzw. im Dunkeln

Die *ZmAUX2*-Expression scheint für die Elongation wichtig zu sein. Licht hat einen negativen Effekt auf die Elongation und verhindert in der Koleoptile das Etiolement. In Northernblot-Analysen wurde deshalb getestet, ob die endogene *ZmAUX2*-RNA-Konzentration durch Licht niedrig gehalten wird. Dazu wurde Mais parallel im Licht und im Dunkeln angezogen, und nach vier, fünf bzw. sechs Tagen wurden die Koleoptilen geerntet und fixiert. Zudem wurden Sämlinge zunächst vier Tage im Licht und danach noch einen weiteren Tag im Dunkeln angezogen bzw. zunächst vier Tage im Dunkeln und anschließend einen Tag im Licht. Aus den Koleoptilen wurde Gesamt-RNA isoliert, jeweils 50 µg auf ein RNA-Gel aufgetragen und im Northernblot analysiert.



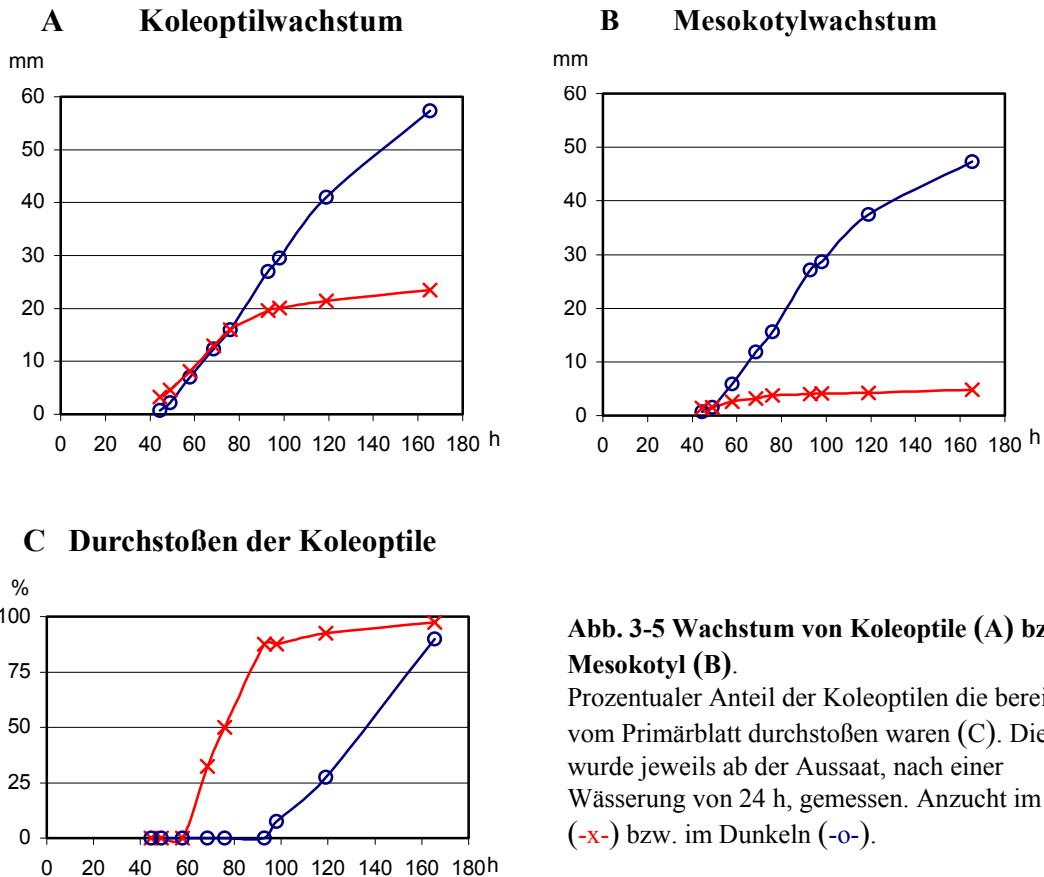
**Abb. 3-4 *ZmAUX2*-Transkription der Koleoptile nach Anzucht im Licht bzw. im Dunkeln**

Koleoptilsegmente wurden wie angegeben angezogen und geerntet; es wurde Gesamt-RNA isoliert und im Northernblot mit einer *ZmAUX2*-Sonde analysiert.

In vier Tage alten Koleoptilen konnte, unabhängig ob im Licht oder im Dunkeln gezogen, ein starkes *ZmAUX2*-Signal detektiert werden. Bei den im Dunkeln gezogenen Koleoptilen nahm die Transkriptmenge vom vierten zum fünften Tag noch zu und blieb auch am sechsten Tag im Dunkeln hoch. In den im Licht gezogenen Koleoptilen nahm die Stärke des Signals jedoch zwischen dem vierten und fünften Tag ab. Von den drei Subpopulationen fünf Tage alter Koleoptilen, die wenigstens teilweise im Licht gezogen wurden (Abb. 3-4, Spuren 4-6), konnte in der zuletzt einen Tag im Dunkeln gehaltenen (Spur 6) noch die höchste Transkriptmenge nachgewiesen werden.

#### 3.2.1 Abhängigkeit der Elongation von den Lichtverhältnissen

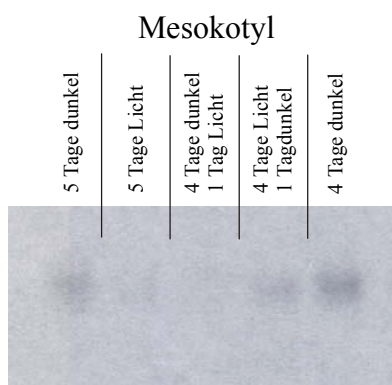
Wie in Abb. 3-5 gezeigt, erfolgte bis zum vierten Tage eine Elongation unabhängig von der Belichtung mit derselben Geschwindigkeit. Im Dunkeln elongierten die Koleoptilen danach weiter; im Licht stellten sie ihr Wachstum ein und wurden vom Primärblatt durchstoßen, was im Dunkeln erst nach sechs Tagen stattfand. Bis zum vierten Tag schien die Elongation also endogen, unabhängig von Licht gesteuert zu sein, danach exogen durch Licht. Die *ZmAUX2*-Transkriptmengen korrelieren somit gut mit der Elongation der Koleoptile, sie sind ebenso bis zum vierten Tag unabhängig von Licht hoch, nehmen dann im Licht ab, bleiben aber im Dunkeln hoch.



**Abb. 3-5 Wachstum von Koleoptile (A) bzw. Mesokotyl (B).** Prozentualer Anteil der Koleoptilen die bereits vom Primärblatt durchstoßen waren (C). Die Zeit wurde jeweils ab der Aussaat, nach einer Wässerung von 24 h, gemessen. Anzucht im Licht (-x-) bzw. im Dunkeln (-o-).

3.2.2 *ZmAUX2* wird im Mesokotyl transkribiert

Bei der Aufzucht fiel auf, dass das Mesokotyl, also des Abschnittes unterhalb der Koleoptile, ebenfalls im Dunkeln stark elongierte. Im Licht wurde dagegen fast kein Mesokotyl gebildet (Abb. 3-6).



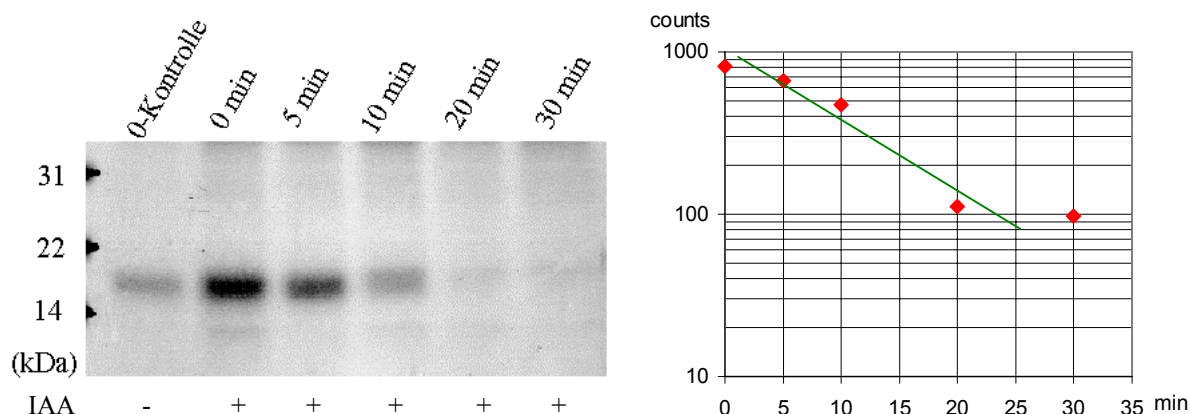
**Abb. 3-6 Northernblot-Analyse des Mesokotyls nach Anzucht im Licht bzw. im Dunkeln.** Mesokotylsegmente wurden wie angegeben angezogen und geerntet; es wurde Gesamt-RNA isoliert und im Northernblot analysiert

In der Northernblot-Analyse zeigte sich, dass auch im Mesokotyl eine *ZmAUX*-Transkription nachgewiesen werden kann. Bisher war *ZmAUX*-RNA nur in der Koleoptile detektiert worden (ROHRMEIER, 1995). Die *ZmAUX*-Transkriptmenge war bei den im Dunkeln gewachsenen Pflanzen am höchsten, was wiederum mit der Elongation des Mesokotyls gut korrelierte (Abb. 3-6). Wie in der Northernblot-Analyse der Koleoptilen-RNA konnte auch bei den fünf Tage alten Mesokotylsubpopulationen, die teilweise im Licht gewachsen waren (Spur 2-4), das stärkste Signal in der Population, die zuletzt im Dunkeln war (Spur 4), detektiert werden.

### 3.3 Halbwertszeit des ZmAUX2-Genproduktes

Bisher war es nicht gelungen ein SAUR-Protein *in vivo* nachzuweisen. So war auch die Halbwertszeit von SAUR-Proteinen nicht bekannt. Es gelang im Rahmen dieser Arbeit ein ZmAUX-Genprodukt durch eine *in vivo* Markierung und anschließender Immunpräzipitation nachzuweisen. Ein rascher, effektiver Aufschluss, wie er mit NaOH erreicht werden konnte, und eine gute Aufreinigung des Antikörpers erwiesen sich hierbei als entscheidend. Dies wies auf eine sehr kurze Halbwertszeit des ZmAUX2-Genproduktes hin, wie sie auch für SAUR-Proteine bereits vermutet wurde (GUILFOYLE, 1999).

In einem „pulse-chase“-Experiment wurde die Halbwertszeit des ZmAUX2-Genproduktes bestimmt. Dazu wurden aufgeraute, subapikale Maiskoleoptilsegmente in Subpopulationen von je 20 Stück aufgeteilt und mit <sup>35</sup>S-Methionin-Cystein in 10 µM IAA für 1 h markiert. Eine Subpopulation wurde ohne Auxin inkubiert und diente als Nullkontrolle. Nach dem Waschen wurde diese Nullkontrolle und eine Auxin-induzierte Probe als Nullwert in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Die restlichen Segmente wurden gewaschen und mit nicht-radioaktivem Methionin-Cystein in 10 µM IAA weiter inkubiert und nach 5, 10, 20 bzw. 30 min gewaschen und tiefgefroren. Aus zellfreien Extrakten wurde mit einem affinitätsgereinigten Antikörper das ZmAUX2-Protein immunpräzipitiert und auf einem 17,5 % SDS-Gel aufgetrennt (5.2.3.1).



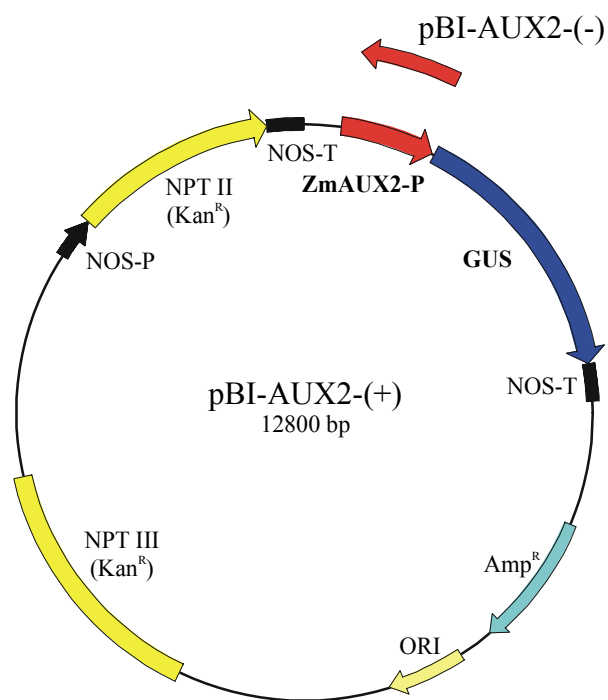
**Abb. 3-7 Autoradiogramm zur Halbwertszeit von ZmAUX2**

Subapikale Maiskoleoptilsegmente wurden Auxin induziert und 60 min lang mit <sup>35</sup>S Methionin/Cystein markiert. Die Koleoptilsegmente wurden dann für 5, 10, 20 und 30 min mit nicht radioaktivem Methionin/ Cystein an radioaktivem Substrat verarmt. Das ZmAUX2-Genprodukt wurde immunpräzipitiert und auf ein SDS-Gel aufgetragen. In einem Instant-Imager wurden die radioaktiven Zerfälle der einzelnen Banden gezählt und in logarithmischer Skala aufgetragen. Die grüne Gerade entspricht einer Halbwertszeit von 7 min.

Das Gel wurde Coomassie gefärbt, entfärbt, mit Amplify behandelt, getrocknet und autoradiografiert. Zur quantitativen Auswertung wurde das Gel im Instant-Imager gescannt und die gezählten radioaktiven Zerfälle, nach Abzug des Hintergrundes, logarithmisch aufgetragen. Der 30 min Wert verschwindet schon fast im Hintergrund, so dass in dieser Richtung die Kurve abflacht. Vernachlässigt man diese Abflachung, so ergibt sich eine Halbwertszeit von 7 min (grüne Gerade). Das ZmAUX2-Genprodukt ist also sehr kurzlebig und gehört mit den ebenfalls sehr labilen Aux/IAA-Genprodukten zu den kurzlebigsten eukaryotischen Proteinen.

### 3.4 GUS-Reportergenstudien in *Arabidopsis* und Tabak

In Northernblotanalysen konnte gezeigt werden, dass im Maiskeimling *ZmAUX2* nur in der Koleoptile und im Mesokotyl, nicht aber im Primärblatt oder in der Wurzel transkribiert wird. Zur weiteren Charakterisierung der Organ- und Gewebsspezifität des *ZmAUX2*-Gens wurde der Vektor pBI-AUX2-(+) konstruiert (Abb. 3-8). Dieser Vektor trägt das Reportergen *GUS*, welches für eine  $\beta$ -Glucuronidase kodiert, so hinter dem *ZmAUX2*-Promotor, dass das Reportergen *ZmAUX2*-spezifisch exprimiert werden sollte. Daneben wurde ein Vektor pBI-AUX2-(-) konstruiert, der sich von pBI-AUX2-(+) nur durch die Orientierung des *ZmAUX2*-Promotors unterscheidet, also keine Expression vermitteln und als Negativkontrolle dienen sollte.

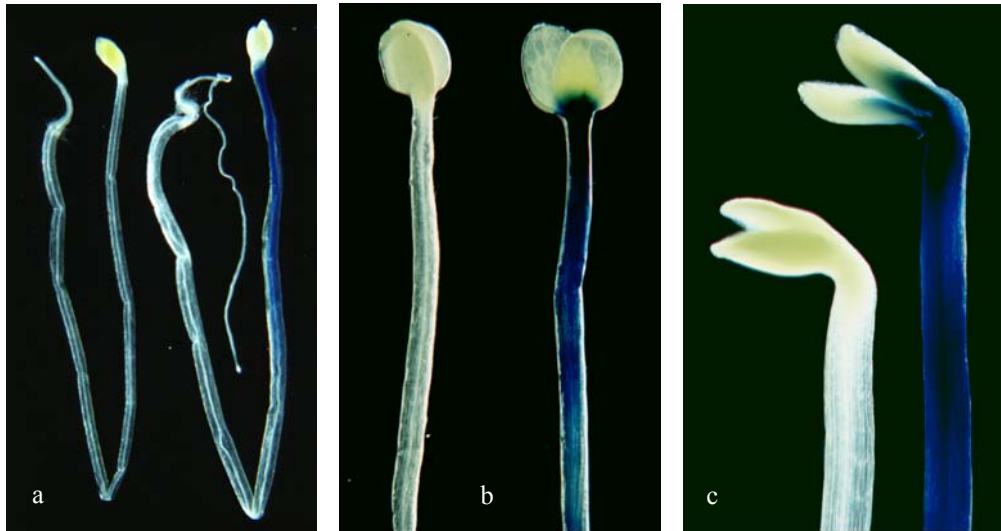


**Abb. 3-8 Vektor pBI-AUX2-(+) mit Reportergen GUS unter der Kontrolle des *ZmAUX2*-Promotors**  
*ZmAUX2*-P: *ZmAUX2*- Promotor  
 GUS:  $\beta$ -Glucuronidase  
 NOS-T: Nopalinsynthase-Terminator  
 NOS-P: Nopalinsynthase-Promotor  
 NPT II bzw III: Neomycinphosphotransferase vermittelt eine Kanamycinresistenz in Pflanze bzw. Bakterium  
 pBI-AUX2-(-) unterscheidet sich von pBI-AUX2-(+) nur durch die Orientierung des *ZmAUX2*-Promotors

Da eine Maistransformation in unserer Arbeitsgruppe nicht möglich war, wurden die Vektoren in *Nicotiana tabacum* und *Arabidopsis thaliana* eingebracht. Im Falle von Tabak wurden Blattstücke, bei *Arabidopsis* Wurzelabschnitte mit Agrobakterien, die das jeweilige Plasmid trugen, infiziert (5.2.4.2, 5.2.4.3, 5.2.4.4). Es konnten aus jeweils über 100 Transformanten ganze Pflanzen regeneriert, bis zur Fruchtreife angezogen und Samen geerntet werden. Regenerierte *Arabidopsis*-Pflanzen und die jeweiligen Nachkommen wurden mit A1, A2 etc. benannt, die Tabak-Pflanzen entsprechend T1, T2 etc.. Die Samen wurden bei 4°C zur Stratifikation gelagert und schließlich auf Selektionsmedium angezogen, auf dem nicht-transgene Keimlinge nicht wachsen können.

Keimlinge, die von verschiedenen unabhängigen Transformanten abstammten, wurden für sechs bzw. neun Tage im Licht oder im Dunkeln angezogen und auf GUS-Aktivität hin untersucht (5.2.1.6). Von 76 *Arabidopsis*-Sämlingen, die mit dem Kontrollplasmid pBI-AUX2-(-) transformiert worden waren, zeigte keiner eine Blaufärbung (Abb. 3-9 a, links pBI-AUX2-(-), rechts pBI-AUX2-(+)). Hingegen zeigten von 77 Pflänzchen, die den Vektor mit dem *ZmAUX2*-Promotor in richtiger Orientierung trugen, 43 % eine GUS-Aktivität (Tab. 3-1). Der

Anteil der gefärbten war bei den im Dunkeln gewachsenen und dadurch etiolierten Pflänzchen mit 56 % deutlich höher als bei den im Licht angezogenen *Arabidopsis*-Keimlingen, von denen nur 25 % eine GUS-Aktivität zeigten.



**Abb. 3-9 Der *ZmAUX2*-Promotor vermittelt eine GUS-Expression**

Transgene *Arabidopsis*- (a) und Tabak- (b, c) Keimlinge wurden 1 Woche im Dunkeln angezogen und auf GUS-Aktivität getestet. Links jeweils Kontrollpflanzen (A32, T14, T11) mit pBI221-AUX2(-), rechts mit pBI-AUX2-(+) transformierte Pflanzen (A1, T2, T4).

Dieses Expressionsmuster wiederholte sich bei den Tabaksämlingen. Auch von den 139 angezogenen Tabaksämlingen, die das Plasmid mit falsch orientiertem Promotor trugen, zeigte keiner eine GUS-Aktivität (Abb. 3-9 b und c, jeweils links pBI-AUX2(-) und rechts pBI-AUX2(+)). Von den 177 Pflänzchen mit pBI-AUX2-(+) konnten dagegen 59 % angefärbt werden. Wieder war der Anteil der GUS-Aktivität zeigenden Pflänzchen, bei den im Dunkeln gewachsenen mit 84 % deutlich höher als bei den im Licht angezogenen, bei denen es nur 37 % waren (Tab. 3-1).

	Licht	Dunkel	zusammen
<i>A. thaliana</i>	25 % (32)	56 % (45)	43 % (77)
<i>N. tabacum</i>	37 % (92)	84 % (85)	59 % (177)

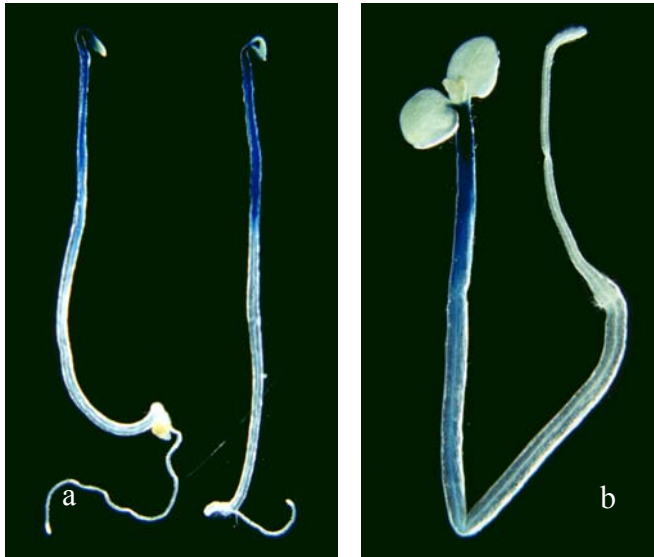
**Tab. 3-1 Der *ZmAUX2*-Promotor ist im Dunkeln aktiver**

Sechs bzw. neun Tage alte transgene Sämlinge wurden auf GUS-Aktivität getestet. Die Prozentzahlen geben jeweils den Anteil der Sämlinge an, die sich mit X-Gluc anfärben ließen. Die Zahlen in Klammern geben die Anzahl der jeweils getesteten Pflänzchen an.

Der verwendete *ZmAUX2*-Promotorbereich konnte also in unabhängigen Transformanten eine Expression des Reportergens vermitteln, ein verkehrt orientierter Promotor jedoch nicht. Zudem scheint der Promotor im Dunkeln aktiver zu sein. Dies korreliert gut mit den Daten aus den Northernblot-Analysen in Mais, die eine höhere Transkriptmenge in im Dunkeln gewachsenen Koleoptilen nachwiesen (vgl. 3.2).

3.4.1 Organspezifität

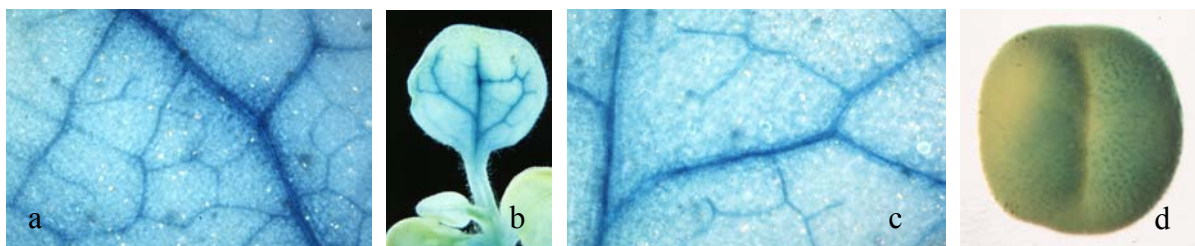
Unabhängig, ob im Licht oder im Dunkeln gezogen, war eine GUS-Expression stets im Hypokotyl der Keimlinge nachzuweisen. Die Intensität der Färbung war im oberen Drittel des Hypokotyls dabei besonders stark und nahm nach unten hin ab (Abb. 3-10).



**Abb. 3-10 GUS-Aktivität transgener *Arabidopsis*- und Tabak-Sämlinge**  
*Arabidopsis*- (a: A1) und Tabak- (b: T1) Keimlinge, die den Vektor pBI221-AUX2 transformiert trugen, waren sechs Tage im Dunkeln angezogen und auf GUS-Aktivität getestet worden.

Vom Hypokotyl aus erstreckte sich die Färbung teils über die Blattstiele bis in die Mittelrippen der Keimblätter hinein, in seltenen Fällen auch in die weitere Blattaderung (Abb. 3-13). Bei älteren Pflänzchen war stets der obere Teil des Sprossabschnittes angefärbt, nie aber die Sprossspitze mit dem Meristem selbst. Auch Wurzeln und Blattspreiten zeigten keine GUS-Aktivität. Vom Spross ausgehend konnte wieder eine Färbung der Blattstiele beobachtet werden, die selten bis ins Leitgewebe der Blätter hinein reichte (Abb. 3-11 a-c). Teilweise war auch eine Anfärbung des Leitgewebes im Hypokotyl bzw. Spross zu beobachten (Abb. 3-9 c). In Tabakblüten konnte teilweise Narbenpapillen angefärbt werden, nicht aber Filamente (Abb. 3-11 d).

$\beta$ -Glucuronidase wurde also nur in elongierenden Abschnitten des Hypokotyls, der bei den im Dunkeln etiolierten Pflänzchen natürlich wesentlich länger ist, den Blattstielen und selten in der Blattaderung und den Narbenpapillen gebildet. Die Organspezifität deckt sich gut mit der in Northernblotanalysen untersuchten Expression des *ZmAUX2*-Gens in Mais. Dort konnten *ZmAUX2*-Transkripte nur in Koleoptile und Mesokotyl nachgewiesen werden, nicht jedoch in der Wurzel und im Primärblatt. Der in pBI-AUX2-(+) verwendete Promotorbereich kann also eine spezifische Expression des Reportergens im heterologen System vermitteln.

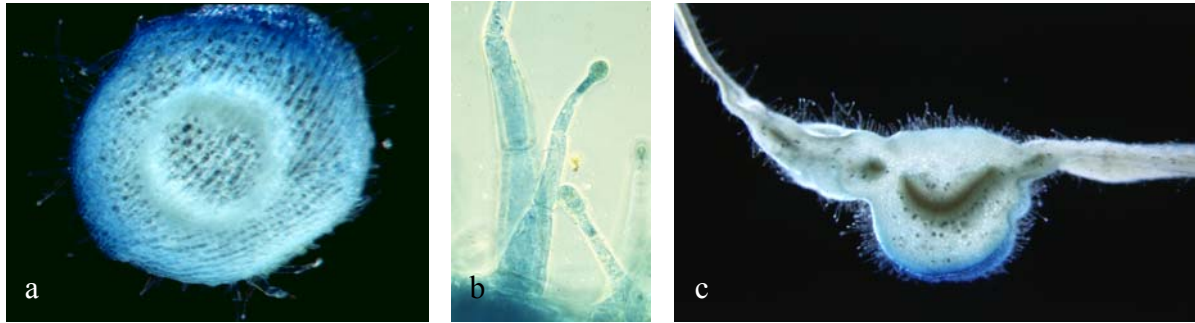


**Abb. 3-11 Seltene GUS-Aktivität des Blattes und der Narbenpapillen**

a, b und c: jeweils verschiedene Ausschnitte der Blattspreite einer T1-Pflanze aus den Experimenten zur gravitropen Reaktion (3.4.5), Sämlinge waren zwei Wochen im Licht gezogen, dann einen Tag im Dunkeln gehalten und um 90° aus der Vertikalen gedreht worden. d: Narbe einer erwachsenen Tabak T1-Pflanze.

### 3.4.2 Gewebsspezifität

Zur Untersuchung der Gewebsspezifität wurden Tabak-Hypokotyl bzw. -Spross in der elongierenden Zone quer geschnitten und auf GUS-Aktivität getestet, die sich vor allem in der Epidermis und den äußeren Schichten der Rinde nachweisen ließ. Bei Querschnitten des Blattes färbten sich auch hier die Epidermis und äußere Bereiche der Rinde der Mittelrippe an. Auch Haare in diesen Bereichen waren teilweise angefärbt (Abb. 3-12).



**Abb. 3-12 GUS-Aktivität in Spross- und Blattquerschnitten**

a: Sprossquerschnitt eines acht Wochen alten Tabaksämlings (T2); b: Haare am Blattnerve (T1). c: Mittelrippe nahe der Blattbasis eines jungen Blattes (T8).

### 3.4.3 Einfluss von Auxin auf die Reportergenexpression

Da der *ZmAUX2*-Promotor in Mais durch Auxin stark aktiviert werden kann, wurde der Einfluss exogenen Auxins untersucht. Die beschriebene Organspezifität blieb auch nach Inkubation von transgenen Keimlingen in Auxin erhalten. In Wurzeln und Blattspreiten ließ sich auch durch exogenes Auxin keine  $\beta$ -Glucuronidase-Expression induzieren.

Zwar war in allen Versuchen die Intensität der Anfärbung sehr variabel, bei den im allgemeinen schwächer angefärbten Pflänzchen, die im Licht wuchsen, schien die Intensität der Färbung nach IAA-Inkubation bei gleicher Färbelösung und -zeit aber intensiver zu sein als ohne IAA-Inkubation (Abb. 3-13).



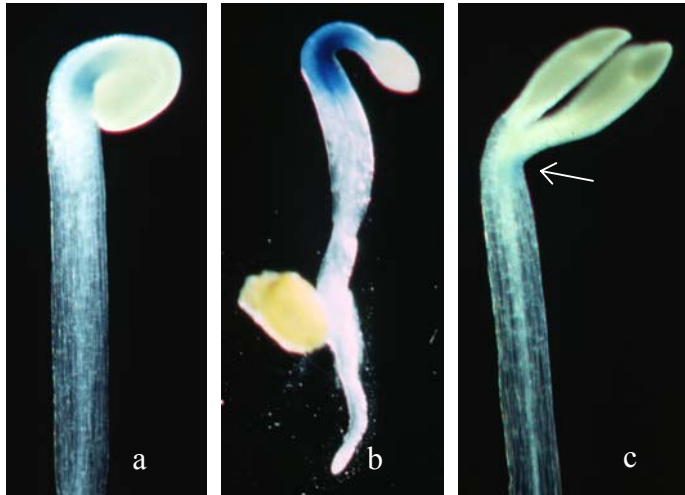
**Abb. 3-13 Einfluss von Auxin**

Im Licht angezogene Arabidopsis- (a, b, jeweils A28) und Tabak- (c, d, jeweils T1) Keimlinge wurden jeweils gleich lange mit derselben Färbelösung auf GUS-Aktivität getestet, das jeweils rechte Pflänzchen (b, d) war vor der Färbung 3 h in 100  $\mu$ M IAA inkubiert worden.

### 3.4.4 Öffnung des Hypokotylhakens

Bei der Anfärbung der Keimlinge war aufgefallen, dass bei noch nicht ganz entfaltenen Kotyledonen die Anfärbung an der Innenseite des Hypokotylhakens stets stärker ausfiel. Deshalb wurden Keimlinge unterschiedlicher Öffnungsstadien des Hypokotylhakens auf

GUS-Aktivität getestet. Die Innenseite des Hypokotyls ließ sich jeweils stärker anfärben (Abb. 3-14), also die Seite, die während der Öffnung stärker elongiert. Bei bereits vollständig geöffneten Hypokotylhaken verschwand diese Asymmetrie (Abb. 3-9 a, b; Abb. 3-10 b).



**Abb. 3-14 Öffnung des Hypokotylhakens**

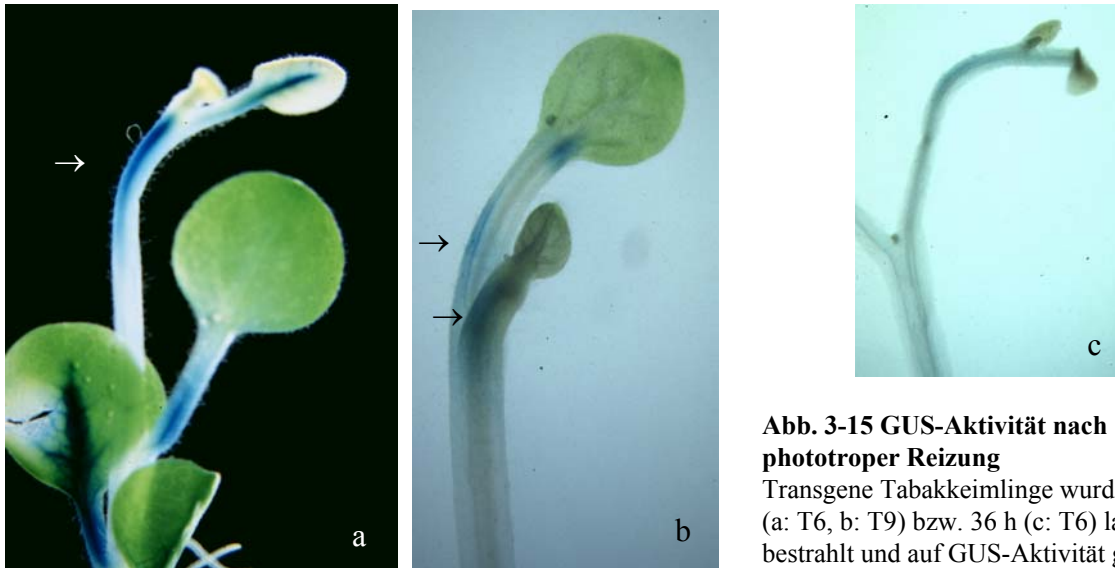
Transgene Arabidopsis (a, c: A25, b: A1) und Tabakkeimlinge (d, g: T4, e: T5, f: T8) mit unterschiedlich weit geöffneten Hypokotylhaken waren auf GUS-Aktivität getestet worden. (a, c, e, g waren im Licht angezogen worden, b, d, f im Dunkeln).



### 3.4.5 Geotrope und phototrope Krümmungsreaktionen

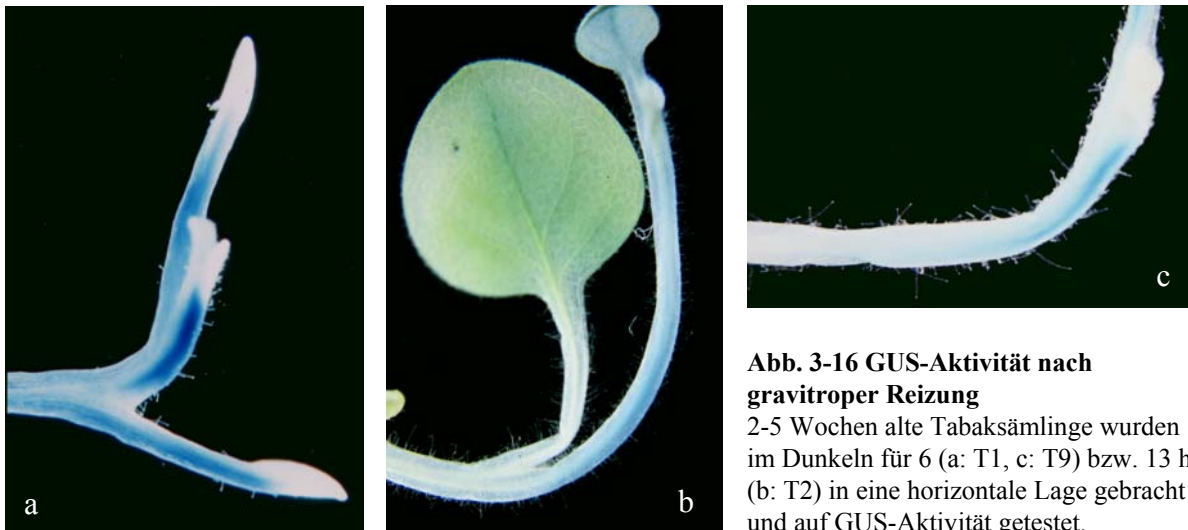
Als weitere Krümmungsreaktionen wurden die Vorgänge nach gravitroper bzw. phototroper Reizung untersucht. Dazu wurden zwei bis fünf Wochen alte Tabaksämlinge im Dunkeln für 6-13 h in eine horizontale Lage gebracht, bzw. 12 h lateral bestrahlt, und schließlich auf GUS-Aktivität getestet (5.2.1.4 5.2.1.6). Sowohl im Falle der gravitropen als auch der phototropen Reizung färbte sich die Außenseite der Krümmung stärker an (Abb. 3-16, Abb. 3-15) – gleich ob im Spross oder im Blattstiel (Abb. 3-15 b) – also wiederum jeweils die Seite stärkeren Wachstums.

In allen Untersuchungen zur *ZmAUX2*-Promotor-vermittelten Reporter-gen-Expression konnten keine qualitativen Unterschiede zwischen den aus unabhängigen Transformationsereignissen hervorgegangenen Pflanzen festgestellt werden. Der *ZmAUX2*-Promotor konnte also heterolog sowohl in *Arabidopsis* als auch in Tabak die Expression der  $\beta$ -Glucuronidase spezifisch steuern, wobei eine Expression im elongierenden Spross und Blattstiel erfolgte, und hier jeweils am stärksten in stark elongierenden Bereichen.



**Abb. 3-15 GUS-Aktivität nach phototroper Reizung**

Transgene Tabakkeimlinge wurden 12 h (a: T6, b: T9) bzw. 36 h (c: T6) lateral bestrahlt und auf GUS-Aktivität getestet.



**Abb. 3-16 GUS-Aktivität nach gravitroper Reizung**

2-5 Wochen alte Tabaksämlinge wurden im Dunkeln für 6 (a: T1, c: T9) bzw. 13 h (b: T2) in eine horizontale Lage gebracht und auf GUS-Aktivität getestet.

### 3.5 Transposon-Mutagenese von *ZmAUX2* in Mais

Um Näheres über die Funktion von *ZmAUX2* zu erfahren, sollten Mutanten charakterisiert werden, deren *ZmAUX2*-Gen durch eine Transposoninsertion disruptiert worden war. Die amerikanische Saatgutfirma Pioneer Hi-bred besitzt eine Sammlung genomischer DNA von 42 000 Maismutanten (F<sub>1</sub>-Generation), die durch Transposonmutagenese erzeugt worden waren (5.2.4.6), von diesen Mutanten waren nach Selbstbestäubung F<sub>2</sub>-Samen gewonnen worden (Trait Utility System of Corn: TUSC). Zum Aufspüren von *ZmAUX2*-Mutanten wurden geeignete Oligonucleotide (Aux2-TUSC5, Aux2-TUSC3) ausgewählt und in PCR-Experimenten mit genomischer Mais-DNA getestet. Mit diesen Primern und einem Transposon-Mu-spezifischen (Mu) wurde die Sammlung durchsucht. Mittels Hybridisierung mit *ZmAUX2*-DNA wurden die vermeintlichen *ZmAUX2*-Mutanten überprüft, und schließlich mit DNA der F<sub>2</sub>-Generation eine letzte PCR durchgeführt.

ZmAUX-2-gen	CGCCAAGAAG	ATTGCTCATC	TCGCCAAGAA	GTGGCAGAGG	40
ZmAUX-2-cDNA	CGCCAAGAAG	ATTGCTCATC	TCGCCAAGAA	GTGGCAGAGG	40
64-A-11	CGCCAAGAAG	ATTGCTCATC	TCGCCAAGAA	ATGGCAGAGG	40
89-D-07	CGCCAAGAAG	ATTGCTCATC	TCGCCAAGAA	ATGGCAGAGG	40
41-F-12	CGCCAAGAAG	ANTGCTCATC	TCGCCAAGAA	GTGGCAGAGG	40
ZmAUX-8	CGCCAAGAAG	ATTGCTCATC	TCGCCAAGAA	GTGGCAGAGG	40
Consensus	CGCCAAGAAG	ATTGCTCATC	TCGCCAAGAA	TGGCAGAGG	
ZmAUX-2-gen	ATGGCCGTGTA	TAAGGAGGAG	GTGCCTCACC	TTGGGGGCGG	80
ZmAUX-2-cDNA	ATGGCCCGCAC	AAGGGAGGAG	GCGCCTCACC	TTGGGGGCGGA	80
64-A-11	ATGGCCCGGC	AAGGGAGGAA	GCGCCTCACC	TTGGGGGCGG	80
89-D-07	ATGGCCCGGC	AAGGGAGGAA	GCGCCTCACC	TTGGGGGCGG	80
41-F-12	ATGGCTGCAC	AAGGGAGGAA	GCGCCTCGCC	TTGGGAAGCGG	80
ZmAUX-8	ATGGCTGCAC	AAGGGAGGAA	GCGCCTCGCC	TTGGGGGCGG	80
Consensus	ATGGC GC C	AAGGGAGGA	GCGCCTC CC	TTGGGGGCGG	
ZmAUX-2-gen	CATCAGCAAA	TGGAGCGCAC	GAGTGCTGCA	GCTCTGTGGC	120
ZmAUX-2-cDNA	CATCAGCAAA	TGGAGCGCAC	GAGTGCTGCA	GCTCTGTGGC	120
64-A-11	CGGCGGCCAAA	GGAAGTCGAC	GAGTGCTGCG	GCTCTGTGGC	120
89-D-07	CGGCGGCCAAA	GGAAGTCGAC	GAGTGCTGCG	GCTCTGTGGC	120
41-F-12	...CAGCAAA	GCAAGCCGAC	GAGTGCTGCA	GCTATGTGGC	117
ZmAUX-8	...CAGCAAA	GCAAGCCGAC	GAGTGCTGCA	GCTATGTGGC	117
Consensus	C GCAAA	AG GAC	GAGTGCTGC	GCT TGTGGC	
ZmAUX-2-gen	GAGCAAGGGC	CATTGCGCGG	TGTACACGGC	CGACGGGGCA	160
ZmAUX-2-cDNA	GAGCAAGGGC	CATTGCGCGG	TGTACACGGC	CGACGGGGCA	160
64-A-11	GAGCAAGGGC	CATTGTGCGG	TGTACACGGC	CGA	150
89-D-07	GAGCAAGGGC	CATTGTGCGG	CGTACACGGC	CGACGGGGCA	160
41-F-12	GAGCAAGGGC	CACITGCGCGG	TGCACACGGC	CGACGGGGCA	157
ZmAUX-8	GAGCAAGGGC	CACITGCGCGG	TGTACACGGC	CGACGGGGCA	157
Consensus	GAGCAAGGGC	CA TG GCGG	TGTACACGGC	CGACGGGGCA	
ZmAUX-2-gen	CGGTTTCGAGG	TGCCCTTTCG	GTGCCTTAGC	ACCCCGTCT	200
ZmAUX-2-cDNA	CGGTTTCGAGG	TGCCCGTGGC	GTGCCTTAGC	ACCCCGTCT	200
89-D-07	CGGTTTCGAGG	TGCCCGTGGC	GTGCCTTAGC	ACCCCGTCT	200
41-F-12	CGGTTTCGAGG	TGCCCGTGGC	GTGCTTTTANC	ACCCCGGTGT	197
ZmAUX-8	CGGTTTCGAGG	TGCCCGTGGC	GTGCCTTAGC	ACCCCGTCT	197
Consensus	CGGTTTCGAGG	TGCCCGTGGC	GTGCCTTAGC	ACCCCGTCT	
ZmAUX-2-gen	TCGTGGAGCT	CCTGCAGATG	TCACAGGAGG	AGTTTGGCTT	240
ZmAUX-2-cDNA	TCGGGGAGCT	CCTGCAGATG	TCACAGGAGG	AGTTTGGCTT	240
89-D-07	TCAGGGAGCT	CCTGCAGATG	TCACAGG		227
41-F-12	TCGTGGAGCT	CCTGCAGATG	TCACAGGAGG	AGTTTGGCTT	237
ZmAUX-8	TCGGGGAGCT	CCTACAATG	TCACAGGAGG	AGTTTGGCTT	237
Consensus	TCG GGAGCT	CCTGCAGATG	TCA AGGAGG	AGTT GGCTT	
ZmAUX-2-gen	CGCGGGCGGC	GATGGCAGGA	TCACGCTGCC	CTGC	274
ZmAUX-2-cDNA	CGCGGGCGGC	GATGGCAGGA	TCACGCTGCC	CTGC	274
41-F-12	CACAGGGCGGC	GATGGCAGGA	TCACGCTGCC	CTG	270
ZmAUX-8	CACGGGCGGC	GATGGCAGGA	TCACGCTGCC	CTGC	271
Consensus	C CGGGCGGC	GATGGCAGGA	TCACGCTGCC	CTGC	

	ZmAUX2gen	ZmAUX2cDNA	64-A-11	89-D-07	41-F-12	ZmAUX8
ZmAUX2-gen	100 %					
ZmAUX2-cDNA	96 %	100 %				
64-A-11	87 %	91 %	100 %			
89-D-07	89 %	93 %	99 %	100 %		
41-F-12	90 %	93 %	91 %	91 %	100 %	
ZmAUX8	90 %	94 %	93 %	92 %	97 %	100 %
ZmSAUR-1-cDNA	54 %	55 %	51 %	50 %	56 %	58 %

**Abb. 3-17 DNA-Sequenzvergleich** der durch die Oligonucleotide Mu und ZmAUX2-5 amplifizierten Genabschnitte der Maismutanten 64-A-11, 89-D-07 und 41-F-12 mit der genomischen und der cDNA *ZmAUX2*-Sequenz, sowie *ZmAUX8* (ROHRMEIER, 1995) und *ZmSAUR-1* (YANG & POOVAIAH, 2000).

Von drei Mutanten, die in allen Tests positiv waren, wurde das PCR-Produkt kloniert und sequenziert (Abb. 3-17). Die Sequenzen der durch Mu getroffenen Gene sind wie erwartet zu einem hohen Grad (89 % bis 93 %) identisch mit den *ZmAUX2*-Gensequenzen. Die Unterschiede können teils von einer fehlerhaften Amplifikation bei der PCR herrühren, oder aber von Sortenunterschieden, da für die Transposonmutagenese eine andere Maislinie als für die Isolierung von *ZmAUX2* verwendet worden war. Zwischen der *ZmAUX2*-cDNA und der genomischen *ZmAUX2*-Sequenz gibt es ebenso geringe Unterschiede. Sie sind im verglichenen Bereich zu 96 % identisch. Allerdings können auch tatsächlich unterschiedliche *ZmAUX*-Gene, bzw. *SAUR*-Gene, betroffen sein. Wie der Vergleich zu der *ZmAUX8*-cDNA zeigt, die wie *ZmAUX2* aus elongierenden Maiskoleoptilen stammt (vgl. Einleitung), können die verschiedenen Mitglieder der Genfamilie im verglichenen Sequenzbereich zu 90 % bzw. 94 % identisch sein. Das dritte bereits bekannte Gen aus Mais, das wohl zur *SAUR*-Verwandtschaft gehört, *ZmSAUR-1*-cDNA, zeigt mit Werten zwischen 50 % und 58 % im verglichenen Sequenzbereich nur eine vergleichsweise geringe Ähnlichkeit zu den anderen Sequenzen. Es kann also ausgeschlossen werden, dass *ZmSAUR-1* in einer der Mutanten getroffen wurde. Welches der *ZmAUX*-Gene aber getroffen worden war, oder ob Mu gar in ein weiteres, noch unbekanntes, verwandtes Gen inserierte, konnte auf Grund der zur Verfügung stehenden Sequenzdaten aber nicht entschieden werden. In 64-A-11 und 89-D-07 scheint aber zweimal unabhängig dasselbe Gen getroffen zu sein; sie sind im sequenzierten Bereich zu 99 % identisch und unterscheiden sich lediglich in einer Base.

### 3.5.1 Keimungs- und Überlebensrate

Samen der F<sub>2</sub>-Generation dieser drei Mutanten, die durch unabhängige Transpositionsereignisse erzeugt worden waren, sowie von neun weiteren, in PCR und Hybridisierung positiven Mutanten, deren PCR-Reaktionen mit DNA der F<sub>2</sub>-Generation allerdings kein starkes Signal ergaben, wurden von der Firma Pioneer erhalten. Im Folgenden werden die jeweiligen Nachkommen einer Mutante der Pioneer-Bank als Familie bezeichnet. Zunächst wurden fünf Körner jeder Familie, in einer zweiten Anzucht noch einmal jeweils acht Körner ausgesät und bei 26°C und gespannter Atmosphäre im Dunkeln angekeimt. Als Kontrolle diente der Hybridmais „Alois“ (25 bzw. 14 Körner) bzw. die homozygote Linie B73 (bei zweiter Anzucht 4 Körner).

	TUSC-Mutanten				Kontrollen	
	41-F-12	64-A-11	89-D-07	12 TUSC-Familien	„Alois“	B73
Keimrate	92 %	92 %	77 %	85 %	69 %	100 %
Überlebensrate	50 %	67 %	20 %	58 %	93 %	100 %

**Tab. 3-2 Keimungs- und Überlebensraten**

Keimrate: prozentualer Anteil von ausgekeimten Körnern an ausgesäten Körnern

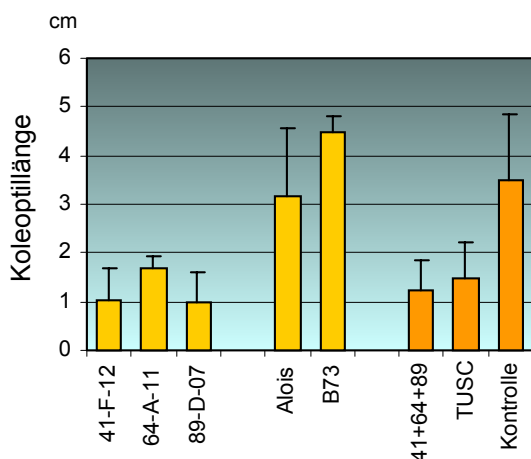
Überlebensrate: prozentualer Anteil von über 100 Tage alt werdenden Pflanzen an ausgekeimten Pflanzen.

Die Keimungsrate der Mutanten war mit 85 % im Vergleich zur Kontrolle „Alois“ 69 % gut (Tab. 3-2). Das Saatgut des Hybridmais war allerdings schon einige Jahre alt, so dass die verminderte Keimfähigkeit vermutlich auf das Alter zurückzuführen ist. Im Gegensatz dazu erwiesen sich die Überlebensraten der Mutanten als deutlich geringer. Während bei der Kontrolle nahezu alle Keimlinge auch das Erwachsenenalter erreichten und Blüten bildeten

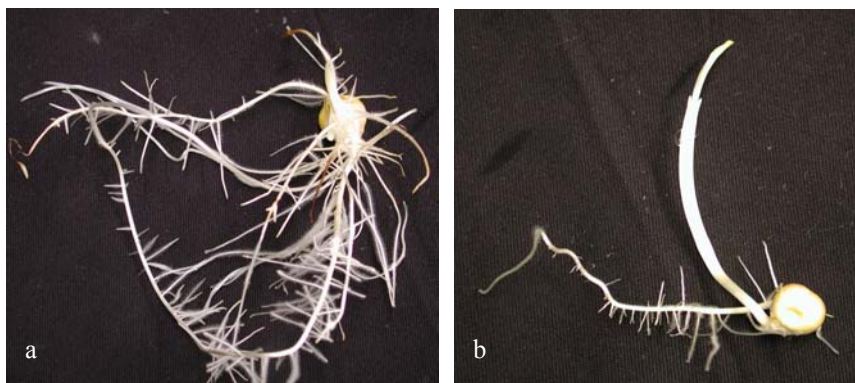
(94 %), kamen viele der Transposon-mutagenisierten Pflanzen nicht über das Koleoptilenstadium, bzw. über die Bildung von wenigen Blättern hinaus (58 %). Innerhalb der drei Familien 41-F-12, 64-A-11 und 89-D-07, deren F<sub>2</sub>-DNA ein starkes PCR-Signal ergab, betrug die Überlebensrate sogar nur 47 %.

### 3.5.2 Reduziertes Koleoptilenwachstum der Mutanten

Zur Bestimmung der Wachstumsparameter wurde das Wachstum der Mutanten der zwei unabhängigen Ansaaten verfolgt. Bis zum sechsten Tag nach der Aussaat wurden die Sämlinge bei 26°C im Dunkeln gezogen. Es fiel auf, dass die Koleoptilen der Mutanten durchschnittlich kürzer waren als die der Kontrollen „Alois“ und B73, und dies obwohl für die schon älteren „Alois“-Samen wegen der verzögerten Keimung ein Wachstumsnachteil zu erwarten gewesen wäre. Dieser scheint sich, vergleicht man die „Alois“- mit der B73-Kontrolle, auch tatsächlich bemerkbar zu machen (Abb. 3-18). Der Unterschied zwischen den beiden Kontrollen lässt sich im nicht-parametrischen Mann-Whitney-U-Test nicht als signifikant bestätigen ( $p = 0,0523$ ). Der Unterschied zwischen Kontrollen und Transposon-mutagenisierten Pflanzen ist aber signifikant. (Im Mann-Whitney-U-Test TUSC/Kontrolle:  $p < 0,0001$ ).



**Abb. 3-18 Durchschnittliche Länge der Koleoptilen am 6. Tag nach der Aussaat**  
Gezeigt sind die Werte der zweiten Anzucht, die sich von den Werten der erste Anzucht nicht wesentlich unterscheiden. 41+64+89: Mittel der Werte der drei Mutanten-Familien 41-F-12-, 64-A-11- und 89-D-07; TUSC: Mittel der Werte der Mutanten aller 12 Transposon-mutagenisierter Familien; Kontrolle: Mittel der Werte der Kontrollpflanzen „Alois“ und B73.



**Abb. 3-19 TUSC-Keimlinge** nach neuntägiger Anzucht im Dunkeln  
a: 41-F-12-C mit bereits ausgeprägtem Wurzelsystem und vielen Seitenwurzeln aber sehr kurzer Koleoptile.  
b: 89-D-07-6 mit nur kuzer Koleoptile, die bereits vom Primärblatt durchbrochen wurde.

Abb. 3-19 verdeutlicht, dass Mutanten nach neuntägiger Anzucht im Dunkeln auffallend kurze Koleoptilen besaßen, auch wenn das Wurzelsystem bereits stark ausgebildet (a), oder die Koleoptile bereits vom Primärblatt durchbrochen worden war (b).

3.5.3 Reduziertes Sprosswachstum der Mutanten

Zur weiteren Verfolgung des Sprosswachstums wurden die Keimlinge am siebten Tage nach der Aussaat auf Erde umgesetzt und im Gewächshaus weiter kultiviert. Deutlich zeigte sich ein reduziertes Sprosswachstum der Transposon-mutagenisierten Pflanzen (Abb. 3-21), wobei allerdings auch die B73-Linie, die als homozygote Linie für schlechtes Wachstum bekannt ist,

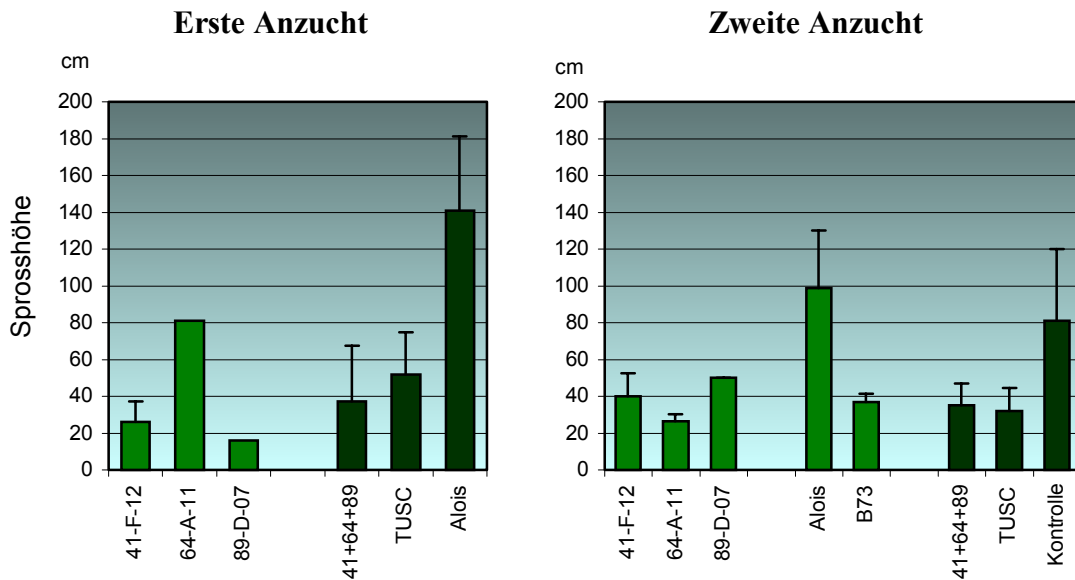


Abb. 3-20 Durchschnittliche Sprosslänge am 86. Tag nach der Aussaat der ersten Anzucht bzw. am 83.-85. Tag der zweiten Anzucht; jeweils mit Standardabweichung (ist keine Standardabweichung angegeben, so erlebte nur eine einzige Pflanze dieses Stadium).

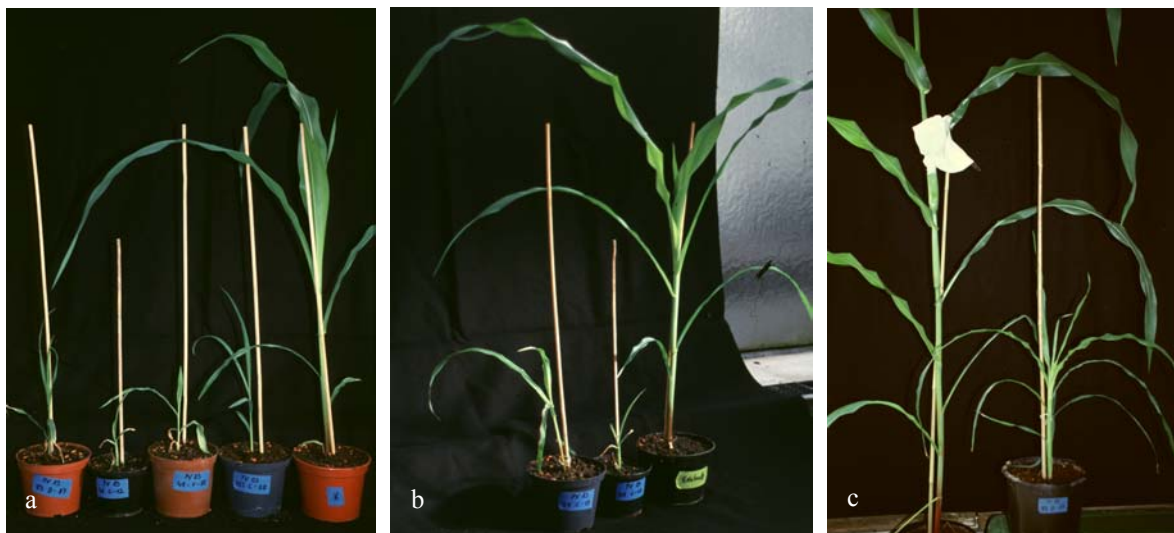


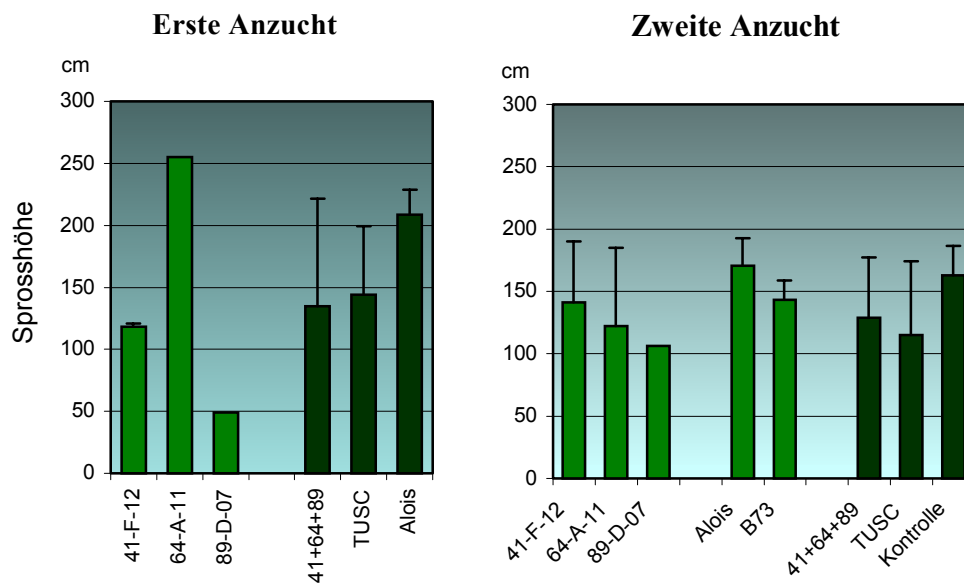
Abb. 3-21 Erste Anzucht der Transposon-mutagenisierter Maispflanzen

a: 89-D-07, 41-C-12, 41-F-12, 125-C-08 und „Alois“-Pflanzen (von links nach rechts), 8 Wochen alt; b: zwei 41-C-12 Pflanzen (links) „Alois“ (rechts), 9 Wochen alt; c: „Alois“ bereits am Anfang der weiblichen Blühphase (links), 89-D-07-Pflanze (rechts), 13 Wochen alt.

im Wachstum zurückblieb. Die Unterschiede sind signifikant wie ein Mann-Whitney-U-Test zeigte (Erste Anzucht: TUSC/Alois:  $p < 0,0001$ ; zweite Anzucht: TUSC/Kontrolle:  $p < 0,0001$ ; Alois/B73:  $p = 0,0020$ ). Die verminderte Größe ist auf ein vermindertes Internodienwachstum zurückzuführen, da Blätter auch bei kleinen Pflanzen in der selben Anzahl ausgebildet wurden. In Abb. 3-20 sind die durchschnittlichen Sprosshöhen der Pflanzen nach 12 Wochen aufgetragen.

### 3.5.4 Verminderte Endgröße der Mutanten

Die verminderte Wachstumsgeschwindigkeit führte zu einer geringeren Endgröße der Transposon-mutagenisierten Pflanzen (Abb. 3-22, Abb. 3-23). Ein Mann-Whitney-U-Test weist den Unterschied zwischen den TUSC-Pflanzen und den Kontrollpflanzen in beiden Anzuchten als signifikant aus ( $p < 0,0001$  bzw.  $p = 0,0185$ ). Betrachtet man nur die drei Familien 41-F-12-, 64-A-11- und 89-D-07 so ergab der nicht-parametrische Test bei beiden Anzuchten keine Signifikanz, die Anzahl der Pflanzen war dazu zu gering. Setzt man jedoch eine Gaus'sche Verteilung voraus, wogegen es keine Einwände gibt, so ergibt sich im parametrischen Test für beide Anzuchten auch hier eine Signifikanz ( $p = 0,0048$  bzw.  $p = 0,0270$ ). Die Unterschiede sind also im Vergleich der Maximalgrößen nicht mehr so deutlich, wie bei Beginn des Wachstums. Die Pflanzen konnten durch eine verlängerte Wachstumsphase noch etwas aufholen (s. 3.5.5). Während Kontrolle „Alois“ bereits nach knapp 100 Tagen die Maximalhöhe erreicht hatte, wuchsen die Transposon-mutagenisierten Pflanzen noch etwa drei Wochen weiter. Eine einzige Pflanze der 64-A-11-Familie konnte dadurch die Kontrolle sogar um 50 cm übergipfeln, und war damit die größte Pflanze der ersten Anzucht. Wie in Abb. 3-20 zu sehen ist, lag auch diese Pflanze als einzige Überlebende der ersten Anzucht der 64-A-11-Familie am 86. Tag noch hinter der Kontrolle zurück; der Riesenwuchs ist ausschließlich auf die verlängerte Wachstumsphase zurückzuführen, nicht auf ein beschleunigtes Wachstum.



**Abb. 3-22 Maximal erreichte Sprosshöhe**

41+64+89: Mittel der Werte der drei Mutanten-Familien 41-F-12-, 64-A-11- und 89-D-07; TUSC: Mittel der Werte der Mutanten aller 12 Transposon-mutagenisierter Familien; Kontrolle: Mittel der Werte der Kontrollpflanzen „Alois“ und B73.



**Abb. 3-23 Adulte TUSC-Pflanzen der ersten Anzucht**

a: 13 Wochen alte 176-E-04, 95 cm hoch, mit fast normal großen Blättern; b: 16 Wochen alte 176-G-10-Pflanze bereits in beginnender Anthese, obwohl der männliche Blütenstand noch teils in Blattscheiden verborgen ist; c: 17 Wochen alte 89-D-07-Pflanze bereits in weiblicher Blühphase, 49 cm hoch.



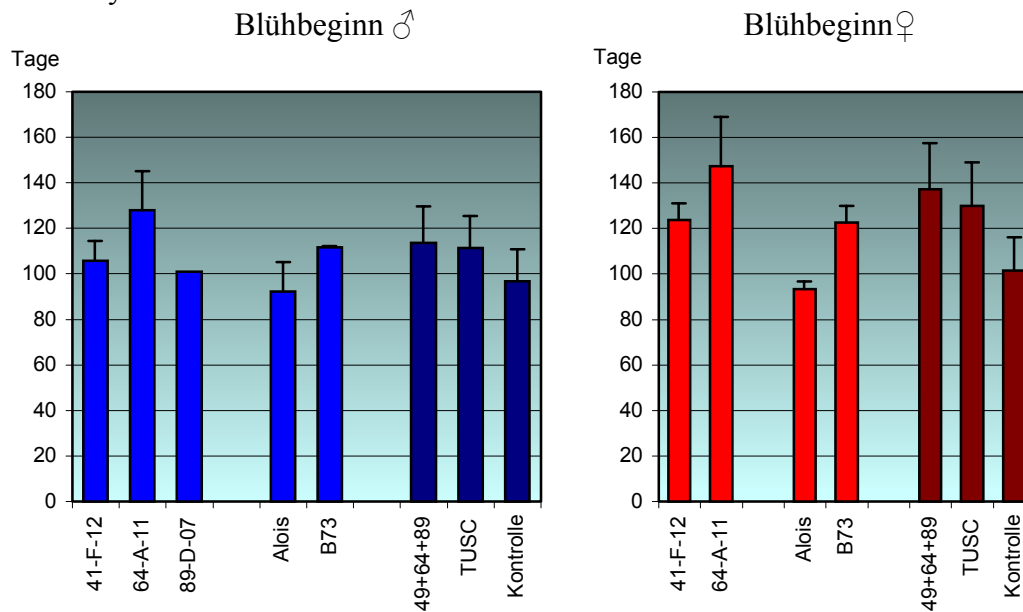
**Abb. 3-24 Pflanzen der zweiten Anzucht in der 21. Woche**

a: 89-D-07 (106 cm hoch); b: 64-A-11 (117 cm hoch); c: kleinste und größte 41-C-12-Pflanzen (13 cm und 51 cm) mit rechts „Alois“ (189 cm).

### 3.5.5 Verlängerte vegetative Phase der Mutanten

Auch die Blüte setzte bei den Mutanten um etwa drei Wochen verzögert ein, wobei die weibliche Phase stärker verzögert war, als die bereits einige Tage vor Ende des Wachstums einsetzende männliche Blühphase. Die Verzögerung des männlichen und weiblichen Blühbeginns im Vergleich zur Kontrolle war signifikant, wie ein nicht-parametrischer Mann-Whitney-U-Test zeigte (männlicher Blühbeginn TUSC/Kontrolle:  $p = 0,0071$ ; weiblicher Blühbeginn:  $p = 0,0009$ ). Die leichte für Mais typische Protandrie wurde dadurch noch verstärkt. Es fiel auf, dass häufig noch von Blättern umhüllte, männliche Blütenstände bereits ihre Blüten öffneten (Abb. 3-23 b), und die Blütenachse sich erst während der Blüte langsam streckte um den Pollen besser exponieren zu können. Männliche Blüten der Kontrollpflanzen

öffneten sich erst nach Streckung der Blütenachse. Es traten auch verschiedene Formen von Sterilität bei den mutagenisierten Pflanzen sowie den B73-Homozygoten auf, nicht jedoch bei den „Alois“-Hybriden.



**Abb. 3-25 Beginn der jeweiligen Blühphase**

Aufgetragen sind die Anzahl der Tage ab Aussaat bis zum ersten freigesetzten Pollen, bzw. bis zum Erscheinen der ersten Narbe. Gezeigt sind die Werte der zweiten Anzucht, die sich von den Werten der erste Anzucht nicht wesentlich unterscheiden.

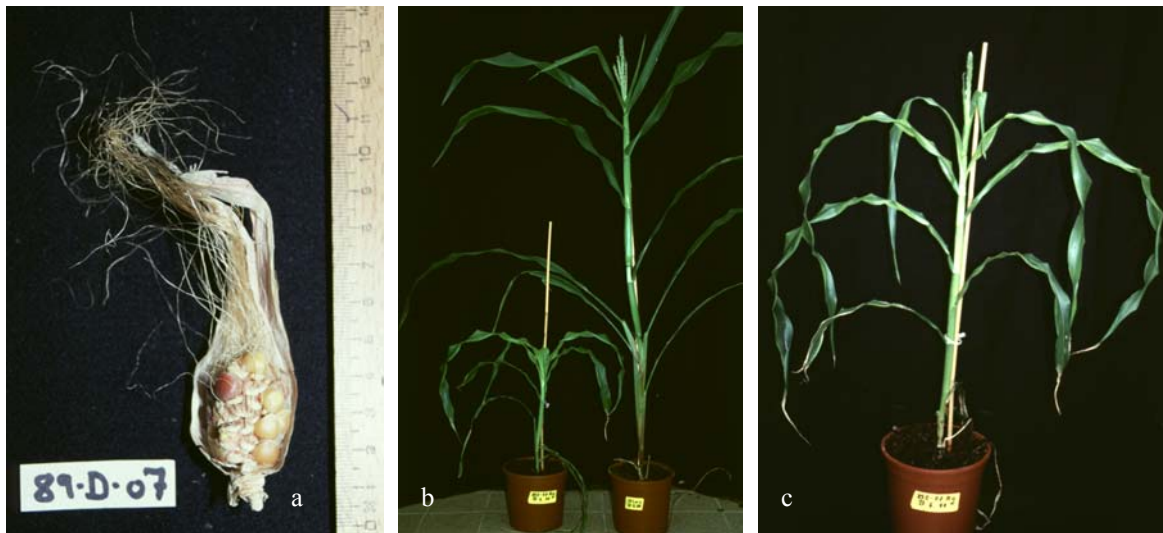


**Abb. 3-26 Adulte sterile Pflanzen**

a: 41-F-12 (erste Anzucht, 18 Wochen alt) mit drei Narben an Stelle von männlichen Blüten  
 b: 64-A-11 (zweite Anzucht, 21 Wochen alt) mit nur kleinem männlichen, sterilen Blütenstand und ohne weiblichen Blütenstand; c: 64-A-11 (Anzucht der Pflanzen, deren geotrope Reaktion untersucht worden war) mit Narben statt männlicher Blüten an der Sprossspitze.

### 3.5.6 Vererbbarkeit des Mutantenphänotyps

Von einigen TUSC-Familien konnten bereits bei der ersten Aufzucht Samen geerntet werden, die zur zweiten Anzucht mit angesät wurden. Auch diese F<sub>3</sub>-Generation zeigte den selben Phänotyp mit Kleinwüchsigkeit und verzögerter Blüte wie die Elterngeneration (Abb. 3-27). Der Phänotyp ließ sich also vererben.

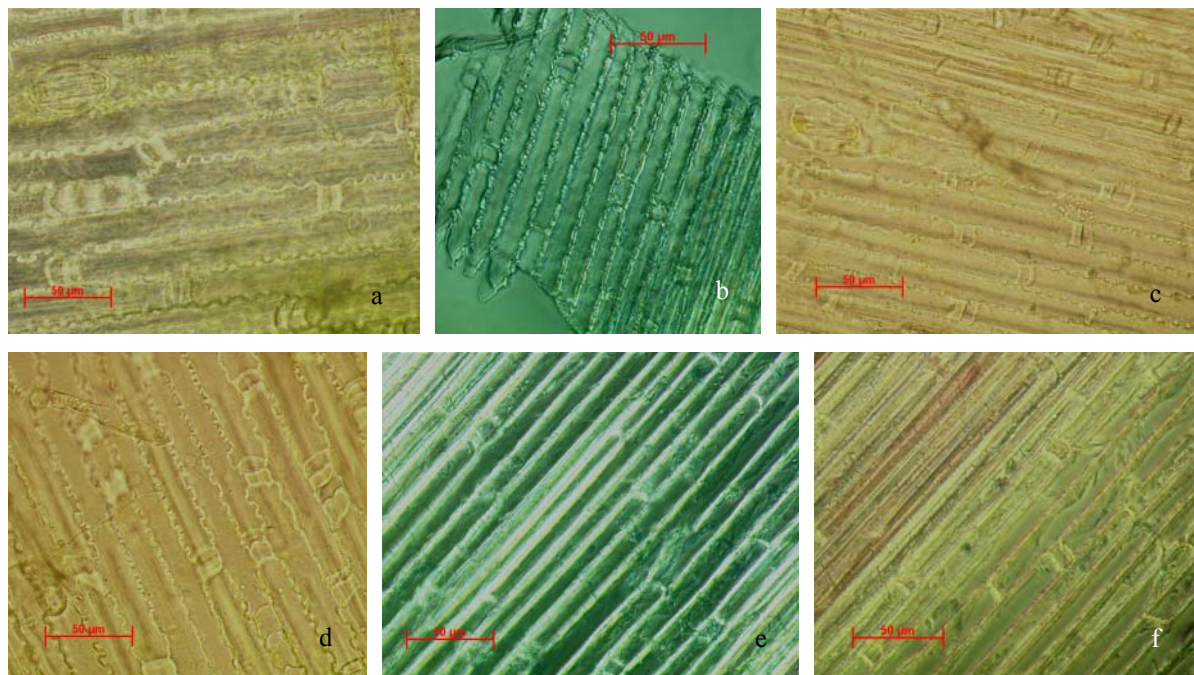


**Abb. 3-27 Zwergenwuchs der F<sub>3</sub>-Generation**

89-D-07 aus Körnern der ersten Anzucht (a) gezogen, b: 11 Wochen alt (23 cm hoch, rechts „Alois“ bereits mit Blütenstand); c: 14 Wochen alt, bereits mit noch geschlossenem männlichen Blütenstand (62 cm hoch)

### 3.5.7 Epidermiszellen der Mutanten

Das geringere Wachstum der Sprossachse scheint auf einer geringeren Elongation der Epidermiszellen zu beruhen. In Tangentialschnitten aus dem mittleren Bereich eines mittleren Internodiums adulter Kontrollpflanzen erscheinen die Zellwände der Epidermiszellen gerade und glatt (Abb. 3-28 e, f); die Zellwände der Transposon-mutagenisierten Pflanzen aus demselben Bereich zeigen jedoch einen welligen Verlauf (a-d), wobei diese Wellen bei den kleinsten Pflanzen (a, d) am ausgeprägtesten waren.

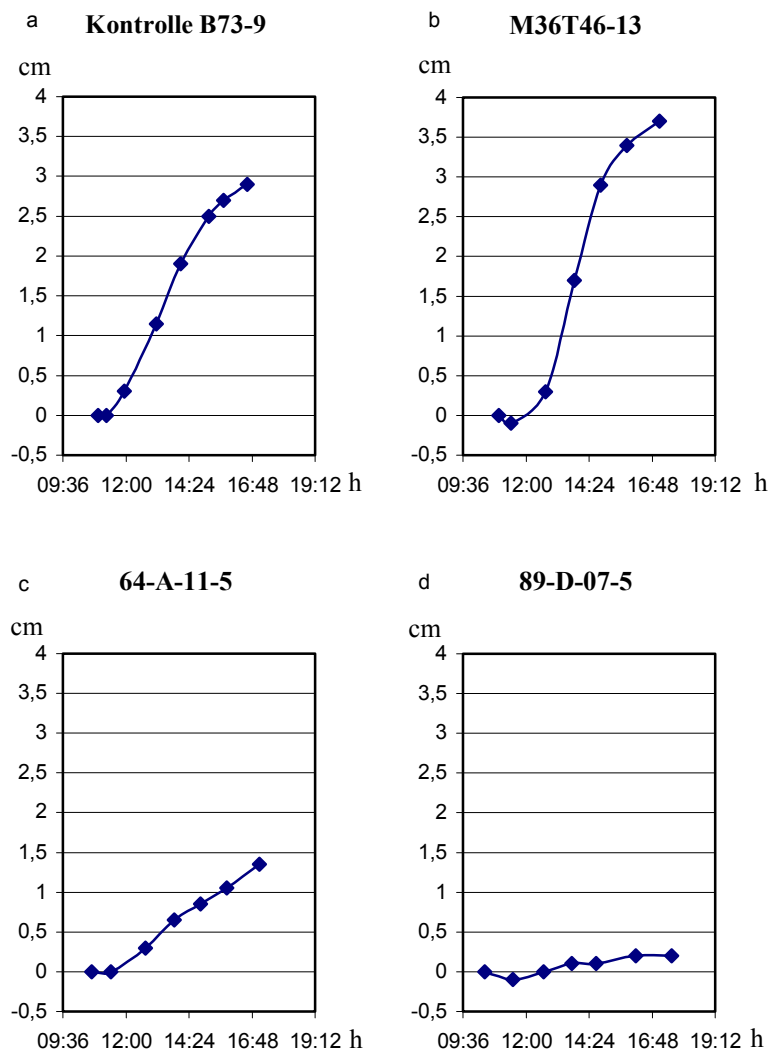


**Abb. 3-28 Tangentialschnitte der Epidermis im Lichtmikroskop**

Es wurde jeweils im mittleren Internodienbereich, auf mittlerer Sprosshöhe adulter Pflanzen geschnitten. a und d: 41-C-12; b: 64-A-11; c: 89-D-07; e und f: Kontrolle „Alois“. Deutlich sind die welligen Zellwände der TUSC-Pflanzen zu sehen, während die Zellwände der Kontrolle gerade sind. Der rote Balken entspricht 50 μm.

### 3.5.8 Geotropische Reaktion der TUSC-Pflanzen

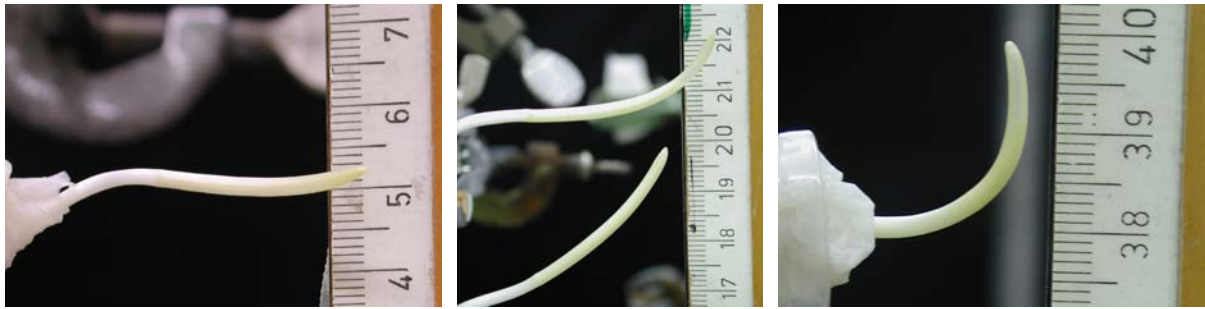
Im heterologen Tabakssystem deuteten die Promotor-GUS-Fusionen (3.4.5) auf eine Beteiligung des ZmAUX2-Proteins bei geotroper Reaktion hin. Die nach geotroper Reizung schneller elongierenden Flanken konnten dort mit X-Gluc angefärbt werden (Abb. 3-16). Deshalb wurde auch das geotrope Verhalten der TUSC-Mutanten untersucht. Dafür wurden im Dunkeln angezogene Maiskoleoptilen in die Horizontale gedreht und die Krümmungsreaktion der Koleoptilen verfolgt (5.2.1.4). Nachdem die Koleoptile in einer waagrechten Lage fixiert wurde, bewegte sich die Koleoptilenspitze in typischer geotroper Reaktion nach einer kurzen lag-Phase zügig nach oben (Abb. 3-28 a; 3-29 c), bzw. erst etwas nach unten und dann zügig nach oben (Abb. 3-28 b). Gemessen wurde jeweils die vertikale Lage der Koleoptilenspitze.



**Abb. 3-28 Zeitverlauf der geotropen Reaktion der Koleoptile**

Sämlinge mit 2-3,5 cm langen Koleoptilen wurden in eine horizontale Lage gebracht, und die vertikale Lage der Koleoptilenspitze anhand einer Skala gemessen. Der erste Punkt entspricht jeweils  $t_0$ , angegeben ist die Tageszeit.

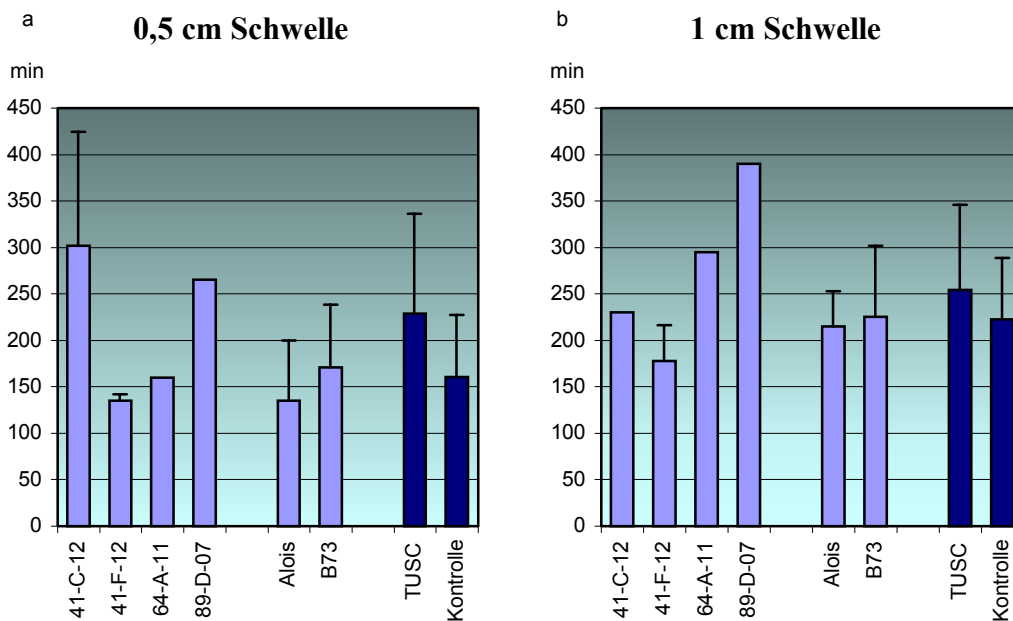
a: Kontrollkeimlinge der homozygoten B73-Linie, c und d: TUSC-Keimlinge und zum Vergleich b: die Krümmung einer Koleoptile, die das Plasmid zur Überexpression des *ZmAUX2*-Gens (M36) trug (vgl. 3.6.4).



**Abb. 3-29 Geotrope Reizung der Maiskoleoptilen**

Krümmung der Koleoptilen aus der Horizontalen nach 4 h (a und b) und 6 h (c); a: 89-D-07-5 (vgl. Abb. 3-28 d) ( $t_0$ : 5 cm); b: unten M36T10-17 ( $t_0$ : 17 cm), oben M36T46-17 ( $t_0$ : 21 cm); c: „Alois“ 8 ( $t_0$ : 38 cm)

Die Reaktion der Mutanten nach geotroper Reizung war teilweise erheblich langsamer als die der Kontrollen. Um die Krümmungsgeschwindigkeiten vergleichen zu können, wurde die Zeit gemessen, die eine Koleoptilenspitze brauchte, um 0,5 cm bzw. 1 cm über den Ausgangspunkt gehoben zu werden, zu dem die Koleoptile waagrecht ausgerichtet worden war (Abb. 3-29).



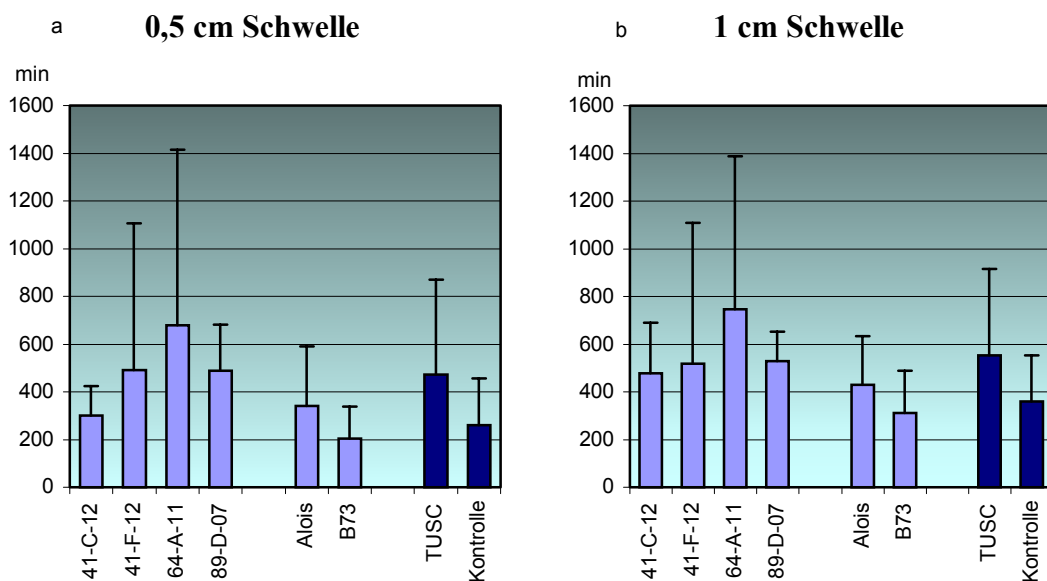
**Abb. 3-30 Geotrope Reaktion der Koleoptilen**

Aufgetragen wurde die Zeit, die die Koleoptilenspitze brauchte, um 0,5 cm (a) bzw. 1 cm (b) über den Ausgangspunkt zu kommen. Koleoptile, die dies in der Versuchszeit nicht schafften wurden nicht berücksichtigt.

Die TUSC-Pflanzen brauchten zum Erreichen der Schwellen länger als die Kontrollen. Der Unterschied war im Student-t-Tests aber nicht signifikant (0,5 cm Schwelle:  $p = 0,0713$ ; 1 cm Schwelle:  $P = 0,4194$ ). Lediglich die 41-C-12-Pflanzen brauchten im Vergleich zur Kontrolle signifikant länger zum Erreichen der 0,5 cm Schwelle (Student-t-Test:  $p = 0,0077$ ). Der Unterschied zwischen TUSC-Mutanten und Kontrolle fiel im Vergleich der Zeiten, die zum Erreichen der 0,5 cm Schwelle gebraucht wurde, etwas stärker aus als im Vergleich der Zeiten, die zum Erreichen der 1 cm Schwelle gebraucht wurde (Abb. 3-30), denn viele der Mutanten erreichten die jeweilige Schwelle innerhalb der Versuchsdauer von ca. 7 h nicht und gingen deshalb nicht in die Werte mit ein. Von den Mutanten erreichten bis zum Versuchsende 64 % die 0,5 cm Schwelle aber nur 45 % die 1 cm Schwelle. Von den Kontroll-

koleoptilen waren es 77 % bzw. 64 %. Alle Kontrollpflanzen waren 22 h nach Versuchsbeginn über die 1 cm Schwelle aufgekrümmt. Von den TUSC-Mutanten erreichten aber 27 % diese Schwelle auch nach 22 h nicht. Betrachtet man nur die drei auch bei der letzten Kontrolle positiven TUSC-Familien, so waren es sogar 37 %, die überhaupt keine geotrope Reaktion zeigten.

Durch die 1 cm-Schwelle wird das Fenster also enger und es werden nur noch Koleoptilen berücksichtigt, die eine gewisse Krümmungsgeschwindigkeit erreichen. Um die langsameren Pflanzen mit berücksichtigen zu können, wurden für Pflanzen, die nach Versuchsende die Schwelle nicht erreicht hatten, pauschal 600 min eingegeben, für Pflanzen, die auch am nächsten Morgen nicht über die Schwelle gekommen waren, 1200 min. Durch dieses Miteinbeziehen der Pflanzen, die nicht oder nur sehr langsam auf eine gravitrope Reizung reagierten, konnte der Unterschied zwischen Mutanten und Kontrollen etwas deutlicher dokumentiert werden (Abb. 3-31). Im Student-t-Test ergab sich nun ein signifikanter Unterschied zwischen den Zeiten der TUSC-Pflanzen, die sie zum Erreichen der 0,5 cm Schwelle benötigten und der Kontrolle ( $p = 0,0469$ ); für die Zeiten, die zum Erreichen der 1 cm Schwelle gebraucht wurde, war der Wert knapp über einer Signifikanz ( $p = 0,0550$ ). Für die 64-A-11-Pflanzen ergab sich bei beiden Auswertungen eine Signifikanz im Student-t-Test (0,5 cm Schwelle:  $p = 0,0322$ ; 1 cm Schwelle:  $p = 0,0344$ ).



**Abb. 3-31 Geotrope Reaktion der Koleoptilen unter Einbeziehung der Pflanzen, die nur eine geringe bzw. keine Reaktion zeigten**

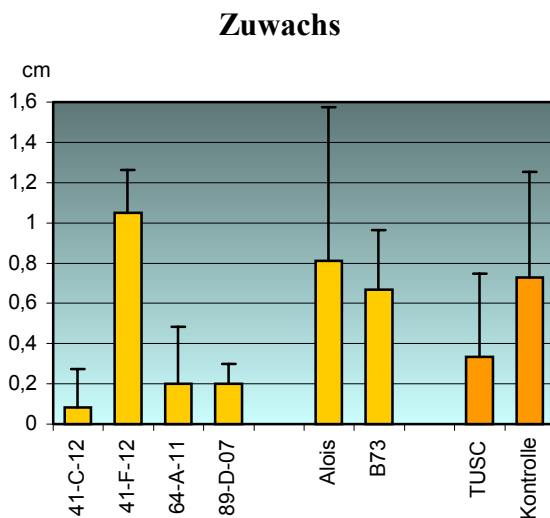
Aufgetragen wurde die Zeit, die die Koleoptilenspitze brauchte um 0,5 cm (a) bzw. 1 cm (b) über den Ausgangspunkt zu kommen. Koleoptilen, die dies in der Versuchszeit von 7 h nicht schafften, aber bis zum nächsten Tag die Schwelle noch überschritten wurden mit einer Pauschale von 600 min mit einberechnet, welche die auch dann die Schwelle nicht erreicht hatten mit einer Pauschale von 1200 min.

Für die geringen Signifikanzen sind die auffallend hohen Standardabweichungen der TUSC-Pflanzen verantwortlich, die zum einen durch die geringe Anzahl der Testpflanzen, zum anderen aber auch durch die sehr unterschiedliche Reaktion dieser Pflanzen zu erklären sind. Das Spektrum reichte von normaler bis gar keiner Reaktion. Bei der Kontrolle war immer eine Reaktion zu sehen, wenn auch zum Teil verzögert, so dass hier die Standardabweichungen nicht so hoch ausfallen. Auch wurden insgesamt doppelt so viele Koleoptile

der Kontrolle in das Experiment eingesetzt. Zur besseren statistischen Absicherung wäre eine höhere Anzahl an TUSC-Keimlingen nötig gewesen, die leider nicht zur Verfügung stand.

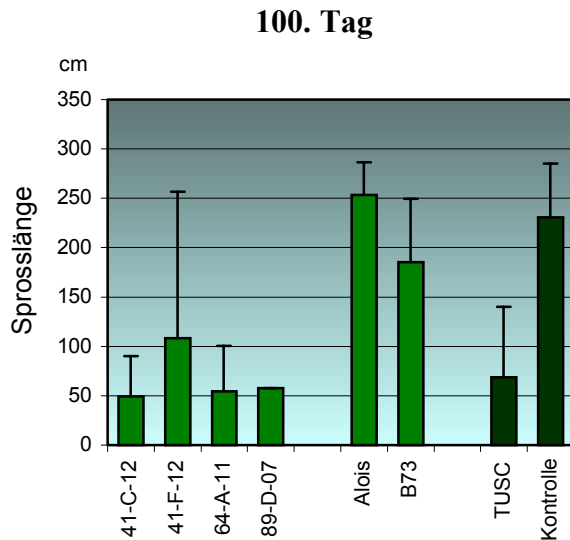
### 3.5.9 Wachstum während des Krümmungstests zur Geotropie

Zu Beginn und nach Beendigung des Experimentes zur geotropen Krümmung der Koleoptile wurde jeweils die Länge der Koleoptile gemessen. Der gemessene Zuwachs in diesen 22 h ist direkt proportional zur Elongationsgeschwindigkeit der Koleoptile. Die Koleoptilen der Kontrollpflanzen streckten sich mehr als doppelt so schnell wie die der TUSC-Mutanten. Dieser auffallende Unterschied im Zuwachs war signifikant, wie der Mann-Whitney-U-Test zeigte (TUSC/Kontrolle:  $p = 0,0422$ ; 41-C-12/Kontrolle:  $p = 0,0253$ ; 89-D-07/Kontrolle:  $p = 0,0335$ ). Nur die 41-F-12-Mutanten zeichneten sich durch eine schnelle Elongation aus (Abb. 3-32), die sich aber nicht signifikant von der Kontrolle unterschied (Student-t-Test:  $p = 0,4420$ ). Insgesamt erreichten die Koleoptilen der Mutante eine geringere Endlänge als die der Kontrollen (Daten nicht gezeigt).



**Abb. 3-32 Zuwachs der Koleoptilen**  
 Aufgetragen wurde der Zuwachs der Koleoptilen vom Drehen in die Horizontale bis zum Versuchsende nach 22 h.

Bei der weiteren Aufzucht bestätigten sich die Ergebnisse der weiter oben beschriebenen Anzuchten (vgl. 3.5.1-3.5.5). Wiederum lag die Überlebensrate der Mutanten bei 50 %, und die Pflanzen blieben kleinwüchsig. Die TUSC-Pflanzen waren im Mann-Whitney-U-Test signifikant kleiner als die Kontrollen ( $p = 0,0012$ ). Selbst die schlecht wachsenden Pflanzen der homozygoten Linie B73 waren signifikant größer als die TUSC-Pflanzen (Mann-Whitney-U-Test:  $p = 0,0177$ ). Es fiel auf, dass die TUSC-Pflanzen, die eine gute geotrope Reaktion zeigten, auch am schnellsten wuchsen. Diejenigen jedoch, die sich nicht oder nur langsam gekrümmt hatten, wuchsen nur sehr langsam. So waren die Pflänzchen der 89-D-07-Familie, die die Schwellenwerte in 7 h nicht erreicht hatten, selbst nach einigen Wochen nicht über wenige Zentimeter hinaus gewachsen und gingen schließlich ein. Die einzige 89-D-07-Pflanze, die die Schwellenwerte während des Versuchs zur Geotropie überschritt, kam zwar zur Blüte, zeigte aber den typischen Zwergenwuchs und erreichte mit knapp 58 cm nach 100 Tagen nicht einmal  $\frac{1}{4}$  der Größe der „Alois“-Kontrollen (253,5 cm) (Abb. 3-33). Die Endgröße dieser Pflanze betrug 79 cm (Abb. 3-34 c). Ebenso wuchs die 64-A-11 Pflanze, die die Schwellenwerte erreichte, bis auf 87 cm in 100 Tagen bzw. bis auf 186 cm am 148. Tag an. Die 64-A-11 Pflanze, die überhaupt keine geotrope Reaktion gezeigt hatte, war am 100. Tag nur 22 cm hoch, wuchs aber bis zum 148. Tag noch zu einer Höhe von 136,5 cm heran (Abb. 3-34 b).



**Abb. 3-33 Sprosshöhe am 100. Tag**  
Die Kontrolle „Alois“ war zu diesem Zeitpunkt bereits ausgewachsen.



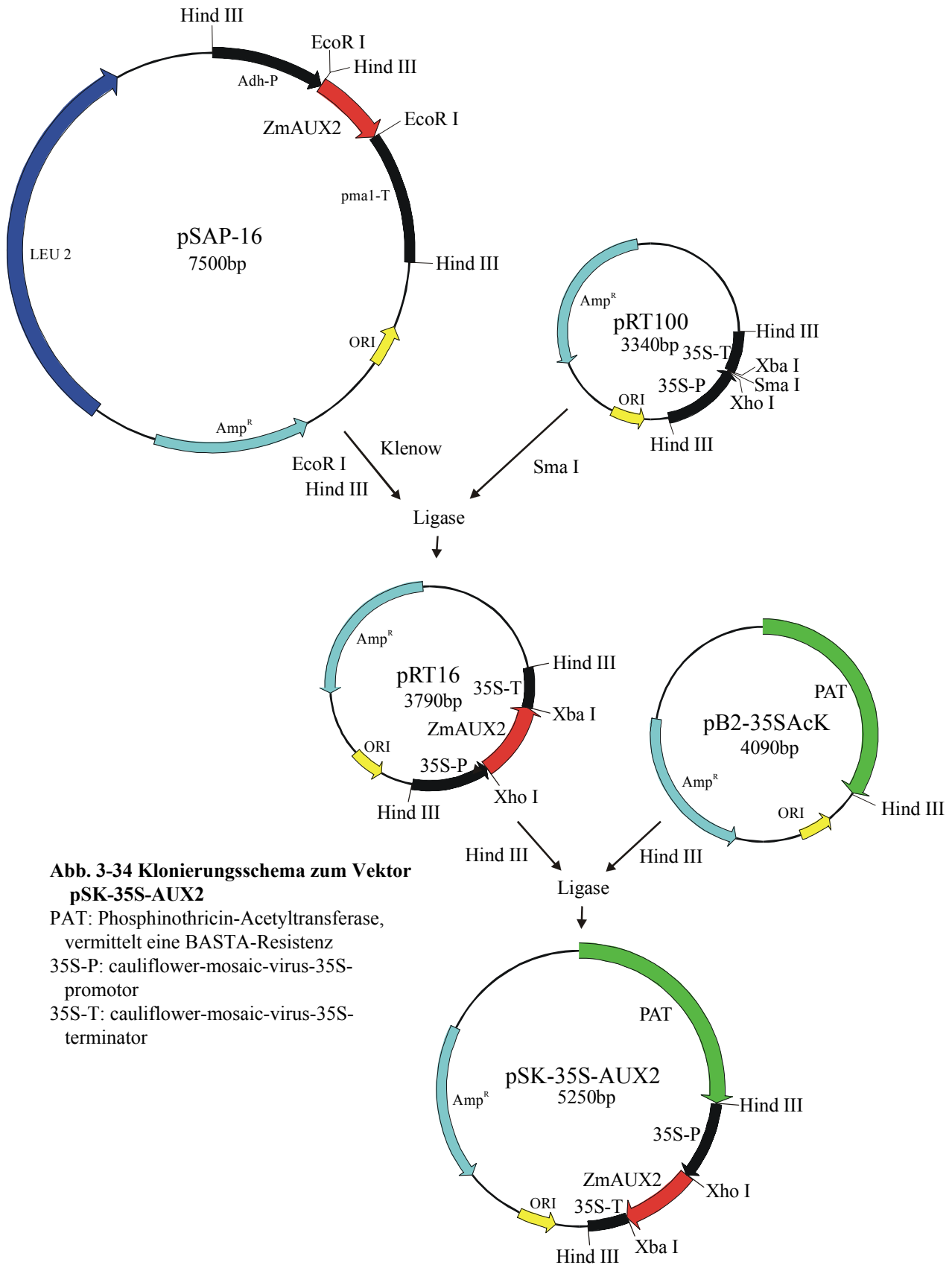
**Abb. 3-34 Adulte, 148 Tage alte Mutanten**

a: 41-C-12 bereits am Vertrocknen, männlicher Blütenstand noch z. T. von der obersten Blattscheide umhüllt, 87 cm hoch; b: 64-A-11 mit Narben anstelle von männlichen Blüten an der Sprossspitze, 136,5 cm hoch; c: 89-D-07 mit männlich sterilem Blütenstand, der z. T. noch von einer Blattscheide umhüllt ist, 79 cm hoch.

„Alois“ hatte bereits nach 100 Tagen das Wachstum abgeschlossen und war bis zum 148. Tag vertrocknet. Insgesamt bestätigten sich also die Ergebnisse aus den Anzuchten zur Bestimmung der Wachstumsparameter (3.5.1-3.5.5). Zudem zeigten Pflanzen mit schlechtem Wachstum auch eine schlechte geotrope Reaktion.

### 3.6 Überexpression des *ZmAUX2*-Gens in Mais

Neben einem Ausschalten könnte die Überexpression des *ZmAUX2*-Gens Einsichten in dessen Funktion zulassen. Vermittelt *ZmAUX2* tatsächlich die starke Elongation der Koleoptile im Dunkeln, so könnte eine Überexpression diese Elongation auch im Licht fördern. Zur Konstruktion eines die Überexpression vermittelnden Vektors wurde zunächst die kodierende Sequenz des *ZmAUX2*-Gens zwischen den konstitutiven *CaMV-35-S*-Promotor und das



**Abb. 3-34 Klonierungsschema zum Vektor pSK-35S-AUX2**

PAT: Phosphinothricin-Acetyltransferase, vermittelt eine BASTA-Resistenz  
 35S-P: cauliflower-mosaic-virus-35S-promotor  
 35S-T: cauliflower-mosaic-virus-35S-terminator

Polyadenylierungssignal im Vektor pRT100 kloniert. Aus dem so erhaltenen Plasmid pRT16 wurde das *ZmAUX2*-Gen mit Promotor und Terminator wieder ausgeschnitten und in den Vektor pB2/35SAcK eingebracht (Abb. 3-34). Dieser Vektor trägt die für die Selektion in

Pflanzen wichtige PAT-Gen-Kassette (Phosphinothricin-Acetyltransferase), die eine Resistenz gegen das Herbizid BASTA vermittelt.

Das erhaltene Konstrukt wurde durch Sequenzieren überprüft und in *Zea mays* eingebracht (5.2.4.5). Die erhaltenen Kalli wurden über PCR auf Transgenität überprüft. Dazu wurden Primer eingesetzt, die am 5'-Ende des konstitutiven 35S-Protomors (PRT S35-5) bzw. am 5'-Ende des *ZmAUX2*-Gens (*Aux2-TUSC5*komplex) binden, also spezifisch für die transgene DNA waren. Eine RT-PCR mit Primern, die am 5'- bzw. 3'-Ende des *ZmAUX2*-Gens binden (*Aux2-TUSC5* und *Aux2-TUSC3*), also nicht spezifisch hinsichtlich der Transgenität sind, sollte zeigen, ob das *ZmAUX2*-Gen auch tatsächlich in den Kalli transkribiert wird. Es gab keinen Grund anzunehmen, dass das endogene *ZmAUX2*-Gen in undifferenzierten Kalli exprimiert wird. 81 % der erhaltenen 59 Klone zeigten sowohl in der PCR als auch in der RT-PCR das erwartete Signal. Aus solchen PCR-positiven Kalli wurden ganze Pflanzen regeneriert, die M36 genannt wurden. Eine zusätzliche Zahl hinter einem T bezeichnete jeweils eine einzelne transformierte Pflanze. Von 21 regenerierten Pflanzen konnten, nach Bestäubung mit Pollen der homozygoten Linie B73, zwischen 10 und 222 Samen geerntet werden. Die Nachkommen einer transformierten Pflanze wurden als Familie dieser Pflanze bezeichnet.

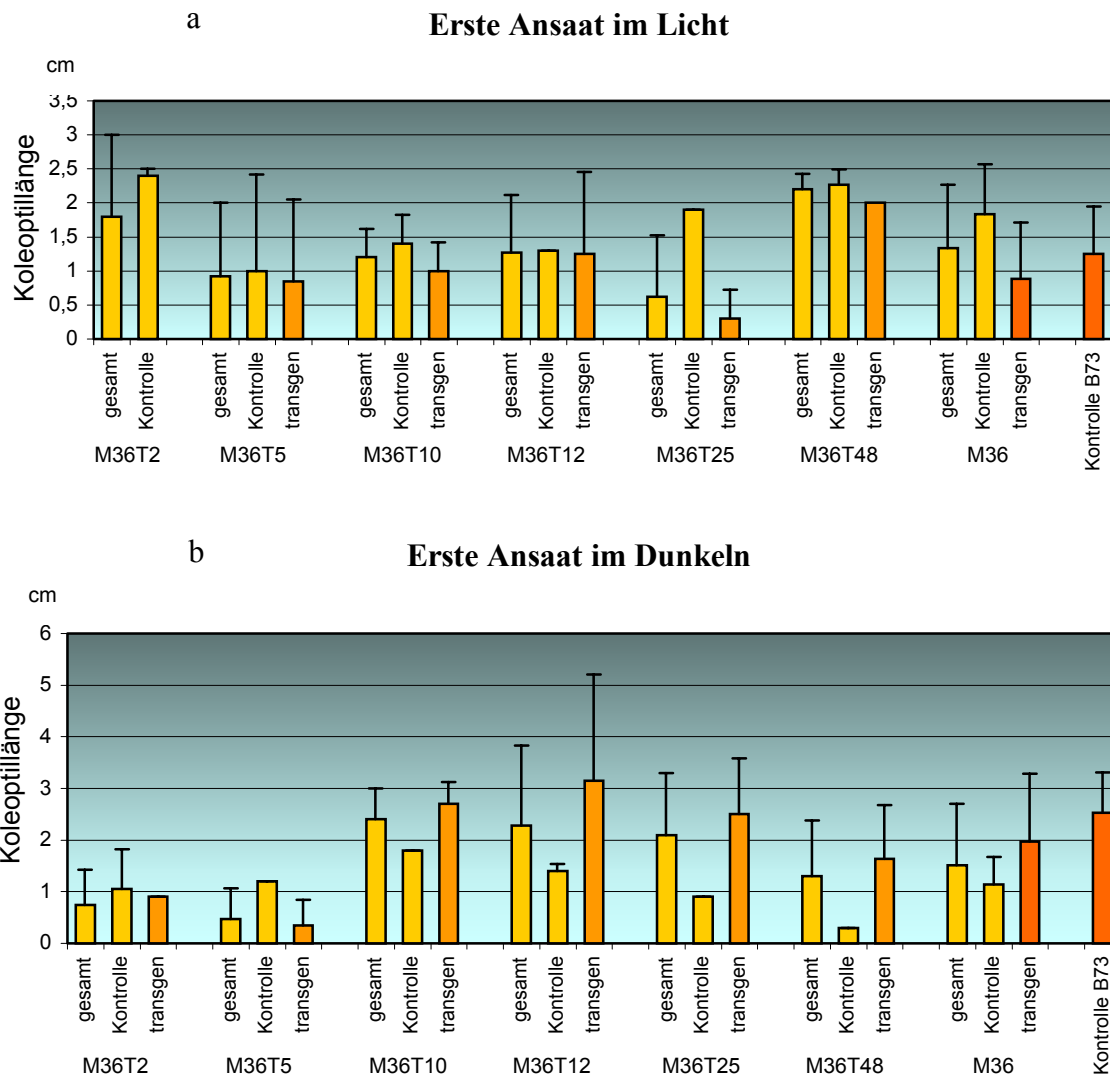
### 3.6.1 Keim- und Überlebensraten

Die Körner dieser F1-Generation wurden in zwei unabhängigen Aussaaten angezogen. Sie keimten mit einer Keimungsrate von 94 % ähnlich gut wie die Kontrollpflanzen. Von allen M36-Keimlingen erreichten 88 % das Erwachsenenalter, innerhalb der M36T49-Familie hingegen war dies lediglich bei 37,5 % der Fall. Die Überlebensrate unterschied sich also bei einzelnen Familien von den Kontrollraten und kann mit den Raten der Transposon-mutagenisierten Pflanzen verglichen werden (vgl. Tab. 3-2).

### 3.6.2 Koleoptil- und Mesokotylwachstum

In einer ersten Anzucht wurden jeweils vier Samen pro Familie im Dauerlicht angezogen, vier weitere im Dauerdunkel. In Abb. 3-35 sind die Längen der Koleoptilen am sechsten Tag nach der Aussaat aufgetragen. Insgesamt war bei den im Licht gewachsenen Koleoptilen kein Unterschied zu den der homozygoten Kontrollpflanzen B73 zu erkennen (Mann-Whitney-U-Test M36gesamt/B73:  $p = 0,7691$ ), die im Dunkel gewachsenen waren im Schnitt signifikant kürzer im Vergleich mit B73 (Mann-Whitney-U-Test M36gesamt/B73:  $p = 0,0478$ ). Da die homozygoten B73-Kontrollpflanzen einen genetisch anderen Hintergrund als die transgenen M36-Familien hatten, ist dieser Vergleich aber wenig aussagekräftig. Um eine bessere Kontrolle zu bekommen, wurden die M36-Keimlinge durch PCR auf Transgenität geprüft (s.o.). Pflänzchen, die in einer solchen Transgenitäts-spezifischen PCR kein Signal ergaben, konnten so als interne Negativkontrolle dienen (in den Abb. jeweils als Kontrolle bezeichnet). Sie waren nicht transgen, sollten aber einen ähnlichen Genotyp haben, wie die transgenen Mitglieder derselben Familie. Der Vergleich der jeweils transgenen M36-Pflanzen mit den M36-Negativkontroll-Pflanzen war nur im Falle der im Licht gewachsenen signifikant (Mann-Whitney-U-Test:  $p = 0,0175$ ), dort waren die transgenen Koleoptilen weniger lang als die Negativkontrollen (Abb. 3-35 a). Bei den im Dunkeln gezogenen Keimlingen waren die Koleoptilen der transgenen im Vergleich zu den nicht-transgenen M36-Pflänzchen zwar etwas länger, der Mann-Whitney-U-Test ergab aber keine gute Signifikanz ( $p = 0,1026$ ). Eine höhere Anzahl an Pflanzen könnte diesen Unterschied besser absichern. Auch um eventuelle

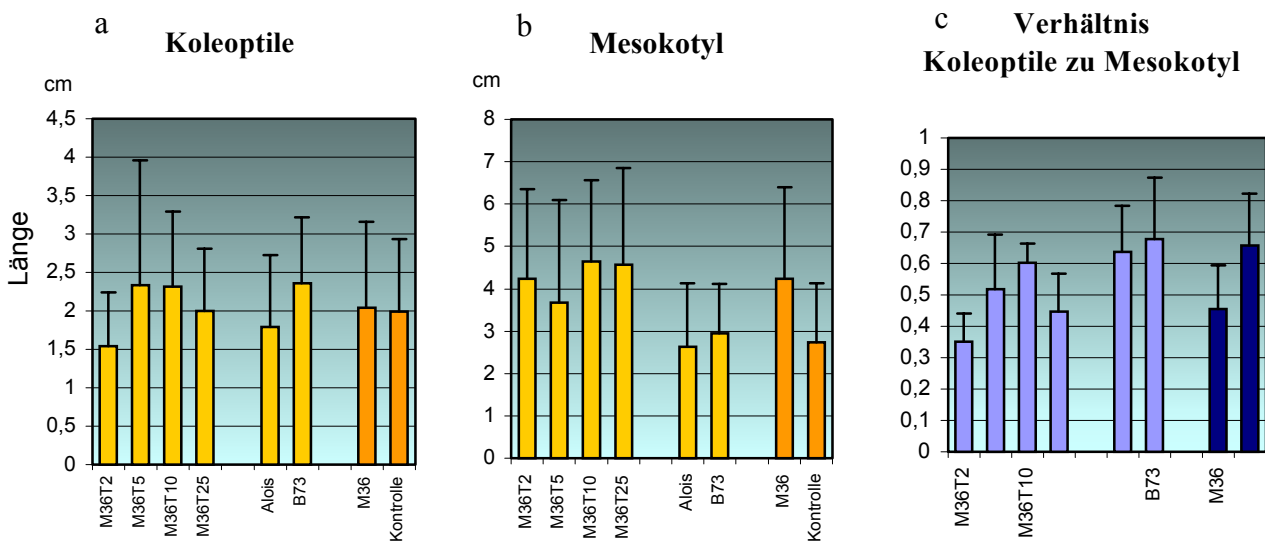
Unterschiede innerhalb einzelner Familien aufzuzeigen, wäre es nötig, eine höhere Anzahl an Pflanzen anzuziehen.



**Abb. 3-35 Länge der sechs Tage alten Koleoptilen**

a: Anzucht erfolgte im Licht; b: Anzucht erfolgte im Dunkeln. Jeweils drei Säulen stehen für eine Familie. Die erste gibt die durchschnittliche Länge aller Koleoptilen dieser Familie an; die zweite, als Kontrolle bezeichnete, steht für die Koleoptilen, die wohl nicht transgen waren, da sie kein richtiges Signal in einer transgenitätsspezifischen PCR ergaben; die dritte, als transgen bezeichnete Säule gibt die Längen der Koleoptilen an, die in einer transgenitätsspezifischen PCR ein Signal der richtigen Größe ergaben. M36 zeigt die Mittelwerte aller angezogenen Pflanzen der verschiedenen M36-Familien. Die jeweils letzte Säule zeigt den Mittelwert der Koleoptilen der homozygoten Linie B73.

Bei dieser ersten Anzucht waren lange Mesokotylabschnitte aufgefallen. Deshalb wurden nochmals Körner ausgesät im Dunkeln angezogen und am fünften Tag Koleoptil- und Mesokotyllängen vermessen (Abb. 3-36). Zudem wurde als weitere Kontrolle Samen des Hybridmais „Alois“ mit ausgesät. Wieder unterschieden sich die M36-Koleoptilen nicht signifikant von den Kontroll-Koleoptilen (Mann-Whitney-U-Test M36gesamt/Kontrolle:  $p = 0,8544$ ) (Abb. 3-36 a). Das Mesokotyl der M36-Keimlinge war jedoch nach fünf Tagen im Dunkeln insgesamt signifikant länger als das der Kontrollen „Alois“ und B73 (Mann-Whitney-U-Test M36gesamt/Kontrolle:  $p = 0,0002$ ) (Abb. 3-36 b).



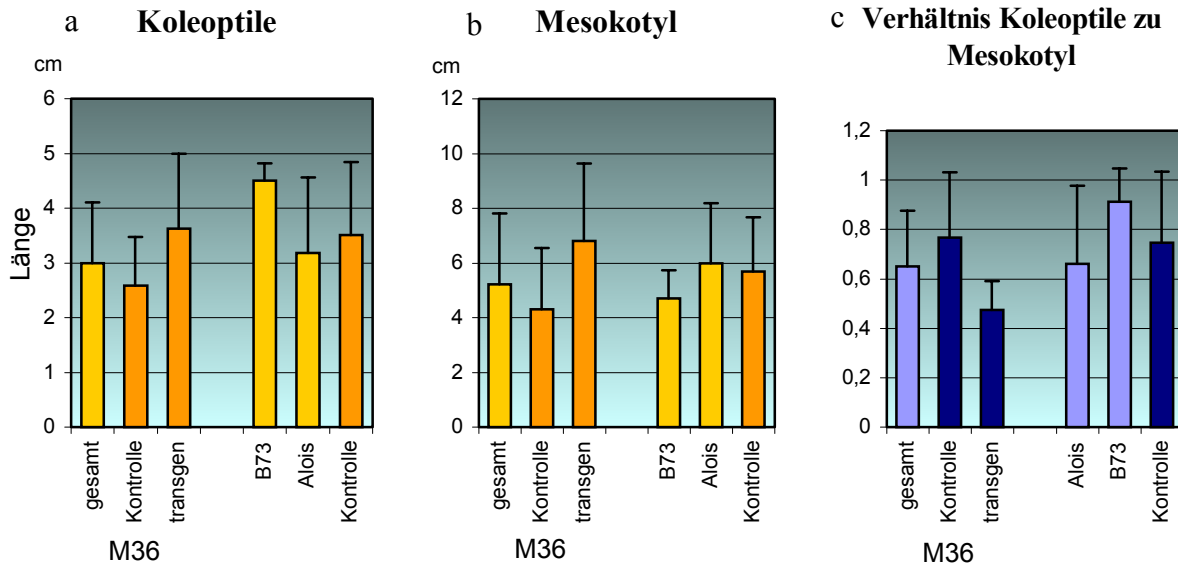
**Abb. 3-36 Koleoptil- und Mesokotyl-Längen von fünf Tage alten Keimlingen**

a: Länge der Koleoptilen, b: Länge des Mesokotyls; c: Verhältnis von Koleoptillänge zu Mesokotyllänge. Berücksichtigt wurden nur Pflanzen, deren Mesokotyl 3,5-6 cm lang waren. Angezogen wurde fünf Tage im Dunkeln.

Um Keimlinge eines ähnlichen Entwicklungsstadiums vergleichen zu können, wurde in Abb. 3-36 c nur das Koleoptil-Mesokotyl-Verhältnis von Sämlingen einbezogen, deren Mesokotyl zwischen 3,5 und 6 cm lang waren. Tatsächlich ergab sich für die M36-Pflänzchen dieses Stadiums ein signifikant kleineres Koleoptil-Mesokotyl-Verhältnisse als bei den Kontrollen „Alois“ und B73 (Mann-Whitney-U-Test M36gesamt/Kontrolle:  $p = 0,0038$ ). Auch bei anderer Auswahl des Fensters zum Entwicklungsstadium erhielt sich dieses kleinere Koleoptil-Mesokotyl-Verhältnis im Vergleich zur Kontrolle (Daten nicht gezeigt).

In einer weiteren Anzucht (im folgenden als zweite Anzucht bezeichnet) war wiederum kein signifikanter Unterschied der Koleoptillängen der M36-Keimlinge insgesamt im Vergleich zur „Alois“ und B73 Kontrolle (Mann-Whitney-U-Test M36gesamt/Kontrolle:  $p = 0,1792$ ) zu ermitteln. Betrachtet man jedoch die transgenen Pflänzchen im Vergleich zur internen Kontrolle, so ergab sich zwar nicht im Mann-Whitney-U-Test ( $p = 0,0949$ ), jedoch im Student-t-Test ( $p = 0,0303$ ) eine Signifikanz, und es spricht nichts gegen die Annahme, die Koleoptillängen seien nach Gaus verteilt (Abb. 3-37 a). Bei der Betrachtung des Mesokotyls ergibt auch der Mann-Whitney-U-Test einen signifikanten Unterschied zwischen transgenen und nicht-transgenen M36-Keimlingen ( $p = 0,0272$ ) (Abb. 3-37 b). Das Koleoptil-Mesokotyl-Verhältnis der transgenen Pflanzen war im Vergleich zu dem der M36-Kontrollpflänzchen bzw. der „Alois“-B73-Kontrolle deutlich kleiner. Die Anzahl der transgenen Keimlinge war für eine statistische Absicherung aber zu gering.

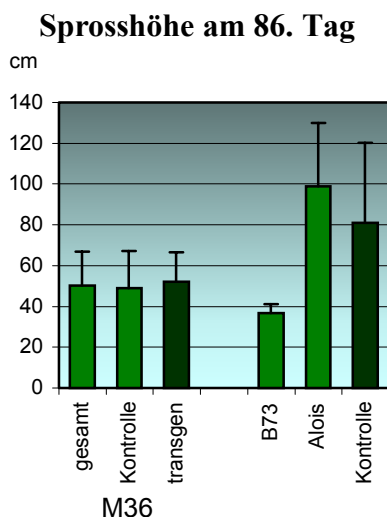
Die Überexpression des *ZmAUX2*-Gens bewirkt also im Dunkeln ein verstärktes Wachstum der Koleoptile und in noch stärkerem Maße des Mesokotyls, wie die Koleoptil-Mesokotyl-Verhältnisse zeigten. Im Licht jedoch scheint die Überexpression zu einem verzögerten Wachstum der Koleoptile zu führen.



**Abb. 3-37 Koleoptil- und Mesokotyl-Längen von sechs Tage alten Keimlingen der zweiten Anzucht**  
 a: Länge der Koleoptilen; b: Länge des Mesokotyls; c: Verhältnis von Koleoptillänge zu Mesokotyllänge.  
 Berücksichtigt wurden nur Pflanzen, deren Mesokotyl 3,5-6 cm lang waren. Die Anzucht erfolgte im Dunkeln.

3.6.3. Sprosswachstum

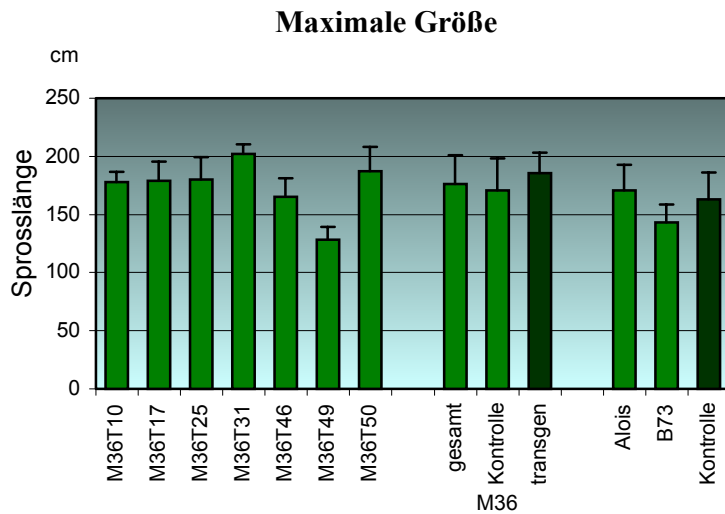
In der ersten Anzucht wuchsen die M36-Pflanzen deutlich schneller als die homozygoten B73-Pflanzen. Deshalb wurde bei der zweiten Anzucht der Hybridmais „Alois“ als zweite Kontrolle zusätzlich angezogen. Dieser zeigte ein deutlich schnelleres Wachstum als die M36- und die B73-Pflanzen, wie ein Vergleich der Sprosslängen am 86. Tag der Anzucht zeigte (Mann-Whitney-U-Test M36gesamt/Kontrolle:  $p = 0,0281$ ) (Abb. 3-38). Zwischen transgenen und nicht-transgenen M36-Pflanzen konnte aber kein signifikanter Unterschied mehr festgestellt werden (Mann-Whitney-U-Test:  $p = 0,5712$ ).



**Abb. 3-38 Sprosshöhe 86 Tage alter Pflanzen**  
 M36: Mittelwerte aller M36-Familien der zweiten Anzucht. Die Pflanzen waren ab dem siebten Tag im Gewächshaus angezogen worden.

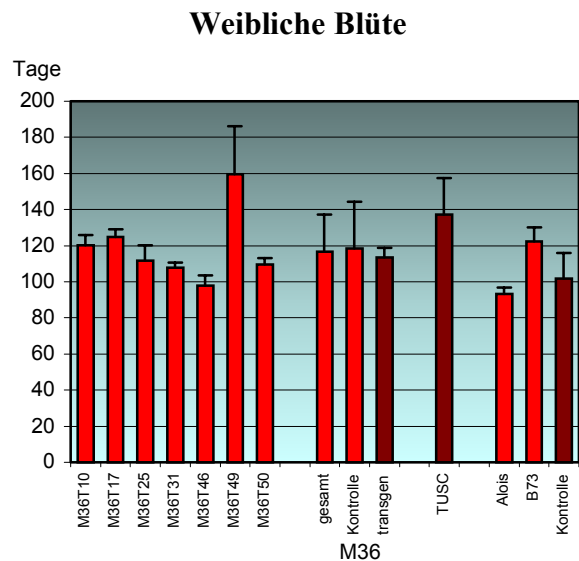
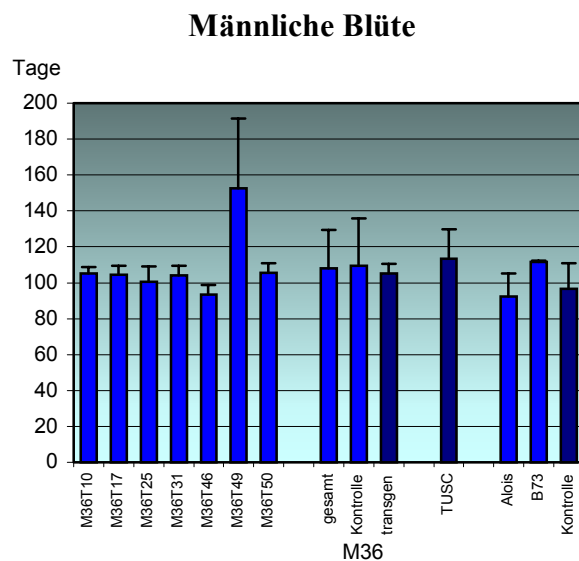
Das etwas langsamere Wachstum konnten die M36-Pflanzen durch eine etwas längere vegetative Phase aufholen, und konnten die „Alois“-Kontrolle letzten Endes sogar noch übergipfeln (Abb. 3-39). Nur die M36T49-Familie blieb weit kleiner als die Kontrolle. Die transgenen M36-Pflanzen sind signifikant größer als die „Alois“-B73-Kontrolle (Mann-Whitney-U-Test:  $p = 0,0182$ ), die M36-Pflanzen insgesamt (Mann-Whitney-U-Test:  $p = 0,0895$ ) oder die interne Negativkontrolle (Mann-Whitney-U-Test:  $p = 0,4058$ ) jedoch nicht.

Die Pflanzen der internen Negativkontrolle blieben etwas kleiner als die transgenen Pflanzen; der Unterschied war allerdings nicht signifikant (Mann-Whitney-U-Test:  $p = 0,1336$ ).



**Abb. 3-39 Endgröße der M36-Pflanzen**  
Erste bis siebte Säule: Mittelwert der Sprosslängen aller Pflanzen der jeweiligen Familie; letzte Säule: Mittelwert der „Alois“ und B73-Pflanzen.

Die verlängerte vegetative Phase machte sich in einem etwas verzögerten Blühbeginn gegenüber dem Hybridmais „Alois“ bemerkbar. Die Verzögerung war allerdings weit geringer als bei den TUSC-Pflanzen, deren *ZmAUX2*-Gen durch ein Transposon disruptiert ist (Abb. 3-40; vgl. 3.5.5). Nur bei der M36T49-Familie war sie sogar noch dramatischer und auch signifikant (Mann-Whitney-U-Test „Alois“/M36T49: männliche Blüte:  $p = 0,0140$ , weibliche Blüte:  $p = 0,0070$ ). Da M36T49 die einzige Familie mit solchem Verhalten war, kann dies jedoch nicht auf eine *ZmAUX2*-Überexpression zurück geführt werden. Die transgenen M36-Pflanzen blühen noch etwas vor den M36-Kontrollpflanzen, es konnte aber keine Signifikanz nachgewiesen werden. Die geringe Verzögerung geht also wohl nicht auf die Transgenität der M36-Pflanzen zurück, sondern ist eher stammspezifisch.



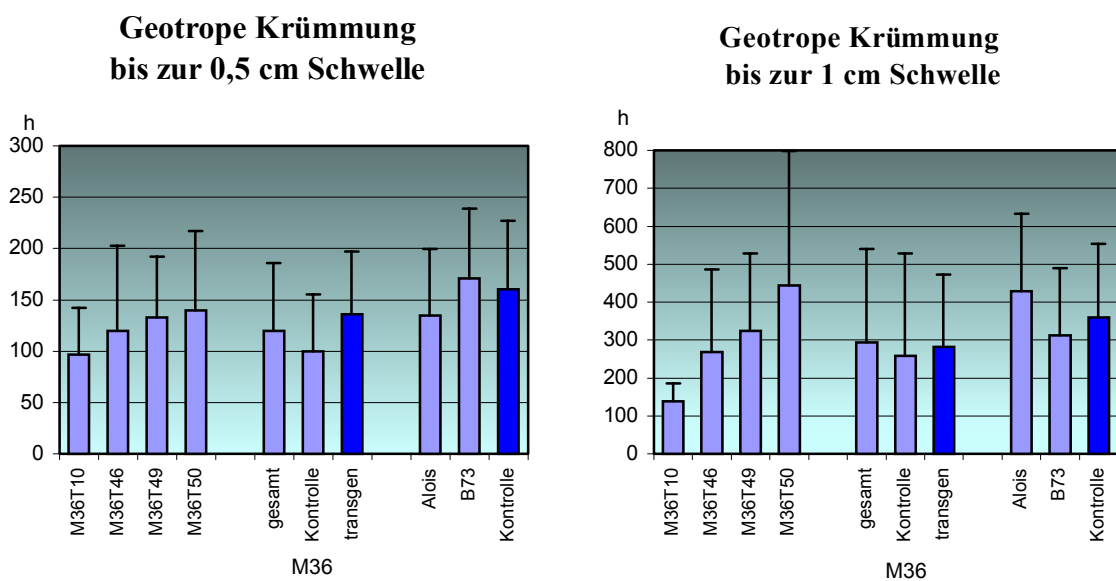
**Abb. 3-40 Beginn der Blüte**

Aufgetragen sind die Anzahl der Tage ab Aussaat bis zum ersten freigesetzten Pollen, bzw. bis zum Erscheinen der ersten Narbe. Gezeigt sind die Werte der zweiten Anzucht, die sich von den Werten der erste Anzucht nicht wesentlich unterschieden. Zum Vergleich sind die Werte der Transposon-mutagenisierten Pflanzen (TUSC) mit aufgetragen.

Die Überexpression des *ZmAUX2*-Gens scheint also die Elongation der Koleoptile und des Mesokotyls zu beeinflussen. Das Wachstum des Sprosses wird aber höchstens geringfügig gesteigert.

### 3.6.4 Gravitrope Reaktion

Auch bei den M36-Familien wurde die gravitrope Reaktion getestet (5.2.1.4). Die Koleoptilen zeigten eine gute geotrope Reaktion, die sogar etwas schneller war als bei den Kontrollen, was aber an Stammunterschieden liegen könnte (Abb. 3-41). Darauf deutet auch die interne Negativkontrolle hin. Die transgenen Koleoptilen zeigten eine eher schlechtere geotrope Reaktion als diese Negativkontrolle; der Unterschied war aber nicht signifikant im Mann-Whitney-U-Test (0,5 cm Schwelle:  $p = 0,0687$ ).

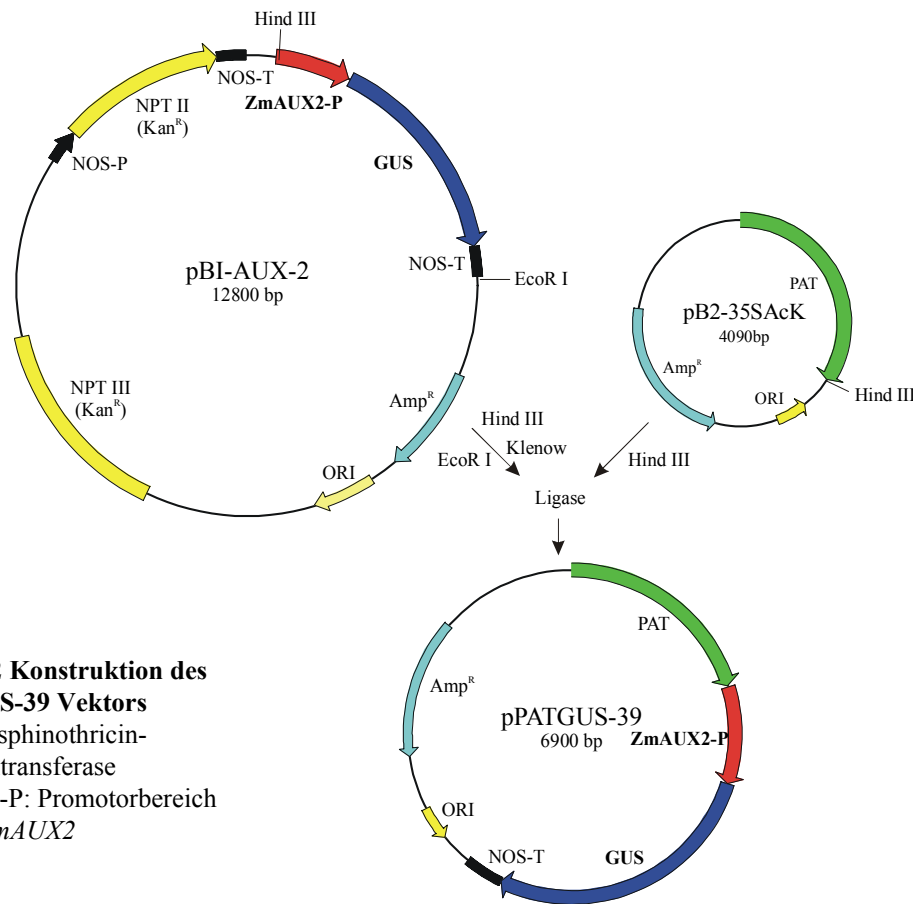


**Abb. 3-41 Geotrope Krümmung der M36-Koleoptilen**

Aufgetragen wurde die Zeit, die die Koleoptilenspitze brauchte, um 0,5 cm (a) bzw. 1 cm (b) über den Ausgangspunkt zu kommen. In b wurde für Koleoptilen, die die Schwelle in der Versuchszeit nicht erreichten, dies aber bis zum nächsten Tag schafften, eine Pauschale von 600 min einberechnet; für solche die auch dann noch keine Reaktion zeigten, eine von 1200 min. In a wurden nur Koleoptilen berücksichtigt, die die 0,5 cm Schwelle auch tatsächlich erreichten.

## 3.7 Promotorstudien des *ZmAUX2*-Gens in Mais mittels Reportergenfusion

Zur Untersuchung des Expressionsmusters des *ZmAUX2*-Gens in *Zea mays* wurde ein Vektor konstruiert, der im Prinzip dasselbe Konstrukt trägt, das bereits für die heterologen Expressionsstudien in Tabak (vgl. 3.4) eingesetzt wurde. Dieser Vektor pPATGUS-39 sollte nun im homologen System die Expression des  $\beta$ -Glucuronidase-Reportergens unter der Kontrolle des *ZmAUX2*-Promotors vermitteln. Zur Selektion richtiger Transformanten ist auf dem Mais-Vektor zusätzlich das PAT-Gen vorhanden. (Abb. 3-42). Der Vektor wurde durch Sequenzieren überprüft und in *Zea mays* eingebracht (5.2.4.5).



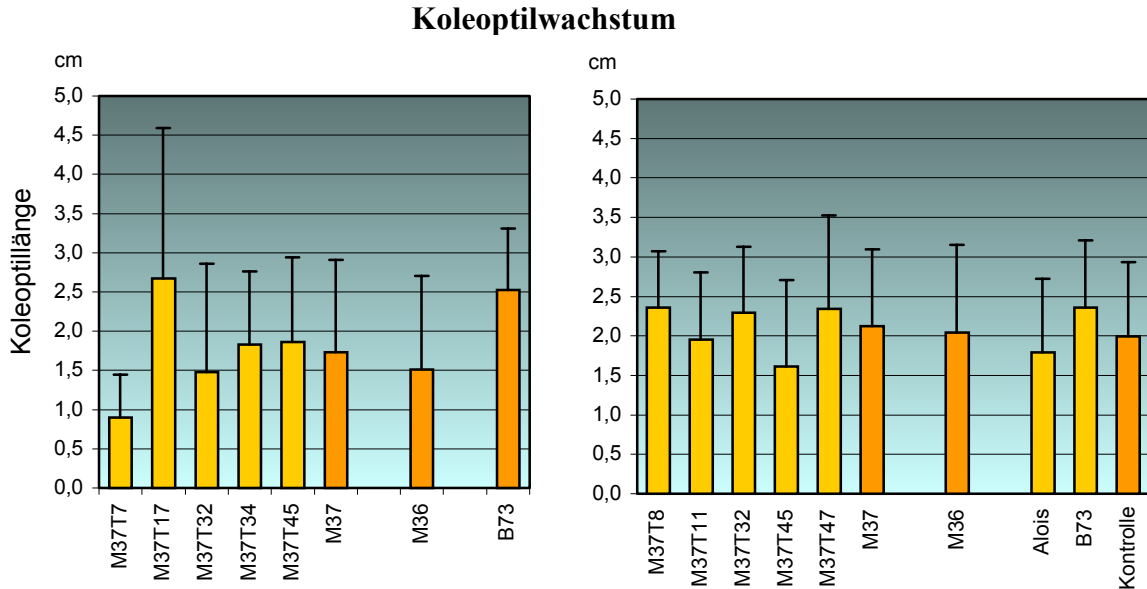
**Abb. 3-42 Konstruktion des pPATGUS-39 Vektors**  
 PAT: Phosphinothricin-Acetyltransferase  
 ZmAUX2-P: Promotorbereich von *ZmAUX2*

Erhaltene Kalli wurden mittels PCR überprüft. In zwei PCR-Ansätzen wurde zum einen mit Primern, die am 5'-Ende des *ZmAUX2*-Promotors bzw. am 5'-Ende des  $\beta$ -Glucuronidase-Gens banden (Aux2TUSCProm5 und GUS5kompl), zum anderen mit Primern, die am 5'-Ende und am 3'-Ende des  $\beta$ -Glucuronidase-Gens banden (GUS5 und GUS3), spezifisch das gesamte eingebrachte Konstrukt amplifiziert. Von 51 Kalli zeigten 61 % in beiden PCR-Ansätzen das erwartete Signal. Aus positiven Kalli wurden ganze, M37 genannte Pflanzen regeneriert. Von elf M37-Pflanzen konnten, nach Bestäubung mit Pollen der homozygoten Linie B73, zwischen 40 und 428 Körner geerntet werden. Nachkommen einer regenerierten Pflanze wurden als M37-Familie bezeichnet, ein T mit einer Zahl bezeichnete die jeweilige transformierte Pflanze. Aus den erhaltenen Körnern wurden zunächst Koleoptile gezogen und auf  $\beta$ -Glucuronidase-Aktivität getestet, allerdings konnte nirgendwo eine solche nachgewiesen werden. Auch andere Gewebe wurden unter Verwendung verschiedener Puffern auf Aktivität hin untersucht. Jedoch wurden lediglich sehr schwache, unspezifische Färbungen erhalten.

### 3.7.1 Koleoptilwachstum

Da selbst in etiolierten Koleoptilen, in denen das *ZmAUX2*-Gen nachweislich exprimiert wird (vgl. 3.1), keinerlei GUS-Aktivität detektiert werden konnte, wurde an die Möglichkeit eines HDGS („homology-dependent gene silencing“) der rekombinanten Gene gedacht. Durch eingebrachte Gene können auch endogene homologe Gene stillgelegt werden (KOOTER *et al.*, 1999). Deshalb wurden die Pflanzen der M37-Familien auf einen abweichenden Phänotyp hin untersucht. Im Wachstum unterschieden sich die M37-Familien nicht signifikant von den M36-Familien (vgl. 3.6). Sie keimten wie diese sehr gut, mit einer Keimrate von 96 %. Die

Überlebensrate aller M37-Familien zusammen lag bei 52 %, nur eine M37-Familie, die M37T45-Familie, hatte mit 38 % eine Überlebensrate von unter 50 %. Die M37-Koleoptilen waren am sechsten Tag ähnlich kurz wie die M36-Koleoptilen, welche das Konstrukt zur Überexpression de *ZmAUX2*-Gens trugen (vgl. 3.6.2; Abb. 3-43).

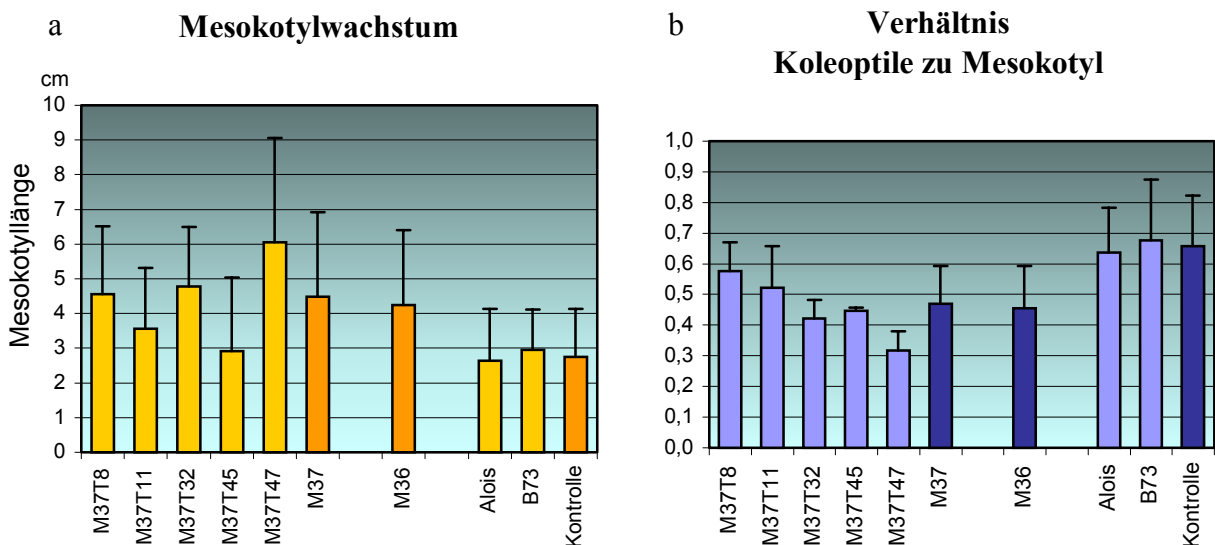


**Abb. 3-43 Durchschnittliche Länge der Koleoptilen**

Sechs Tage alte Koleoptile zweier unabhängiger Aussaaten wurden vermessen; M37: alle M37-Familien zusammen; M36: M36-Familien zusammen (vgl. Abb. 3-35 b, Abb. 3-36 a); Kontrolle: Kontrolle „Alois“ und B73 zusammen

### 3.7.2 Mesokotylwachstum

Die Mesokotylabschnitte waren wie bei den M36-Familien länger als die der Kontrollen „Alois“ und B73, und die Koleoptil-Mesokotyl-Verhältnisse kleiner (Abb. 3-44). Signifikante Unterschiede zwischen M37- und M36-Pflanzen konnten aber nicht ermittelt werden.

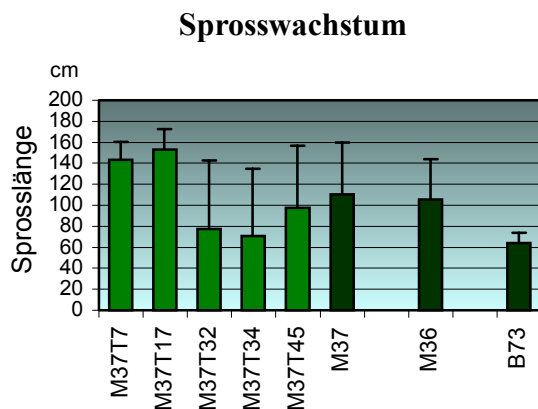


**Abb. 3-44 Mesokotylwachstum**

a: Länge des Mesokotyls; b: Verhältnis von Koleoptillänge zu Mesokotyllänge, berücksichtigt wurden nur Pflanzen deren Mesokotyl 3,5-6 cm lang waren. M37: Mittelwert aller Pflanzen der M37-Familien; M36: Mittelwert aller Pflanzen der M36-Familien; Kontrolle: Mittelwert aller „Alois“- und B73-Pflanzen.

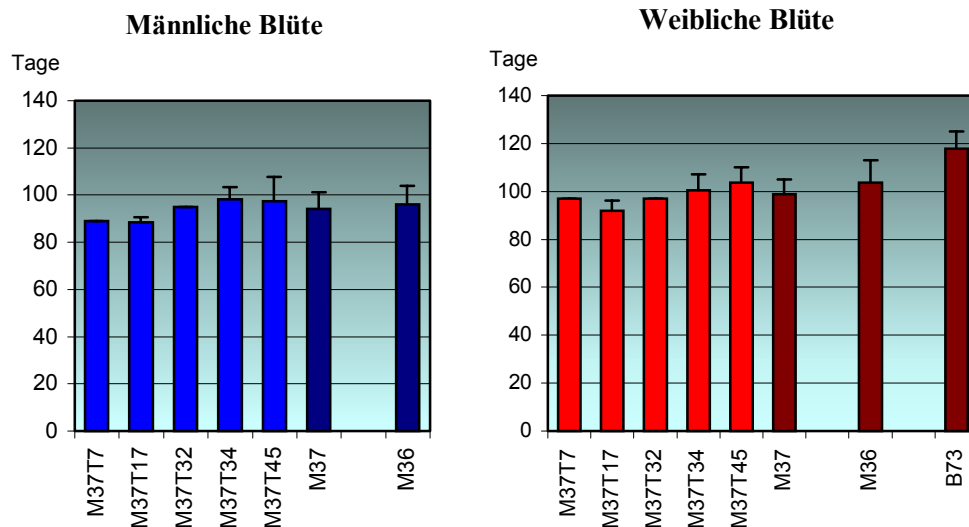
### 3.7.3 Sprosswachstum

Auch im weiteren Wachstum verhielten sich die M37-Pflanzen nicht signifikant anders als die M36-Familien. Sie erreichten ähnliche Größen in vergleichbaren Zeiträumen (Abb. 3-45).



**Abb. 3-45 Durchschnittliche Sprosshöhe**  
88 Tage alte Pflanzen waren im Gewächshaus angezogen und die Sprosslänge gemessen worden

Ähnlich wie die M36-Pflanzen blühten die M37-Pflanzen signifikant vor den B73-Kontrollpflanzen, die in dieser Anzucht männlich steril blieben (Mann-Whitney-U-Test: M36/B73:  $p = 0,0002$ ; M37/B73:  $p < 0,0001$ ). Die M37-Pflanzen blühten aber nicht signifikant vor den M36-Pflanzen (Abb. 3-46).



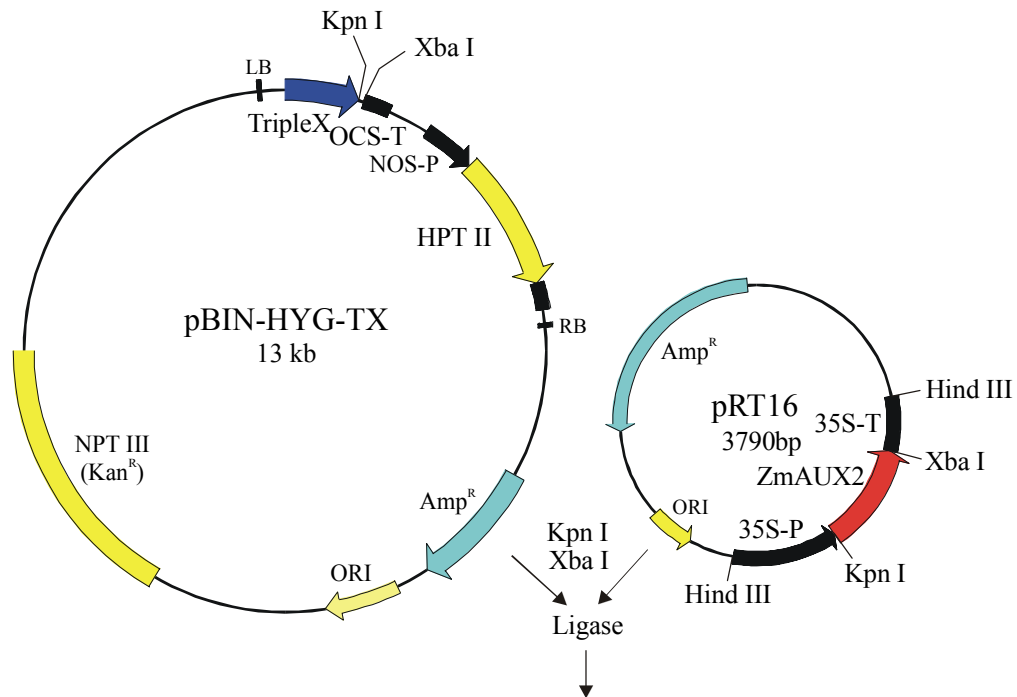
**Abb. 3-46 Beginn der jeweiligen Blühphase**

Aufgetragen sind die Anzahl der Tage ab Aussaat bis zum ersten freigesetzten Pollen, bzw. bis zum Erscheinen der ersten Narbe. M37: Mittelwert aller Pflanzen der M37-Familien; M36: Mittelwert aller Pflanzen der M36-Familien.

## 3.8 ZmAUX2-Expression durch einen Tetracyclin-induzierbarer Promotor

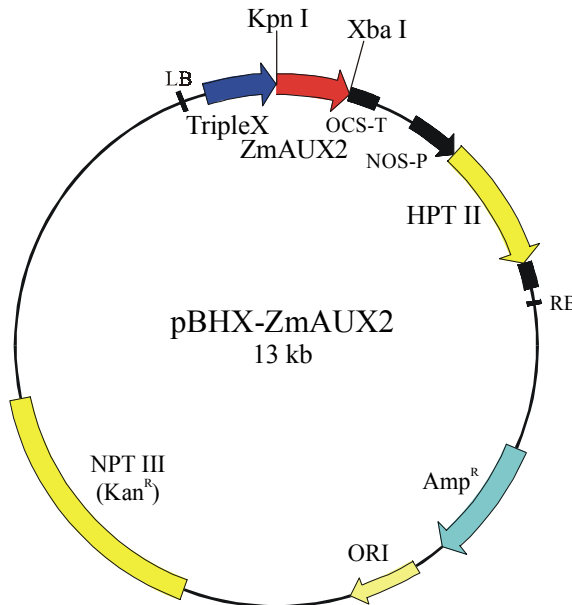
Die Verwendung eines induzierbaren Promotors zur Untersuchung der Funktion eines Gens hat gegenüber der Verwendung eines konstitutiven Promotors mehrere Vorteile. So wird es möglich auch die Funktion von Genen, deren konstitutive Überexpression die Pflanzen bereits früh absterben lässt, in adulten Pflanzen zu untersuchen. Es können Effekte in verschiedenen Entwicklungsstufen von Pflanzen, die bis dahin unbeeinflusst gewachsen waren, untersucht werden. Oder es können Effekte sichtbar werden, die bei konstitutiver Expression durch eine

Kompensation unsichtbar bleiben. Deshalb sollte die spezifische Wirkung des ZmAUX2-Genproduktes auch mit einem induzierbaren Promotor untersucht werden. Für Mais wurde bisher aber noch kein System einer induzierbaren Promotion erfolgreich etabliert. In Tabak jedoch konnte mit einem Tetracyclin-induzierbaren Promotor bereits erfolgreich Gene gezielt angeschaltet werden (WEINMANN *et al.*, 1994). Da der ZmAUX2-Promotor im heterologen Tabaksystem zu funktionieren scheint (vgl. 3.4), ZmAUX- bzw. SAUR-Gene konserviert sind und ein System mit einem Tetracyclin-induzierbaren Promotor in Tabak im Institut bereits erprobt war, wurde auf dieses System ausgewichen.



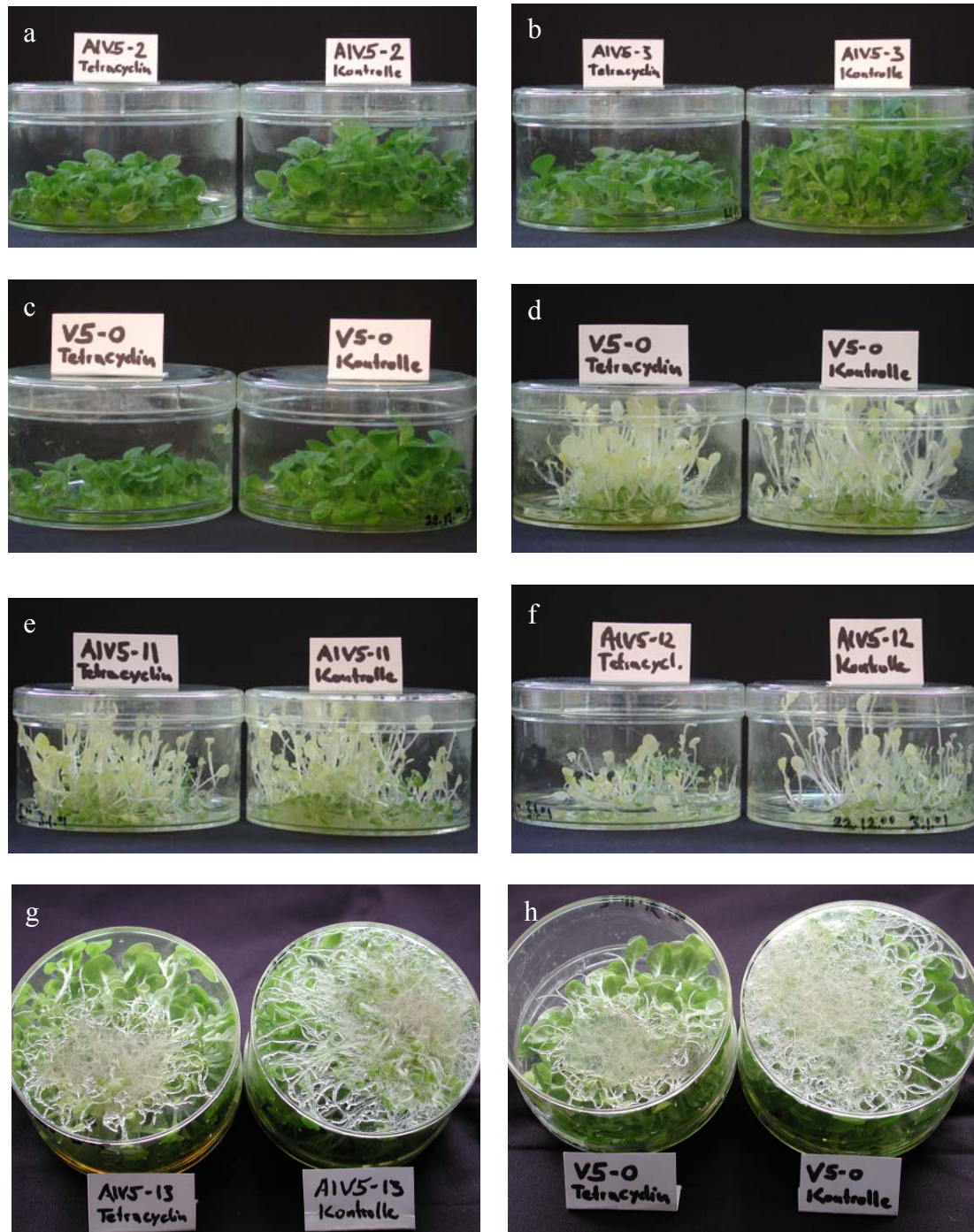
**Abb. 3-47 Klonierungsstrategie von pBHx-ZmAUX2**

TripleX: chimärer CaMV 35S Promotor mit drei TetR-Bindestellen  
 OCS-T: Octopinsynthase-Terminator  
 HPT II: Hygromycin-Phosphotransferase



Im Zentrum des Tabaksystems steht ein chimärer *CaMV*-35S-Promotor, der drei Bindestellen für einen Tet-Repressor (TetR) enthält. Bindet TetR an diese Stellen (TripleX), so kann eine

nachfolgende kodierende Sequenz nicht transkribiert werden. Eine Zugabe von geringen Mengen an Tetracyclin verhindert jedoch die Repression durch TetR (WEINMANN *et al.* 1994). Zunächst wurde der Vektor pBHX-ZmAUX2 konstruiert. Dieser trägt hinter dem induzierbaren *CaMV 35S*-Promotor mit drei TetR-Bindestellen (TripleX) die kodierende *ZmAUX2*-Sequenz. Dafür wurde aus pRT16 die kodierende *ZmAUX2*-Sequenz *Kpn I-Xba I* ausgeschnitten und in den Vektor pBIN-HYG-TX ligiert, der ebenfalls *Kpn I-Xba I* geschnitten war (Abb. 3-47).

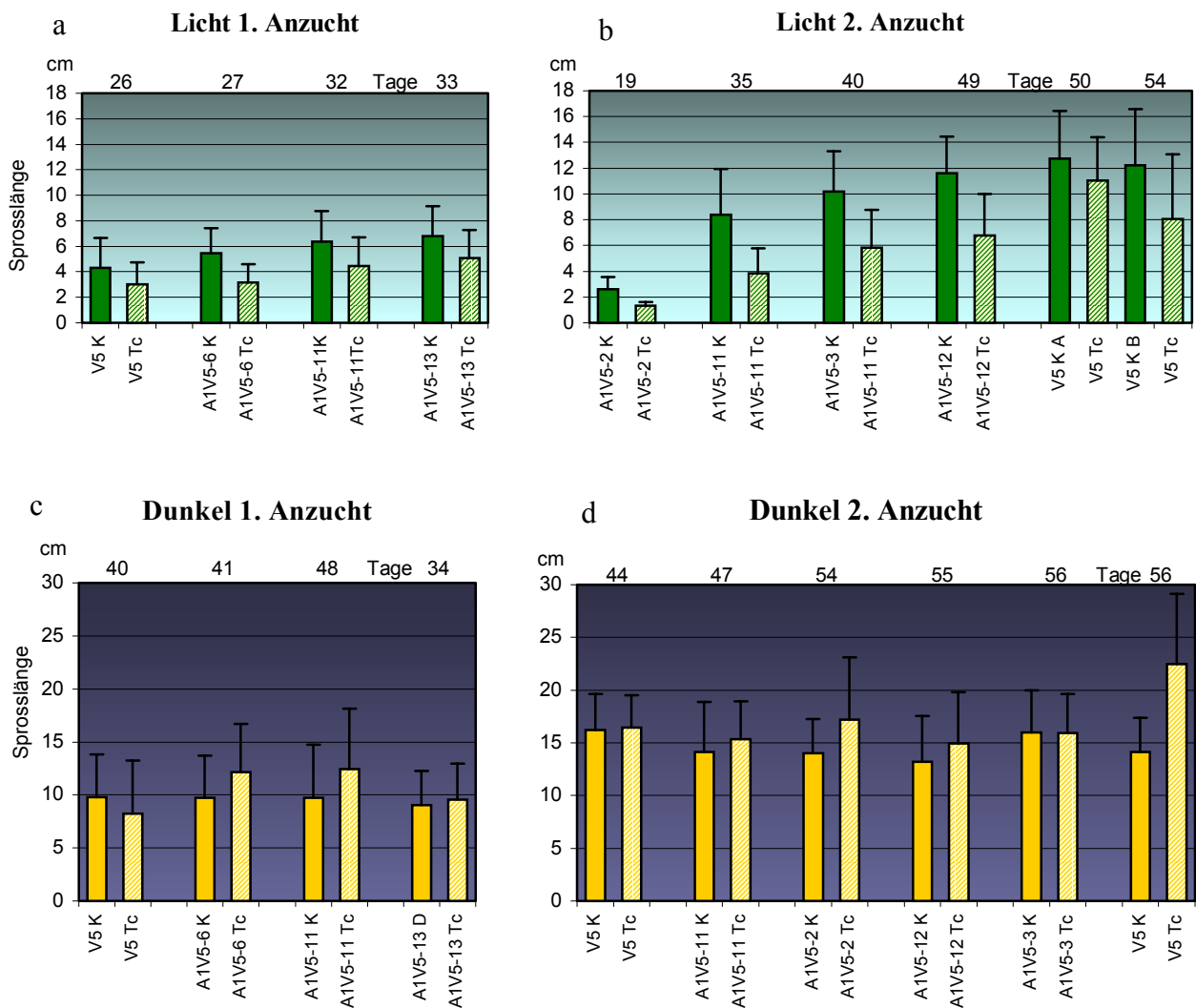


**Abb. 3-48 Wachstum der pBHX-ZmAUX2 tragenden Tabakkeimlinge**

Jeweils links gezogen in Flüssigmedium mit Tetracyclin, rechts ohne Tetracyclin. a -f: nach 12 Tagen Anzucht wurde auf Flüssigmedium verfrachtet, a und b: waren noch 12 Tage auf Flüssigmedium gewachsen, c-f: waren noch 13 Tage auf Flüssigmedium gewachsen, g und h: waren nach 15 Tagen Festmedium noch 19 Tage auf Flüssigmedium gewachsen; c, d und h: Kontrolle V5, ohne pBHX-ZmAUX2.

Das Plasmid pBHX-ZmAUX2 wurde über Agrobakterien in eine Tabakpflanze, die bereits transgen das tetR-Gen hinter dem konstitutiven *CaMV 35S*-Promotor trug und so genügende Mengen an TetR produzierte, eingebracht. Selektiert wurde bei dieser Transformation mit 40 mg/l Hygromycin. Von über hundert Transformanten, A1V5 genannt (die einzelnen Transformanten wurden mit noch einer zusätzlichen Zahl benannt), konnten ganze Pflanzen regeneriert werden. Von 30 regenerierten Pflanzen wurden nach Selbstbestäubung Samen geerntet und oberflächensterilisiert (5.2.4.4).

Tabak wächst deutlich langsamer als Mais, deshalb sind die Elongationsraten des Tabakhypokotyls, anders als bei der Maiskoleoptile, nur mit Hilfe eines Extensometers messbar, bei dem das Hypokotyl eingespannt wird und dann der Zuwachs über die Zeit registriert wird. Da kein solches Gerät zur Verfügung stand, wurde versucht, über eine länger andauernde Inkubation bereits mit bloßem Auge sichtbare Effekte zu erzielen (5.2.1.7). Dazu wurden Samen steril in Dosen auf MS-Medium angezogen und nach ein bis zwei Wochen gleich große Agarstücke mit etwa gleich vielen Sämlingen ausgeschnitten und in sterile Dosen mit flüssigem Medium, mit bzw. ohne Tetracyclin, verfrachtet. Dieses Medium wurde alle zwei bis drei Tage gewechselt, da Tetracyclin in der Pflanzenkultur nicht stabil ist (GATZ, 1995).



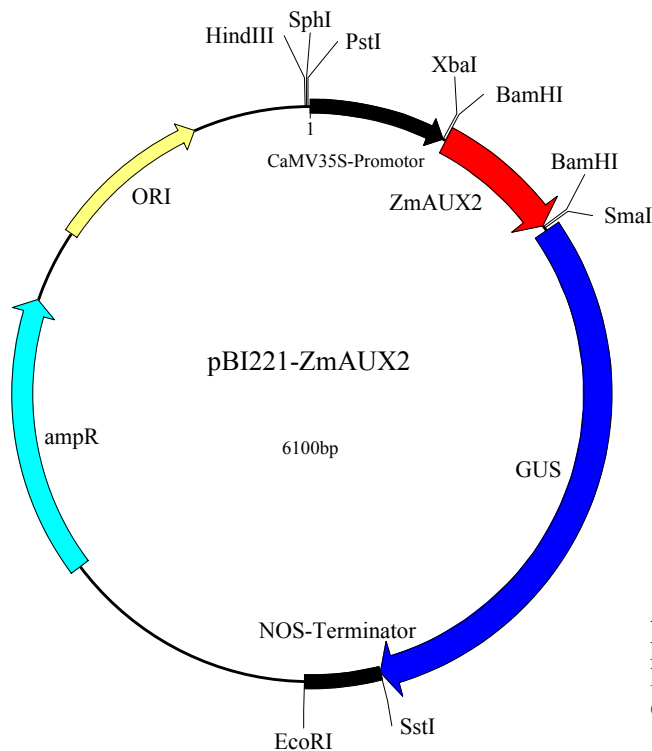
**Abb. 3-49 Wachstumseffekt nach durch induzierte Expression des *ZmAUX2*-Gens durch Tetracyclin**  
 Die Keimlinge waren bei der Messung jeweils so viele Tage alt wie über den Säulen angegeben; Keimlinge der ersten Anzucht waren die ersten 15 Tage, der zweiten Anzucht die ersten 12 Tage auf Festmedium gewachsen; K: auf Flüssigmedium ohne Tetracyclin gewachsen; Tc: auf Flüssigmedium mit Tetracyclin gewachsen.

Zunächst schienen die mit Tetracyclin behandelten Pflanzen langsamer zu wachsen als die jeweiligen Kontrollen ohne Tetracyclin, und dies unabhängig, ob im Licht oder im Dunkeln gezogen (Abb. 3-48 a und b, bzw. e und f; Abb. 3-49 a und b). Allerdings war dies auch bei den Kontrollpflanzen, V5, die nicht mit pBHX-ZmAUX2 transformiert waren, der Fall (Abb. 3-48 c und d; Abb. 3-49 a: erstes Säulenpaar, b: die letzten vier Säulen, c: erstes Säulenpaar). Es fiel auf, dass die Wurzeln in Tetracyclin-haltigem Medium schlechter entwickelt waren (Abb. 3-48 g und h). Das schlechtere Sprosswachstum könnte also auf eine schlechtere Ernährung zurück gehen.

Von den im Dunkeln angezogenen Sämlingen konnten die im Tetracyclin-haltigen Medium wachsenden Pflanzen im Laufe der Zeit ihren Wachstumsrückstand aufholen und übertrafen ihre jeweiligen Kontrollpflanzen schließlich sogar an Größe (Abb. 3-49 c und d). In der zweiten Anzucht war dies aber auch bei der Negativkontrolle V5 der Fall (Abb. 3-49 d: erstes und letztes Säulenpaar), so dass nicht von einem ZmAUX2 spezifischen Effekt ausgegangen werden kann.

### 3.9 Kernlokalisierung des ZmAUX2-Genproduktes

In der Sequenz des *ZmAUX2*-Gens konnte ein zweigeteiltes Kernlokalisierungssignal identifiziert werden (ROHRMEIER, 1995). Eine Kernlokalisierung ist Voraussetzung für eine Funktion als Transkriptionsfaktor, die für ZmAUX2 postuliert wurde. Die gezeigte Kurzlebigkeit (vgl. 3.3) und die sehr rasche Induktion durch Auxin sprechen ebenfalls für eine



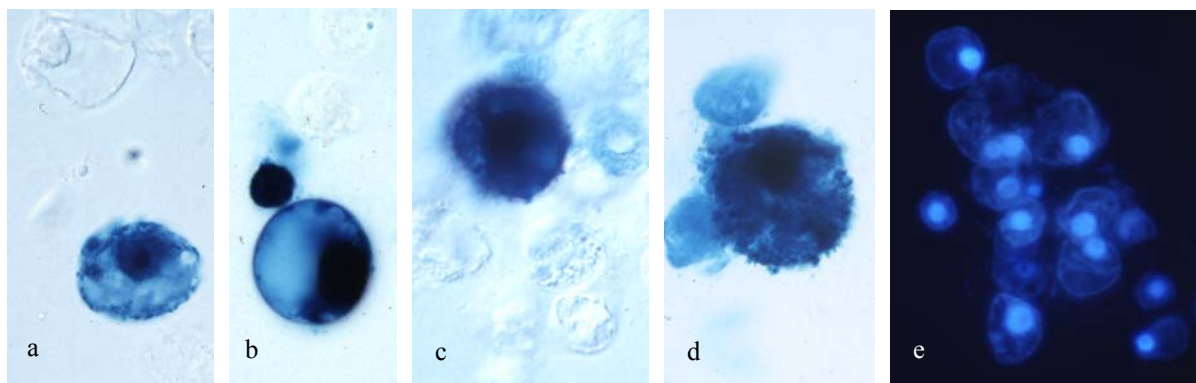
**Abb. 3-50 Karte von pBI221-ZmAUX2**  
 pBI221-ZmAUX2 soll für die konstitutive Expression eines ZmAUX2-GUS-Fusionsproteins sorgen.

solche Funktion. Für ebenfalls früh Auxin-induzierte Proteine der *Aux/IAA*-Familie konnte eine Kernlokalisierung bereits nachgewiesen werden (ABEL *et al.*, 1994). Auch für sie wird eine Funktion als Transkriptionsfaktor diskutiert.

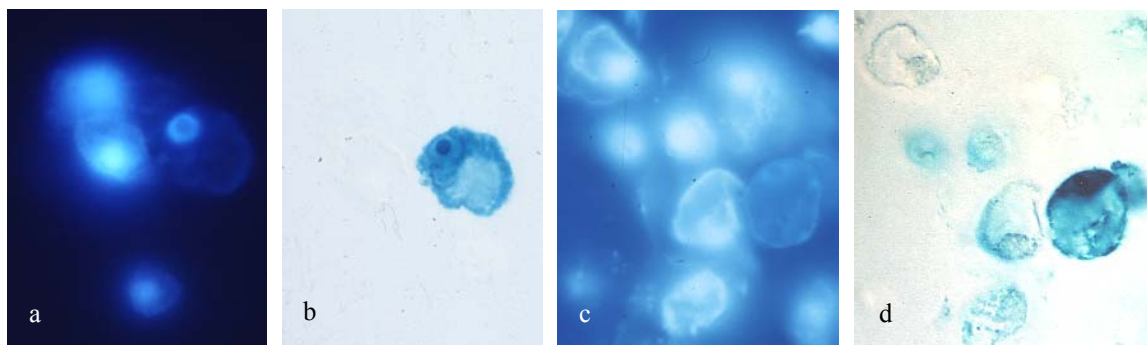
Zur Untersuchung der Lokalisation des ZmAUX2-Genprodukts wurde ein Vektor (pBI221-ZmAUX2, siehe Abb. 3-50) konstruiert, der für ein Fusionsprotein aus ZmAUX2 und dem GUS-Reporter kodiert. Der *CaMV-35S*-Promotor sollte für eine konstitutive Expression des Fusionsproteins sorgen. Das Plasmid pBI221 ohne das eingefügte *ZmAUX2* wurde für die Negativkontrolle verwendet, in der die  $\beta$ -Glucuronidase im Cytoplasma verbleiben sollte. Erst durch eine Fusion mit einem Kernprotein sollte die  $\beta$ -Glucuronidase in den Kern umgeleitet werden.

### 3.9.1 Transiente Transformation von Tabak-Protoplasten

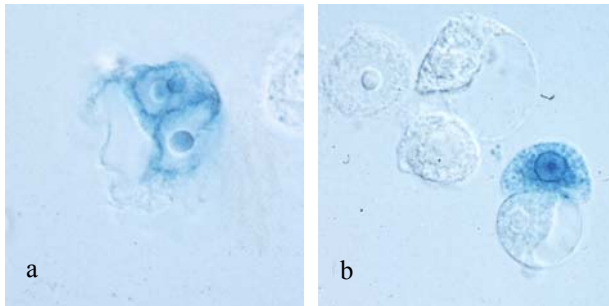
Zellen einer Tabak-Suspensionskultur wurden protoplastiert (HOWARD *et al.*, 1992), und das jeweilige Plasmid durch Elektroporation eingebracht (5.2.4.7). Die Transformationsraten waren dabei nicht sehr hoch, und nur wenige Zellen exprimierten die  $\beta$ -Glucuronidase und zeigten Blaufärbung nach X-Gluc-Spaltung. Die Protoplasten sahen zudem oft beschädigt oder degeneriert aus. Die Kerne konnten jedoch problemlos angesprochen werden, was durch eine DAPI-Färbung bestätigt wurde (Abb. 3-51 e), auch wenn die Blaufärbung nach X-Gluc-Spaltung die DAPI-Färbung etwas überdeckte und die DAPI-Färbung in transformierten Zellen stets vergleichsweise schwach ausfiel (Abb. 3-52). In manchen pBI221-ZmAUX2-Zellen war der Kern durchaus intensiver angefärbt als das Cytoplasma. Die geringe Anzahl



**Abb. 3-51** Tabak-BY2-Protoplasten transient transformiert mit pBI221-ZmAUX2, GUS gefärbt; e: nach GUS-Färbung DAPI-gefärbt.



**Abb. 3-52** Tabak-BY2-Protoplasten transient transformiert mit pBI221-ZmAUX2 GUS und DAPI gefärbt, a und c: unter UV; a und b bzw. c und d zeigen jeweils dieselbe Ansicht.

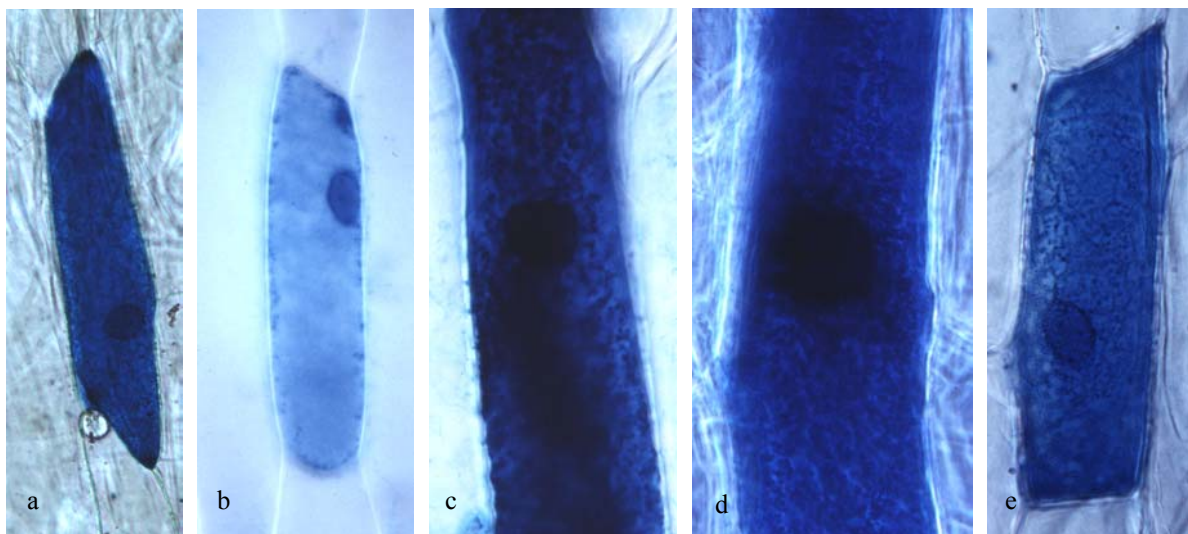


**Abb. 3-53 Negativ-Kontrolle**  
 Tabak-BY2-Protoplasten wurden transient mit pBI221 transformiert und GUS gefärbt

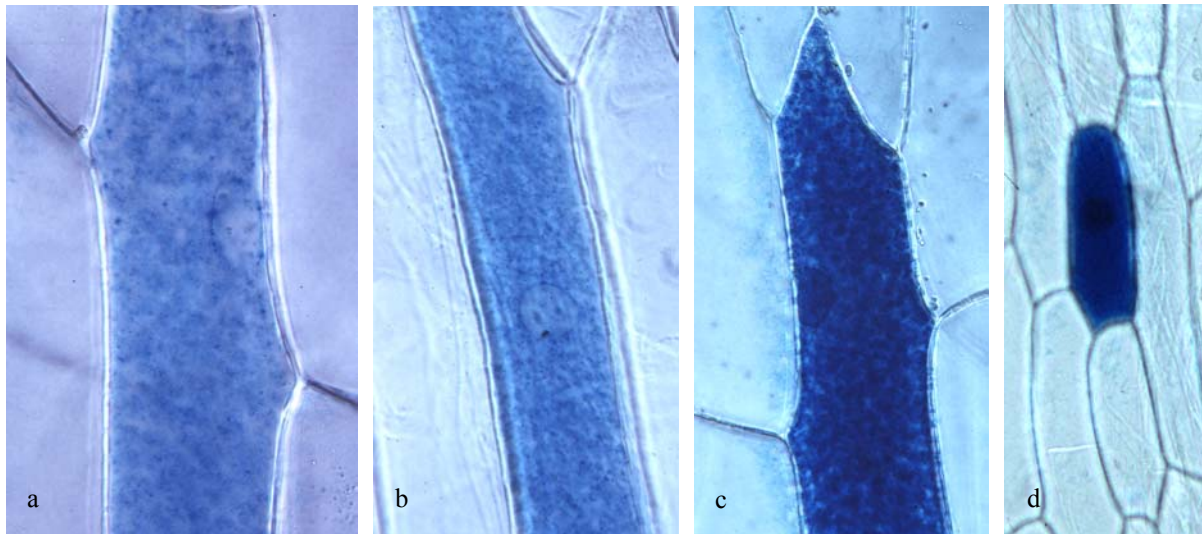
solcher Zellen und das Auftreten von pBI221-Kontrollzellen, in denen der Kern ebenfalls stärker angefärbt zu sein schien (Abb. 3-53 b), ließen das Ergebnis aber wenig überzeugend erscheinen.

### 3.9.2 Mikrobeschuss von Zwiebelepidermiszellen

Geeigneter für den Nachweis der Kernlokalisierung des ZmAUX2-Genproduktes erschien der Mikrobeschuss von Zwiebel-Epidermiszellen. Eine Protoplastierung und eine damit verbundene Schädigung der Zellen ist dabei unnötig. Auch die nähere Verwandtschaft zu *Zea mays* schien von Vorteil; so konnte die Kernlokalisierung eines Maisproteins im Zwiebel-system bereits nachgewiesen werden (VARAGONA *et al.*, 1992). Zwiebel-Epidermiszellen wurden durch Mikrobeschuss mit pBI221-ZmAUX2 transformiert. Die Zwiebelepidermis einer ruhenden Zwiebel von *Allium cepa* wurde dazu vom Mesophyll abgezogen und auf CHU-Medium-Platten aufgebracht. Nach dem Beschuss mit Plasmid pBI221-ZmAUX2 bedeckten Goldpartikeln konnten die Epidermiszellen 18-24 h regenerieren und wurden dann auf GUS-Aktivität getestet (5.2.4.8). Zur Negativkontrolle wurde wieder pBI221 verwendet. Als Positivkontrolle diente ein Plasmid, das statt des *ZmAUX2*-Gens das *Nia*-Gen („nuclear inclusion protein a“) in Fusion mit dem *GUS*-Gen trägt. Das *Nia*-Gen kodiert für eine Proteinase des „tobacco etch potyvirus“, für die eine Kernlokalisierung nachgewiesen wurde (RESTREPO *et al.*, 1990). Das *Nia*-GUS-Fusionsprodukt wurde sehr effizient in den Zellkern importiert, was die starke Anfärbung deutlich zeigt (Abb. 3-56). Die Zellen sind durch den Beschuss also nicht zu stark geschädigt worden.

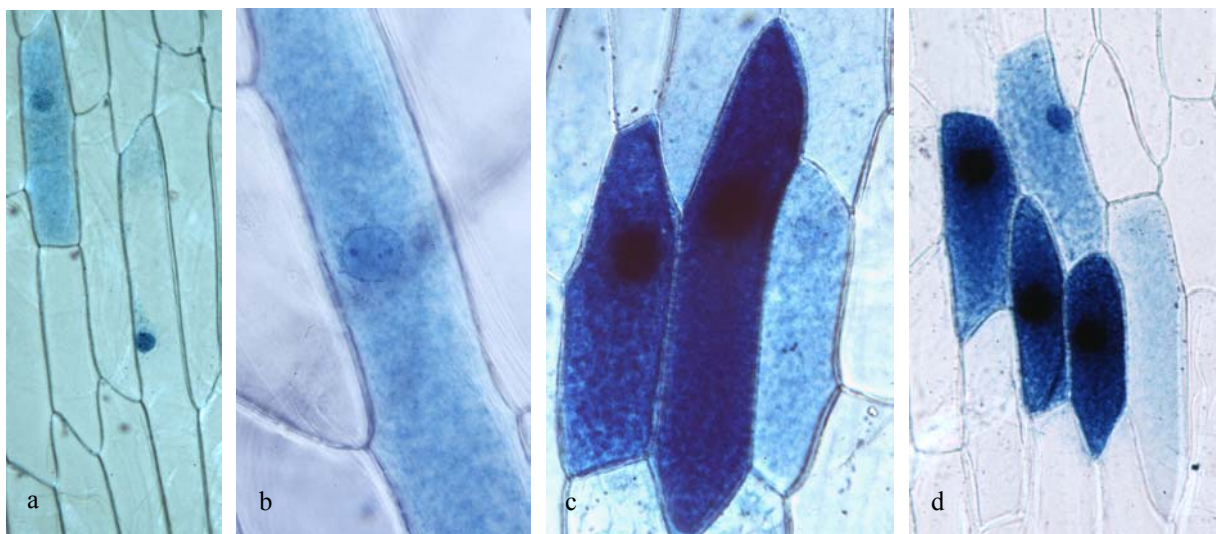


**Abb. 3-54 Zwiebelepidermis transient transformiert mit pBI221-ZmAUX2**  
 und GUS gefärbt; Zellkerne waren teils etwas dunkler als das Cytoplasma gefärbt, teils ähnlich wie dieses.



**Abb. 3-55 Negativ-Kontrolle**

Zwiebelepidermis wurden transient mit pBI221 transformiert und GUS gefärbt; a und b: Zellen mit deutlich ungefärbtem Zellkern; c: Zellkern ähnlich angefärbt wie das Cytoplasma; d: selten zeigten Zellen einen Zellkern, der etwas dunkler als das Cytoplasma angefärbt zu sein schien.



**Abb. 3-56 Positiv-Kontrolle**

Zwiebelepidermis transient transformiert mit pRTL-GUS-NIa und GUS gefärbt; a: einzelne Zelle rechts in der nur der Kern angefärbt wurde; b: Zelle in der Kern nicht wesentlich stärker angefärbt wurde als das Cytoplasma, in der also kein erfolgreicher Kernimport stattfand, c und d: Mehrheit der Zellen war stark angefärbt mit sehr dunkel angefärbtem Zellkern, jeweils auch hier Zellen deren Kern nicht stärker als das Cytoplasma angefärbt war (jeweils rechts).

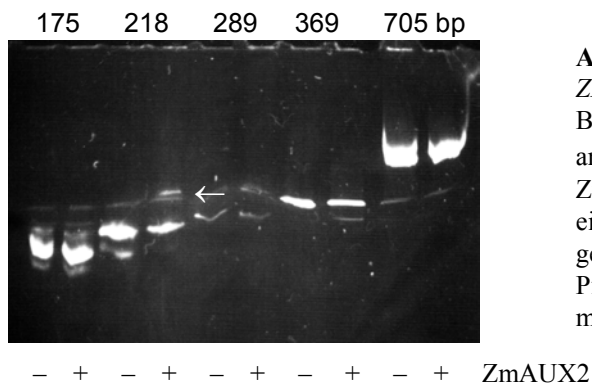
Auch das ZmAUX2-Genprodukt scheint die GUS-Aktivität vermehrt in den Kern zu lenken, wenn auch weniger stark als die Positivkontrolle (Abb. 3-54). Einige Zellen der Negativkontrolle zeigten allerdings auch eine verstärkte Anfärbung des Kerns (Abb. 3-55 d). Eine Kernlokalisierung des ZmAUX2-Genprodukts erscheint also wahrscheinlich, konnte aber auch durch die Mikrobombardierung von Zellen der Zwiebelepidermis nicht zweifelsfrei nachgewiesen werden.

### 3.10 „Mobility Shift Assay“ mit einer putativen Zielsequenz

Kalium spielt eine wichtige Rolle im Auxin-abhängigen Wachstum der Maiskoleoptile (CLAUSSEN *et al.*, 1997). In der Gruppe von Hedrich wurde ein Kaliumkanal-Gen aus Mais, *ZMK1*, als früh Auxin-induziert charakterisiert (PHILIPPAR *et al.*, 1999). Die mRNA-Konzentration des *ZMK1*-Gens steigt 30 min nach Auxingabe signifikant an, also erst nach Anschalten von *ZmAUX2*. *ZMK1* wird ebenso wie *ZmAUX2* in Maiskoleoptile und -Mesokotyl exprimiert und während einer Aufkrümmreaktion nach gravitroper Stimulation in der unteren Hälfte der Koleoptile stärker exprimiert als in der oberen. Auch die Auxinkonzentration ist unten höher. *ZMK1* könnte also durchaus ein Zielgen des *ZmAUX2*-Gens sein, falls dieses wirklich eine Funktion als Transkriptionsfaktor hat. Um dies zu testen, wurde ein „Mobility Shift Assay“ mit dem *ZMK1*-Promotor und dem *ZmAUX2*-Protein durchgeführt. Hierzu wurde der *ZMK1*-Promotorbereich von 1748 bp mit den Restriktionsenzymen *Bgl I* und *Nsi I* in Stücke von 175, 218, 289, 369 und 705 bp Länge geschnitten und diese über ein LMP-Gel isoliert.

Als *ZmAUX2*-Protein wurde ein um 23 Aminosäuren verkürztes *ZmAUX2*-Protein verwendet, das aus einem *ZmAUX2*-MBP-Fusionsprotein (ROHRMEIER, 1995) durch einen Verdau mit Faktor Xa frei gesetzt wurde.

Die einzelnen *ZMK1*-Fragmente wurden jeweils für 20 min mit bzw. ohne *ZmAUX2*-Protein bei RT inkubiert und auf einem nativen Polyacrylamidgel bei 4°C aufgetrennt. Verzögertes Laufverhalten konnte mit dem 218 bp-langen Fragment nach Inkubation mit *ZmAUX2*-Protein einmalig erhalten werden (5.2.3.2). In weiteren Versuchen konnte dies allerdings nicht reproduziert werden (Abb. 3-57).

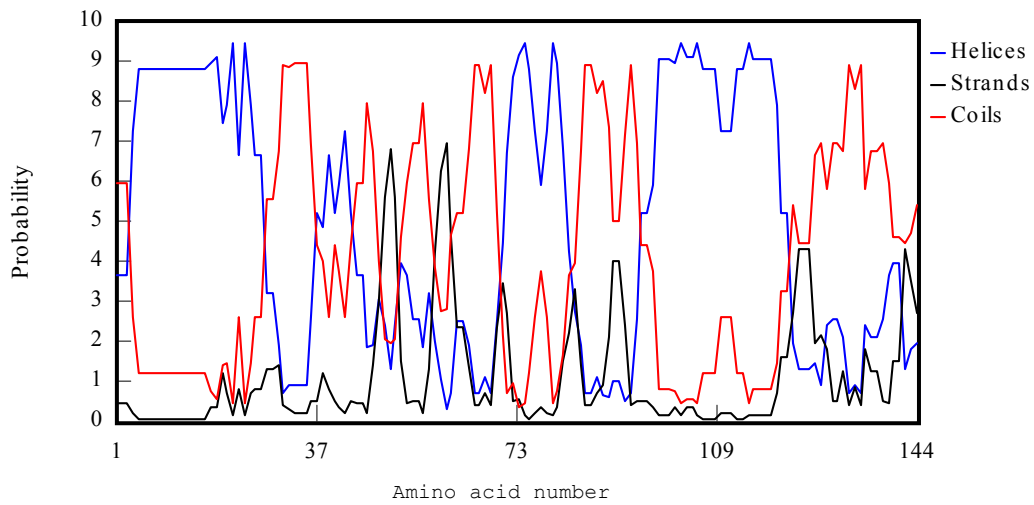


**Abb. 3-57 *ZMK1* „Mobility Shift Assay“**  
*ZMK1*-Promotor-Fragmente (Längen in Basenpaaren sind jeweils über den Spuren angegeben) wurden jeweils mit (+) bzw. ohne (-) *ZmAUX2*-Protein 20 min bei RT inkubiert, auf einem nativen Polyacrylamidgel bei 4°C aufgetrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt. Der Pfeil zeigt auf eine Bande, die nur in der Fraktion mit *ZmAUX2* auftauchte.

### 3.11 Calmodulinbindung von *ZmAUX2*-Protein

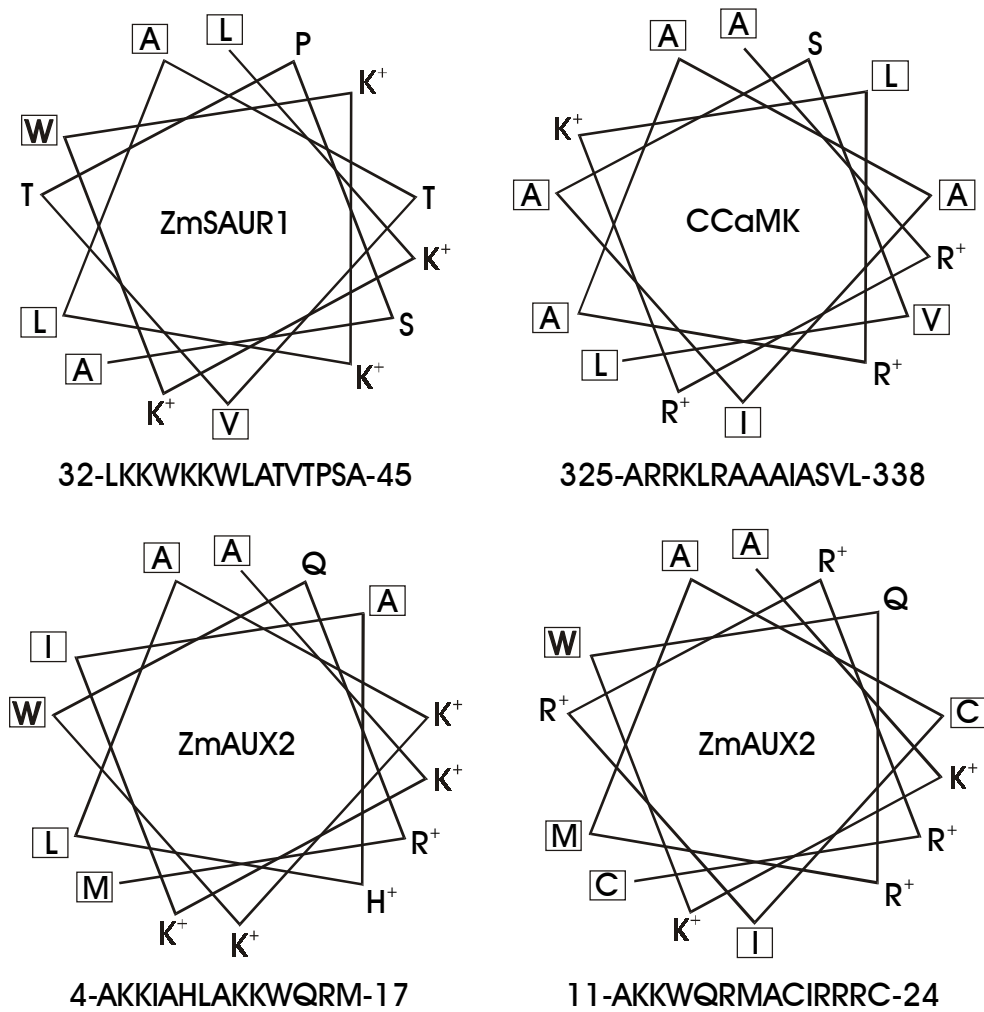
Für einige SAUR-Proteine konnte kürzlich gezeigt werden, dass sie Calmodulin binden (Yang & Poovaiah, 2000). Calmodulin erkennt wohl keine spezifische Sequenz, sondern bindet an basische amphiphile  $\alpha$ -Helices eines Zielproteins. Eine Strukturvorhersage zeigt auch für *ZmAUX2* im aminoterminalen Ende hohe Wahrscheinlichkeit für eine  $\alpha$ -Helix (Abb. 3-58). In einer „helical wheel“-Projektion der Peptidsequenz des *ZmAUX2* dieser  $\alpha$ -helikale Domäne zwischen Aminosäure 4 und 24, wird der basische amphiphile Charakter deutlich erkennbar (Abb. 3-59).

ZmAUX2Protein



**Abb. 3-58 Strukturvorhersage des ZmAUX2-Genproduktes**

Das Programm DNAMAN sagt mit hoher Wahrscheinlichkeit N-terminal eine  $\alpha$ -Helix vorher.



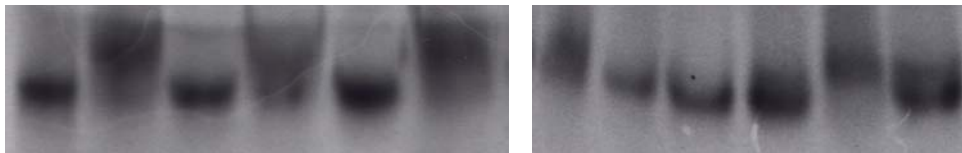
**Abb. 3-59 „Helical wheel“ Projektionen mutmaßlicher Calmodulinbindesequenzen**

ZmSAUR1-Projektion (YANG & POOVAIAH, 2000), CCaMK-Projektion ( $Ca^{2+}$ /Calmodulin-abhängige Protein-kinase) (TAKEZAWA *et al.*, 1996). Hydrophobe Aminosäurereste stehen in Kästchen, basische sind mit einem + gekennzeichnet. Unter den Projektionen ist jeweils die Aminosäuresequenz mit Position im Protein angegeben.

Die aminoterninale ZmAUX2-Domäne ähnelt damit derjenigen Domäne von CCaMK – einer pflanzlichen, Ca<sup>2+</sup>/CaM-abhängigen Proteinkinase – die für eine Calmodulinbindung verantwortlich gemacht wird (TAKEZAWA *et al.*, 1996), bzw. der entsprechenden Calmodulinbindenden Domäne des ZmSAUR1-Genprodukts. *ZmSAUR1* ist ein SAUR-verwandtes Gen aus Mais (YANG & POOVAIAH, 2000).

Um eine Bindung von ZmAUX2-Protein an Calmodulin *in vitro* zu zeigen, wurde das *ZmAUX2* tragende Plasmid pTR52 *in vitro* transkribiert, in Gegenwart von <sup>35</sup>S-Met translatiert und mit Rindercalmodulin inkubiert. Komplexbildung wurde in nicht denaturierender PAGE überprüft (5.2.3.3). In Ansätzen ohne Calmodulin erschien eine Bande der erwartenden Größe (Abb. 3-60 1. Spur). Wurde Calmodulin zugesetzt, so lief der gebildete Komplex im elektrischen Feld langsamer (Abb. 3-60, 2., 6., 7. und 11. Spur). Nicht radioaktiv markiertes ZmAUX2-Protein – zum einen wurde *in vitro* transkribiertes und translatiertes ZmAUX2 aus kaltem Lysat (Ly, 10. und 12. Spur), zum andern ein Maltosebindeprotein-ZmAUX2-Fusionsprotein verwendet (FPr; 5. und 9. Spur) – konnte das radioaktivmarkierte Protein aus dem Komplex verdrängen, das dann wieder auf gleicher Höhe lief wie in Ansätzen ohne Calmodulin. Wurde die Menge an Calmodulin erhöht, so dass die Menge an nicht markiertem Lysat nicht mehr ausreichte, um den Großteil an Calmodulin zu binden, so tauchte die Bande mit verzögertem Laufverhalten wieder auf (Abb. 3-60 Spur 12). BSA konnte weder markiertes ZmAUX2-Protein aus dem Komplex mit Calmodulin verdrängen, noch an das ZmAUX2-Protein binden und damit dessen Laufverhalten ändern (Abb. 3-60 3., 4. und 8. Spur).

CaM (in µg):	–	2	–	2	2	2	0,4	–	0,4	0,4	4	4
Kompetitor :	–	–	BSA	BSA	FPr	–	–	BSA	FPr	Ly	–	Ly



**Abb. 3-60 „Mobility Shift Assay“ mit Calmodulin**

Zu jedem 30 µl Ansatz wurden 1 µl <sup>35</sup>S-Met markiertes ZmAUX2-Protein in 1mM CaCl<sub>2</sub> zugesetzt. BSA wurde, wenn angegeben, in Mengen von 10 µg eingesetzt, FPr (kaltes ZmAUX2-MBP-Fusions-Protein ca. 70 µg) und Ly (*in vitro* translatiertes kaltes ZmAUX2-Protein) jeweils zu 10 µl.

Das ZmAUX2-Protein bindet also spezifisch Calmodulin, wie dies bereits auch für andere SAUR-Proteine gezeigt wurde. Dies unterstützt die Vermutung von YANG & POOVAIAH (2000), dass Calmodulinbindung eine für SAUR-typische Eigenschaft sein soll.

## 4. Diskussion

Seit nunmehr 20 Jahren sind Auxin-induzierte Gene bekannt. Im immer noch weitgehend unaufgeklärten Signaltransduktionsweg vom Auxin zur Zellelongation sind sie die mit am besten untersuchten Elemente (LEYSER, 2001). Besonders durch die neuesten Ergebnisse über den schnellen Abbau der *Aux/IAA*-Proteine rückten sie in das zentrale Interesse der Auxinforschung. Die *SAUR*-Gene sind noch weniger gut charakterisiert. Sie scheinen aber funktionell eng an die *Aux/IAA*-Gene gekoppelt zu sein, wie ihre ähnliche Expression, bedingt durch verwandte Promotorelemente, zeigte. Mit der Maiskoleoptile steht ein gut charakterisiertes und leicht handhabbares Modellsystem zur Verfügung, so dass es vielversprechend erschien, ein *SAUR*-Gen dieses Organismus näher zu untersuchen. Ziel dieser Arbeit war, das putative Mais-*SAUR*-Gen *ZmAUX2* näher zu charakterisieren.

### 5.1 Spezifität der Phytohormon-Induktion des *ZmAUX2*

Es war bereits bekannt, dass das in elongierenden Koleoptilen transkribierte *ZmAUX2* durch Auxine und Cycloheximid induziert werden kann. Versuche mit physiologisch inaktiven Auxinanaloga, Kinetin, Abscisinsäure und Gibberellinsäure führten hingegen zu keiner Zunahme der *ZmAUX2*-Transkripte. Zunächst sollte untersucht werden, ob weitere bekannte Phytohormone wie Brassinolid, Ethylen und Methyljasmonsäure *ZmAUX2* induzieren können.

#### *Brassinosteroide*

Besonders interessant erschien die Untersuchung der erst 1979 identifizierten Brassinosteroide (GROVE *et al.*, 1979), denn sie zeigten in Wachstumstests, wie sie ursprünglich zur Bestimmung der Auxinwirkung entwickelt wurden, eine bis zu  $10^5$ -fach stärkere Wirksamkeit als Auxin (Übersicht in ADAM, 1994). Sie fördern das Internodien-Längenwachstum von Bohnen, wobei die Wirkung sowohl Zellstreckung als auch Zellteilung umfasst (GROVE *et al.*, 1979, ADAM 1994). Auch Mais-Mesokotylsegmente reagieren auf Brassinolidgabe mit Elongation (YOPP *et al.*, 1981). Die Erwartung, dass sich auch Maiskoleoptilen in einem analogen Biotest nach Inkubation mit Brassinolid strecken, konnte bestätigt werden (Abb. 3-1). Das beobachtete, im Vergleich zum Auxinansatz verspätete Einsetzen der Elongation nach Brassinolidgabe, deckt sich mit den bekannten „lag“-Phasen. Nach Auxingabe betragen diese zwischen 10 und 15 Minuten (TAIZ, 1984 nach ZUREK *et al.*, 1994) – in Mais wurden 16 Minuten gemessen (BERGFELD *et al.*, 1988) – Epikotyle von *Glycine max* elongieren aber erst 45 Minuten nach Brassinolidgabe (ZUREK *et al.*, 1994).

Tatsächlich wirken Auxin und Brassinolid zumindest teilweise auf dieselben Gene. So wird *VR-ACS7*, das für eine Aminocyclopropan-Carboxylat-Synthase aus dem Ethylenbiosyntheseweg kodiert, von beiden Wachstumsregulatoren mit einer allerdings unterschiedlichen Kinetik induziert. Die Auxin-Induktion der homologen *VR-ACSI* wird durch Brassinolid jedoch blockiert. Auxin und Brassinosteroide scheinen also über verschiedene Signaltransduktionswege zu wirken (YI *et al.*, 1999).

Eine ähnlich schnelle Induktion des *ZmAUX2*-Gens in Maiskoleoptilen wie durch Auxin konnte durch Brassinolid nicht detektiert werden (Abb. 3-2). Ebenso wird das *SAUR-6B*-Gen im Soja-Epikotyl durch Brassinolid nicht schnell induziert. Nach 18-stündiger Inkubation konnte aber eine Anhäufung von *SAUR-6B*-Transkripten nachgewiesen werden. Brassinolid aktiviert die *SAUR-6B*-Transkription allerdings nicht über eine Zunahme an freiem Auxin; es könnte jedoch die Aktivität oder die Menge eines Auxinrezeptors beeinflussen (ZUREK *et al.*, 1994). Die Brassinolid-induzierte Elongation scheint hingegen unabhängig von einer *SAUR*-Induktion zu sein. Für unabhängige Signalwege sprechen auch Versuche mit der Auxin-insensitiven Tomatenmutante *dgt*, in der Brassinolid sehr wohl eine Elongation bewirkt (ZUREK *et al.*, 1994). Außerdem wird das Expansin LeExp2 aus Tomate, das im Zusammenhang mit der Elongation des Hypokotyls wichtig und am Ende des Signalweges anzusiedeln ist, durch Auxin in seiner Expression stimuliert, nicht aber durch Brassinolid (CATALÁ *et al.*, 2000). Auxin und Brassinolid mögen also zumindest teilweise auf dieselben Gene einwirken und auch ähnliche physiologische Effekte hervorrufen, wie die Brassinolid-defiziente Erbsenmutante *lkb* zeigt, die sich durch Zwergenwuchs auszeichnet (SCHULTZ *et al.*, 2001). Es scheinen aber verschiedene Signalwege zu existieren. Die *SAUR*-Gene sind, wie im hier gezeigten *ZmAUX2*, jedoch offensichtlich spezifisch für die Auxin-Signalkette.

### *Ethylen*

Ethylen und Auxin interagieren ebenfalls in vielen Bereichen miteinander. Deutlich zeigt sich dies in der Stimulation der Ethylenproduktion durch Auxin. Ein zentrales Enzym der Ethylenbiosynthese, die ACC-Synthase, wird von Genen der Auxinprimärantwort kodiert (siehe Einleitung). Meist spielt Ethylen zwar eine zu Auxin antagonistische Rolle, so wird die Zellelongation durch Ethylen bei den meisten Pflanzen gehemmt, andererseits wird in der Reiskoleoptile und im Hafermesokotyl, also in zwei zur Maiskoleoptile verwandten Systemen, die Elongation durch Ethylen gesteigert (KIEBER & ECKER, 1993; SUGE, 1971). In Reis dürfte es sich aber um eine besondere Anpassung an die zeitweise Überflutung des Standortes handeln. Für Hafer muss einschränkend erwähnt werden, dass in der Koleoptile selbst keine solch steigernde Wirkung gemessen werden konnte. Eine Zunahme der *ZmAUX2*-Transkriptmenge nach Ethyleninkubation erfolgte in der Maiskoleoptile nicht (Abb. 3-3). Eine Positivkontrolle, wie sie die Induktion eines Ethylen-induzierbaren Gens darstellen würde, wurde aus Mangel an einer Sonde zwar nicht durchgeführt, es wurde aber in der Inkubationslösung eine Ethylenkonzentration eingestellt, die als physiologisch aktiv beschrieben war (SUGE, 1971; REID, 1987). Zudem zeigt die Auxin-Positivkontrolle, dass das negative Ergebnis des Ethyleninduktionsversuches durchaus aussagekräftig ist.

### *Methyljasmonsäure*

Jasmonsäure bzw. Methyljasmonsäure sind als Pflanzenwachstumsregulatoren ebenfalls in Auxin-abhängige Wirkungsfelder involviert. Sie spielen eine Rolle bei der Reaktion auf Verwundung (KODA & KIKUTA, 1994) und eben auch bei der Zellexpansion (TAKAHASHI *et al.*, 1994). Für den Induktionsversuch wurde wiederum eine physiologisch aktive Methyljasmonsäure-Konzentration gewählt (TAKAHASHI *et al.*, 1994), aber keine Induktion des *ZmAUX2*-Gens festgestellt (Abb. 3-3).

Es ist also anzunehmen, dass *ZmAUX2* *in vivo* ausschließlich durch Auxin induziert wird.

Die relativ schwachen Signale der *in situ*-Proben in den Northernblot-Analysen (Abb. 3-2, 3-3) sind wohl durch die Präparationszeit bedingt, in der die Koleoptilen bereits an Auxin verarmten und die *ZmAUX2*-Transkriptmenge dadurch bereits zu sinken begann. Eine solche rasche Abnahme spricht für die Kurzlebigkeit, wie sie für *SAUR*-Gene bereits bekannt ist. Mit Halbwertszeiten von zehn Minuten gehören die *SAUR*-mRNAs zu den instabilsten Transkripten, die in Pflanzen gefunden wurden (MCCLURE & GUILFOYLE, 1989, GIL & GREEN, 1996).

### **5.2 *In vivo* Nachweis des Genproduktes**

Es gelang im Rahmen dieser Arbeit erstmals das Produkt eines Gens der *SAUR*-Verwandtschaft durch metabolische Markierung und anschließende Immunpräzipitation *in vivo* nachzuweisen. Da erst die Aufschlussmethode mit NaOH, die sich durch rasche Effektivität auszeichnet, zum Erfolg führte, war eine sehr kurze Halbwertszeit zu vermuten. Auch andere Autoren nahmen dies, nach fehlgeschlagenen Nachweisversuchen an (GUILFOYLE, 1999).

### **5.3 Halbwertszeit**

In „pulse-chase“-Experimenten konnte eine Halbwertszeit von fünf bis sieben Minuten für das *ZmAUX2*-Genprodukt ermittelt werden. Die Abflachung der Kurve zum Nullwert hin kann mit einem unvollständigen Wegwaschen des radioaktiven Substrates erklärt werden. In der Zellwand und eventuell im Hohlraum der Koleoptilsegmente kann sich wohl ein kleiner Vorrat an radioaktivem Substrat halten, der nur langsam verarmt.

Das *ZmAUX2*-Genprodukt ist also ähnlich kurzlebig wie die Genprodukte der *Aux/IAA*-Familie – für PsIAA6 wurde eine Halbwertszeit von sechs Minuten gemessen, für PsIAA4 eine von acht Minuten (ABEL *et al.*, 1994) – und wie diese wohl nur in geringer Konzentration in den Zellen vorhanden. So ist es bisher auch nicht gelungen, das *ZmAUX2*-Protein im Immunoblot nachzuweisen. Desgleichen ist bislang nur ein einziges Genprodukt der *Aux/IAA*-Familie im Immunoblot detektiert worden, und dies gelang nur, da es durch eine Mutation stabilisiert wurde und deshalb in stark erhöhter Konzentration vorliegt (COLÓN-CARMONA *et al.*, 2000; WORLEY *et al.*, 2000).

Innerhalb der *Aux/IAA*-Familie konnten bereits bestimmte Aminosäuren identifiziert werden, die für die Kurzlebigkeit der Genprodukte verantwortlich sind (WORLEY *et al.*, 2000). Der schnelle Abbau erfolgt im Proteasom (RAMOS *et al.*, 2001) und wird durch die Auxinkonzentration moduliert (ZENSER *et al.*, 2001; TIWARI *et al.*, 2001; siehe Einleitung). Es wäre interessant zu untersuchen, ob Auxin auch den Abbau des *ZmAUX2*-Genproduktes beeinflusst.

### **5.4 Expressionsmuster des *ZmAUX2***

*ZmAUX2*-Transkripte wurden bisher nur in der Maiskoleoptile detektiert (ROHRMEIER, 1995). In weiteren Northernblot-Analysen konnten sie nun auch im Mesokotyl von Maiskeimlingen nachgewiesen werden. Über die Expression in juvenilen und adulten Pflanzen sollten Promotor-GUS-Fusionen aufklären. Leider konnten im homologen System durch diese Methode keine neuen Erkenntnisse gewonnen werden (siehe unten). Heterolog in Tabak wie auch in *Arabidopsis* war der *ZmAUX2*-Promotor aber aktiv, und es konnte ein spezifisches Expressionsmuster ermittelt werden. Die Funktionalität in den heterologen Systemen spricht

für eine starke Konservierung des Systems innerhalb der Angiospermen, es wurde ja die Grenze zwischen Mono- zu Dikotyledonen überschritten. Betrachtet man sich die ermittelten Expressionsmuster näher, so findet man eine gute Übereinstimmung zu den Ergebnissen aus den Northernblot-Analysen aus Mais. In *N. tabacum*, wie in *A. thaliana*, zeigte sich GUS-Aktivität vor allem in elongierenden Zellen des Hypokotyls, desgleichen konnten im homologen Mesokotyl des Mais *ZmAUX*-Transkripte nachgewiesen werden. In allen Systemen wurde in der Wurzel keine Expression detektiert. Im Blatt war in der Regel keine, in seltenen Fällen eine geringe Expression aufgefallen. Diese Übereinstimmungen bestärken die Annahme, dass auch die Ergebnisse der weitergehenden Charakterisierung der Expressionsmuster in Tabak und *Arabidopsis* auf Mais übertragbar sind.

Weiter steht dieses Expressionsmuster des *ZmAUX2*-Gens in elongierenden Bereichen von Hypo- und Mesokotyl im Einklang mit der für andere *SAUR*-Gene ermittelten Expression. Auch dort führten Northernblot-Analysen, „tissue prints“ und *in situ* Hybridisierungen ebenso wie Promotor-GUS-Fusionsexperimente zu ähnlichen Expressionsmustern (GUILFOYLE, 1999). Als heterologes System wurde wiederum Tabak mit Erfolg verwendet. Dies unterstützt weiter die Aussagekraft der Promotor-GUS-Experimente im heterologen System.

Analog zu den detektierten, durch den *ZmAUX2*-Promotor vermittelten GUS-Aktivitäten im Hypokotyl und Epikotyl von Tabak und *Arabidopsis*, konnten auch *SAUR-15A*- und *SAUR-10A*-Promotoren aus Soja eine GUS-Aktivität im elongierenden Tabak-Hypokotyl und -Epikotyl vermitteln (LI *et al.*, 1991; LI *et al.*, 1994a), ebenso wie der *SAUR-AC1*-Promotor im elongierenden *Arabidopsis*-Hypokotyl (GIL & GREEN, 1997). Mittels Northernblot-Analysen wurden in elongierenden Soja-Hypokotylsegmenten *SAUR*-Transkripte (MCCLURE & GUILFOYLE, 1989) und im Hypokotyl von *Vigna radiata* das *SAUR*-Transkript *ARG7* (YAMAMOTO *et al.*, 1992) nachgewiesen. Schließlich konnten auch durch „tissue print“ und *in situ* Hybridisierung *SAUR*-Transkripte im elongierenden Soja-Hypokotyl und -Epikotyl sichtbar gemacht werden (MCCLURE & GUILFOYLE, 1989; FRANCO *et al.*, 1990; GEE *et al.*, 1991).

Bereits durch *in situ* Hybridisierung gelang es die differentielle Expression verschiedener Gewebstypen zu unterscheiden. *SAUR*-Gene scheinen vor allem in der Epidermis und im Cortex transkribiert zu werden (GEE *et al.*, 1991), was wiederum Promotor-GUS-Fusionsexperimente bestätigten (LI *et al.*, 1994a; LI *et al.*, 1991). Auch der *ZmAUX2*-Promotor lenkte die GUS-Aktivität dorthin, also in die Gewebe, die als limitierend für die Elongation von Hypokotyl und Spross angesehen werden. Allerdings sind diese Hinweise auf eine Beteiligung der *SAUR*-Gene an der Elongation rein korrelativer Natur, und es konnte bisher nicht ausgeschlossen werden, dass die *SAUR*-Expression zwar der Auxinkonzentration, die zur Elongation führt, folgt, aber nicht für die Elongation verantwortlich ist.

Ein erster Beleg für eine solche kausale Beteiligung an der Elongation konnte durch die Maispflanzen erbracht werden, deren *ZmAUX2*-Gen durch ein Transposon disruptiert war. Die Koleoptilen dieser Pflanzen elongierten nur langsam, wie die signifikanten Längenunterschiede nach sechs Tagen Anzucht (Abb. 3-18) und der signifikant geringere Zuwachs in den 22 Stunden des Versuchs zur geotropen Krümmung (Abb. 3-32) zeigten. Ebenso ist in diesen Pflanzen das Wachstum des Sprosses gestört. Sie waren signifikant kleiner als die Kontrollen, auch wenn in der zweiten Anzucht die sehr schlecht wachsenden Pflanzen der homozygoten Linie B73 nicht signifikant größer als die Mutanten waren. Bei der Anzucht der Keimlinge des Versuchs zur geotropen Krümmung konnte ein signifikanter Unterschied auch

zu dieser Kontrolle im Mann-Whitney-Test ermittelt werden (Abb. 3-33). *ZmAUX2* scheint also direkt am Wachstum der Koleoptile sowie des Sprosses beteiligt zu sein. Die durch den *ZmAUX2*-Promotor gelenkte Expression des GUS-Reportergens wies bereits auf die für die Elongation limitierende Epidermis als Wirkungsort des *ZmAUX2*-Genproduktes hin (siehe oben). Der beobachtete wellige Verlauf der Epidermiszellwände im mittleren Bereich der Internodien mittlerer Höhe der Zwergmutanten, im Vergleich zum glatten Verlauf solcher Zellwände des „Alois“-Hybridmaises, spricht dafür, dass die Disruption des *ZmAUX2*-Gens eine normale Elongation der Epidermiszellen verhindert und dadurch das Wachstum des ganzen Sprosses stört (Abb. 3-28). Dies ist ein weiterer über eine Korrelation hinausgehender Hinweis, dass *ZmAUX2* an der Elongation von Spross und Koleoptile beteiligt ist. Die etwas verzögerte Blühphase mag durch das langsamere Wachstum und einer dadurch bedingten längeren vegetativen Phase zustande kommen, könnte aber auch durch Stammunterschiede erklärbar sein.

Stammunterschiede könnten auch die geringen Sequenzabweichungen, die in den PCR-Produkten der TUSC-Mutanten gegenüber *ZmAUX2* festgestellt wurden, bedingen. Ebenso könnten PCR-Fehler dafür verantwortlich sein. Es ist aber auch möglich, dass nicht *ZmAUX2* sondern *ZmAUX8* oder ein weiteres homologes Gen durch das Transposon disruptiert wurde. Mit Sicherheit ist jedoch ein *SAUR*-verwandtes Gen getroffen worden. Erstmals konnte also ein Hinweis auf die Funktion der *ZmAUX*-Gene und damit der *SAUR*-verwandten Gene gefunden werden, der über eine Korrelation hinausgeht. Sie spielen wohl eine wichtige Rolle im Auxin-vermittelten Streckungswachstum.

Teilweise scheint die Elongation – möglicherweise in Pflanzen, die für die Disruption homozygot waren – durch die Transposoninsertion so stark gestört worden zu sein, dass die Pflanzen bereits kurz nach der Keimung abstarben, wodurch die vergleichsweise geringen Überlebensraten zustande kamen. Das Absterben könnte auch durch weitere, noch unbekannte, wichtigen Funktionen des *ZmAUX2* bedingt sein. Weiterhin könnten die Pflanzen anfälliger für Pathogene sein, wenn Wunden nicht schnell geschlossen werden können oder eine Abwehrreaktion gestört ist.

Die mit den TUSC-Pflanzen durchgeführten PCR-Tests auf Transposoninsertion, führten zu keiner eindeutigen Korrelation mit dem Zwergenwachstum (Daten nicht gezeigt). Das zur Mutagenisierung verwendete Transposon Mu ist somatisch aktiv und durch ein Wiederherausspringen kann ein Gen seine Funktionsfähigkeit wiedererlangen oder aber durch hinterlassene Deletionen bzw. Insertionen funktionsunfähig bleiben (RAIZADA *et al.*, 2001). Eine erwachsene Pflanze kann also als Mosaik unterschiedlicher Genotypen betrachtet werden, und ein negatives PCR-Ergebnis muss nicht in jedem Fall auf ein intaktes Zielgen hinweisen. Zudem war die Anzahl der Pflanzen zu gering, um signifikante Korrelationen zu unterstützen. Dass der Zwergenwuchs auf eine neben der Insertion in *ZmAUX2* bestehende, weitere Mutation zurückzuführen ist, erscheint unwahrscheinlich, da in allen drei unabhängigen Mutantenfamilien, deren PCR-Produkt sequenziert worden war, dieser Phänotyp auftrat. Durch weiteres Auskreuzen sollen Pflanzen erhalten werden, in denen neben dem *ZmAUX2*-Gen kein anderes durch das Transposon disruptiert ist.

Die zwergwüchsigen Mutantenfamilien bieten eine vielversprechende Möglichkeit, weitere Erkenntnisse über die Funktion von *ZmAUX2* zu erlangen. Es wäre interessant festzustellen, ob in den Mutanten auch *Aux/IAA*-Gene eine veränderte Expression zeigen und ob in diesen

Pflanzen Auxin-induzierbare Proteine, wie Expansine oder Kaliumtransporter, ihre Induzierbarkeit einbüßen.

#### *Zur ZmAUX2-Expression bei Krümmungsbewegungen*

Weitere korrelative Hinweise für eine Beteiligung des ZmAUX2 an der Elongation konnten mittels der *ZmAUX2*-Promotor gesteuerten GUS-Aktivität während Krümmungsreaktionen gewonnen werden. Dabei können die beiden unterschiedlich elongierenden Seiten ein und desselben Organs einer Pflanze verglichen werden.

Beim Öffnen des Hypokotylhakens konnte eine stärkere GUS-Expression jeweils auf der Innenseite des Hakens detektiert werden, also der Seite, die um eine Öffnung zu erreichen stärker elongieren muss (Abb. 3-14). Auxin kann, exogen zugegeben, ein Öffnen des Hypokotylhakens von Bohnen verhindern (YOPP *et al.*, 1981) und ist dort wohl tatsächlich ungleich verteilt (SCHWARK & BOPP, 1993 nach CARPIN *et al.*, 1999). Auxin scheint also das Öffnen des Hypokotylhakens zu steuern. In Mais wird kein Hypokotylhaken ausgebildet. Die gute Korrelation der durch den *ZmAUX2*-Promotor vermittelten GUS-Aktivität mit der Elongation beim Öffnen des Hypokotylhakens im heterologen System, deutet darauf hin, dass Auxin das ungleiche Streckungswachstum über dieselben Mechanismen steuert, wie die Elongation beim Etiolement.

Bei der Krümmungsreaktion nach lateralem Lichtreiz konnte eine stärkere Expression des GUS-Reportergens auf der lichtabgewandten, also wiederum der stärker elongierenden Seite nachgewiesen werden. ZmAUX2 könnte folglich auch bei der phototropisch modulierten Elongation beteiligt sein. Dies konnte ganz analog auch für *SAUR-10A* bereits gezeigt werden (LI *et al.*, 1991). LI *et al.* fanden zudem, dass die GUS-Aktivität durch Lichtinkubation in den zuvor im Dunkeln angezogenen Tabakkeimlingen stark zurück ging. Bereits nach vier Stunden im Licht war eine Abnahme an GUS-Aktivität festzustellen, nach acht Stunden sank diese GUS-Aktivität auf 30 % des Anfangswertes. Lichtabhängig war auch die GUS-Aktivität in den Tabakkeimlingen mit dem *ZmAUX2*-Promotor-GUS-Konstrukten. Ein wesentlich höherer Anteil von Keimlingen zeigte eine GUS-Aktivität, wenn sie im Dunkeln gezogen waren (Tab. 3-1).

Die Lichtabhängigkeit der *ZmAUX2*-Expression bestätigte sich weiter in Northernblot-Analysen. In Koleoptile, wie im Mesokotyl war die Transkriptmenge von den fünf Tage im Dunkeln gezogenen Keimlingen wesentlich höher als bei den gleichaltrigen, die am letzten Tag Licht ausgesetzt waren (Abb. 3-4 und 3-6). Allerdings setzte diese Lichtabhängigkeit in den Koleoptilen erst ab diesem Zeitpunkt ein. Die vier Tage alten Keimlinge wiesen gleichermaßen hohe Transkriptmengen auf, gleichgültig ob im Dunkeln oder im Licht gezogen. Durch Verfolgen des Wachstums konnte gezeigt werden, dass die Lichtabhängigkeit der Elongation der Maiskoleoptile, die zum Etiolement führt, ebenfalls erst am vierten Tag der Anzucht einsetzt. Zuvor wächst die Koleoptile mit einer von den Lichtverhältnissen unabhängigen Geschwindigkeit (Abb. 3-5 A). Die Elongationsrate korreliert also sehr gut mit der *ZmAUX2*-Transkriptmenge und zeigt eine Lichtabhängigkeit nur, wenn auch die *ZmAUX2*-Transkription vom Licht reguliert ist.

Im Gegensatz dazu ist die Elongation des Mesokotyls bereits vor diesem Zeitpunkt lichtabhängig. Mangels Material konnte aber für einen so frühen Zeitpunkt die Transkriptmenge

im Mesokotyl von im Licht gezogenen Keimlingen nicht bestimmt werden, da das Mesokotyl zu diesem Zeitpunkt noch zu klein ist.

Erst kürzlich wurde gezeigt, dass auch die mRNA-Mengen von *Aux28*, einem Gen der *Aux/IAA*-Familie und von *GmGT-2*, einem Transkriptionsfaktor der *GT-2*-Familie, der an die D1-Box im Promotor von *Aux28* bindet, durch Licht stark reduziert werden (O'GRADY *et al.*, 2001). Solche D1-Motive sind auch in *SAUR*-Genen identifiziert worden (NAGAO *et al.*, 1993) und ebenso im *ZmAUX2*-Promotor zu finden (siehe Einleitung). Die Reduktion des *ZmAUX2*-mRNA-Spiegels im Licht könnte also durch einen Transkriptionsfaktor der *GT-2*-Familie vermittelt werden. Die Reduktion an *Aux28*- und *GmGT-2*-mRNA scheint Phytochrom-abhängig zu sein. Dies ist für einen Transkriptionsfaktor der *GT-2*-Familie bisher einmalig (O'GRADY *et al.*, 2001). Phytochrom A scheint seinerseits wiederum durch *GT-2*-Transkriptionsfaktoren reguliert zu sein (DEHESH *et al.*, 1990).

*In vitro* konnte gezeigt werden, dass *IAA3* aus der *Aux/IAA*-Familie von Phytochrom A phosphoryliert werden kann, und dass *IAA3* *in vivo* zumindest in der Mutante *shy2-2* auch phosphoryliert ist. *In vitro* war diese Phosphorylierung allerdings nicht von Licht abhängig (COLÓN-CARMONA *et al.*, 2000). Ein Lichtsignal könnte also bereits über eine veränderte Auxinmenge, wie sie auf Licht zugewandter bzw. Licht abgewandter Seite im Phototropismus nachgewiesen wurde, die *ZmAUX2*-Transkription beeinflussen. Licht könnte über die *Aux/IAA*-Gene in den Signalweg vom Auxin zum *ZmAUX2* eingreifen oder in einem Auxin unabhängigen Weg über das D1-Element die *ZmAUX2*-Transkription modulieren. Es ist anzunehmen, dass verschiedene Wege nebeneinander existieren. Der Phototropismus zeigt ein Aktionsspektrum mit den typischen „drei Fingern“ zwischen 400 und 500 nm, was auf Flavine und Carotinoide als Photorezeptoren hindeutet. Das Flavoprotein NPH1 wird als Rezeptor für den Phototropismus diskutiert (CHRISTIE *et al.*, 1998; CHRISTIE *et al.*, 1999). Für die Wahrnehmung von Licht, die zur De-Etiolierung führt, scheinen aber Phytochrome verantwortlich zu sein (QUAIL *et al.*, 1995).

Unabhängig über welchen Weg nun *SAUR*-Gene aktiviert werden, so scheint ihre Expression doch immer zu einer Elongation zu führen.

Auch nach gravitroper Reizung konnte auf der Seite des stärkeren Wachstums, der unteren Flanke, eine stärkere GUS-Aktivität detektiert werden (Abb. 3-16). Dies deckt sich mit durch „tissue prints“ und Promotor-GUS-Experimenten für Soja- *SAUR*-Gene ermittelten Expressionsmustern (MCCLURE & GUILFOYLE, 1989; LI *et al.*, 1991). Wiederum sind diese Ergebnisse nur korrelativer Natur und lassen nicht zwingend auf eine Beteiligung an der gravitropen Reaktion schließen. Auch die gemessene, verringerte *SAUR*-Transkriptmenge in *dgt*-Mutanten, die in ihrer geotropen Reaktion gestört sind, belegen eine solche Beteiligung nicht (MITO & BENNETT, 1995). Einen ersten wirklichen Beleg für eine solche Beteiligung von *SAUR*-Genen am Gravitropismus konnte erneut durch die Transposon-mutagenisierten Maiskeimlinge gesammelt werden. Deren Koleoptilen zeigten nach einer senkrechten Ausrichtung zur Schwerkraft eine verminderte gravitrope Reaktion (3.5.8). Ein intaktes *ZmAUX2*-Gen scheint also für eine normale gravitrope Krümmungsreaktion nötig zu sein. Mutanten gaben auch Hinweise für eine Beteiligung der *Aux/IAA*-Gene am Geotropismus. So ist die Mutante *axr2-1*, die in *IAA7* mutiert ist, nicht zu einer normalen gravitropen Reaktion fähig (NAGPAL *et al.*, 2000).

### *Expression des ZmAUX2 in der Narbe und im Leitgewebe*

Die GUS-Aktivität, die gesteuert durch *ZmAUX2* in Tabaknarben detektiert wurde, war nicht sehr deutlich und nicht sehr häufig zu beobachten. Es könnte sich hierbei durchaus um einen Artefakt handeln. Allerdings ist eine *ZmAUX2*-Expression in Narben nicht unwahrscheinlich. In Mais sind die Narben in Gegensatz zu Tabak fädig und sehr lang, und während der Blüte elongieren sie rasch. Diese Elongation könnte wiederum durch *ZmAUX2* gesteuert werden. Für weitere *SAUR*-verwandter Gene konnte eine Expression in Blüten bereits nachgewiesen werden. Der *SAUR-AC1*-Promotor führte zu einer GUS-Aktivität in *Arabidopsis*-Blüten (GIL & GREEN, 1997). Mittels Northernblot-Analyse konnte das *SAUR*-verwandte *Md-FS1* in Apfelblüten nachgewiesen werden (WATILON *et al.*, 1998). Der *AtAUX2-11*-Promotor konnte eine LacZ-Aktivität in Narben und Staubgefäßen von *Arabidopsis*-Blüten vermitteln. Dabei wurden die stärksten Färbungen im Endothecium der Antheren und den elongierenden Bereichen der Filamente erhalten (WYATT *et al.*, 1993). Der *SAUR-10A*-Promotor vermittelte eine GUS-Aktivität in elongierenden Filamenten transgener Tabakblüten (LI *et al.*, 1991). Die ab und zu beobachtete Anfärbung von Leitgewebe wurde auch für *SAUR-10A* beschrieben (LI *et al.*, 1991). Desgleichen konnte eine *SAUR*-Transkription durch *in situ* Hybridisationen in Leitgewebe festgestellt werden, und wurde mit sich entwickelndem Xylem in Verbindung gebracht (GEE *et al.*, 1991).

### **5.5 Promotor-GUS-Konstrukte im homologen System und „transgene silencing“**

Die Untersuchung der Expression mittels Promotor-GUS-Fusion im homologen System war leider nicht möglich. Es konnte in den transgenen Maispflanzen (M37) keinerlei GUS-Aktivität nachgewiesen werden. Die Konstrukte waren zur Kontrolle sequenziert worden, sollten also in Ordnung sein. Die eingebrachte DNA könnte in den Pflanzen umgebaut und dadurch inaktiviert worden sein. Dagegen sprechen allerdings die PCR-Produkte, die mit für die eingebrachten Sequenzen spezifischen Oligonucleotide durchgeführt wurden. Es erscheint unwahrscheinlich, dass der im heterologen System funktionelle Promotorbereich im homologen System nicht funktionell ist. Auch das GUS-Reportersystem ist in Mais schon erfolgreich zur Anwendung gekommen (SHEN *et al.*, 1993). Färbelösungen und -methoden waren in Ordnung und konnten transient transformierte Maiszellen anfärben (Daten nicht gezeigt). Ein weit verbreitetes, noch nicht gut verstandenes Phänomen, das immer wieder bei der Erzeugung von transgenen Pflanzen beobachtet wurde und eine gewünschte Expression vereitelte, ist das sogenannte „transgene silencing“. Besonders wenn in eine Pflanze Sequenzen eingebracht werden, die bereits als endogene Kopien existieren, oder mehrere Kopien einer Sequenz eingebracht werden, tritt dieses Phänomen auf. Man spricht dann auch von HDGS („homology-dependent gene silencing“). Dabei können Gene sowohl auf Transkriptionsebene als auch posttranslationaler Ebene stillgelegt werden (TGS und PTGS, „transcriptional gene silencing“, „post-transcriptional gene silencing“). Es muss sich bei den eingebrachten homologen Sequenzen nicht um kodierende Abschnitte handeln, auch homologe Promotorbereiche allein können eine Stilllegung bedingen. Die durch homologe Promotorbereiche verursachten Stilllegungen finden meist auf Transkriptionsebene statt (PARK *et al.*, 1996). Wahrscheinlich spielt eine Methylierung des Promotorbereiches hierbei eine Rolle, die dann zu einer Kondensierung des DNA-Abschnittes führt (KOOTER *et al.*, 1999).

Es wäre also möglich, dass die Einbringung des Mais-Promotors, der das *GUS*-Reportergen steuern sollte, ein TGS verursachte. Da beim TGS teilweise auch das endogene Homolog stillgelegt wird (KOOTER *et al.*, 1999), wurden die transgenen Pflanzen angezogen und auf einen Phänotyp untersucht. Sollte das endogene *ZmAUX2* tatsächlich stillgelegt worden sein, so wäre ein Phänotyp, ähnlich dem der Transposon-mutagenisierten Pflanzen zu erwarten. Dies konnte allerdings nicht beobachtet werden.

In der Entwicklung unterschieden sich die M37-Pflanzen statistisch nicht signifikant von den M36-Pflanzen, die mit dem Konstrukt aus dem *CaMV S 35*-Promotor und der kodierenden Region des *ZmAUX2*-Gens transformiert worden waren, um eine Überexpression des *ZmAUX2*-Gens zu erreichen. Auch bei der Einbringung von kodierenden Sequenzen kann HDGS auftreten, wobei die Stilllegung meist posttranskriptional stattfindet (PARK *et al.*, 1996). In den transgenen M36-Kalli konnte mittels RT-PCR eine Transkription von *ZmAUX2* nachgewiesen werden. Es kann mit relativer Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden, dass die detektierten Transkripte von der endogenen Kopie abstammten, da die endogene Kopie wohl nicht in Kalli transkribiert wird. Es wurde ja nicht in allen Kalli ein Signal in der RT-PCR erhalten.

Im Falle der M36-Pflanzen spricht der signifikante Unterschied, der zwischen transgenen und nicht transgenen Pflanzen beim Wachstum von Koleoptile und Mesokotyl junger Keimlinge ermittelt werden konnte, gegen ein HDGS. Allerdings kann ein Auftreten von HDGS bei einzelnen M36-Familien zu einer Verschleierung des Mutantenphänotyps geführt haben.

### **5.6 Überexpression des *ZmAUX2*-Gens**

Das Erkennen eines veränderten Phänotyps von Pflanzen, die *ZmAUX2* überexprimieren sollten, war neben eventuell auftretenden Fällen von HDGS erschwert durch das Fehlen von Kontrollpflanzen mit einem den transgenen M36-Pflanzen ähnlichen genetischen Hintergrund. Der sehr gut wachsende Hybridmais „Alois“ und die schlecht wachsende homozygote Linie B73 sind eigentlich beide nicht gut als Kontrollen geeignet um feinere Wachstumsunterschiede festzustellen. Die Unterschiede zwischen diesen beiden zeigen, wie stark unterschiedliche genetische Hintergründe das Wachstum beeinflussen. Einzelne Familien wie M36T49 schienen sich zwar deutlich von beiden Kontrollen abzusetzen, da der Phänotyp aber nicht durchgängig bei allen Familien zu beobachten war, handelte es sich dabei eher um sekundäre Effekte. Die Integration des eingebrachten Konstruktes in eine kodierende Sequenz, eine unabhängige Mutation oder HDGS könnte zu dem schlechten Wachstum geführt haben.

Um eine bessere Kontrolle zu erhalten, wurden die Keimlinge mittels PCR auf Transgenität getestet und nicht transgene den transgenen Individuen als interne Negativkontrolle gegenübergestellt. So sollten Pflanzen mit ähnlichem genetischen Hintergrund verglichen werden können. Allerdings haben die transgenen Pflanzen selbst auch keinen einheitlichen genetischen Hintergrund. Die Eltern der Protoplasten, die transformiert wurden, waren nämlich zwei verschiedene Hybridmaissorten. Erst die regenerierten Pflanzen wurden mit der homozygoten Linie B73 gekreuzt um Samen zu erhalten. Eine hohe Variabilität im Wachstum ist also schon von vorne herein zu erwarten, in der feinere Unterschiede leicht untergehen können.

Gegen diese interne Kontrollen grenzten sich die transgenen Maiskeimlinge dennoch durch längere Koleoptile und Mesokotyle nach sechs Tagen Anzucht im Dunkeln signifikant ab. Bei der ersten Anzucht konnte im Mann-Whitney-Test zwar keine Signifikanz in den Koleoptillängen ermittelt werden, was an der genannten hohen Variabilität und an einer zu geringen Anzahl der Keimlinge liegen könnte, durchschnittlich waren die transgenen Koleoptile aber auch in der ersten Anzucht im Dunkeln etwas länger, und in einer zweiten Anzucht erwies sich dieser Wachstumsunterschied auch als signifikant (Abb. 3-37 a). Das Wachstum von Koleoptile und Mesokotyl konnte also durch eine Überexpression des *ZmAUX2*-Gens im Dunkeln gesteigert werden.

Ein signifikanter Unterschied zwischen transgenen M36-Keimlingen und den M36-Kontrollen zeigte auch das Verhältnis von Koleoptile zu Mesokotyl. Das Wachstum im Mesokotyl scheint durch eine *ZmAUX2*-Überexpression stärker gefördert zu werden als in der Koleoptile. Dies könnte daran liegen, dass *ZmAUX2* zu unterschiedlichen Raten in nichttransgenen Keimlingen transkribiert wird. Eine zusätzliche Expression würde also zu unterschiedlichen Steigerungen führen. Es könnten aber auch andere Faktoren limitierend für eine Steigerung des Wachstums werden.

Wurden die Keimlinge im Licht gezogen, so waren die transgenen Koleoptile signifikant kürzer als die der M36-Kontrollpflanzen. Im Licht scheint eine zusätzliche *ZmAUX2* Expression also eher hemmend auf das Wachstum wirken. Wie die Northernblot-Analysen zeigten, liegt in Koleoptilen, die im Licht wachsen, eine sehr geringe *ZmAUX2*-Transkriptmenge vor. Es wäre deshalb anzunehmen gewesen, dass gerade in solchen Koleoptilen eine Überexpression zu einer besonders hohen Steigerung des Wachstums führt. Dass die *ZmAUX2*-Genproduktmenge durch die Überexpression in einen überoptimalen Bereich geriet, erscheint beim Vergleich mit den im Dunkeln gewachsenen Keimlingen unwahrscheinlich. Ob der beobachtete Effekt wirklich spezifisch für eine *ZmAUX2*-Überexpression ist, muss in weiteren Experimenten untersucht werden. Würde sich eine solche Hemmung des Wachstums im Licht durch Überexpression des *ZmAUX2* bestätigen, so wäre dies, der erste Fall, in dem ein SAUR-Genprodukt nicht zu einer Steigerung des Wachstums führt. Interessanterweise zeigt auch die Mutante *dfl1-D*, in der *DFL1* – ein Mitglied der schnell Auxin-induzierten *GH3*-Genfamilie – überexprimiert wird, ein vermindertes Sprosswachstum im Licht, nicht jedoch im Dunkeln (NAKAZAWA *et al.*, 2001).

Im weiteren Wachstum konnte kein signifikanter Unterschied zwischen transgenen M36-Pflanzen und den M36-Kontrollpflanzen mehr entdeckt werden, obwohl sich auch hier eine Tendenz der transgenen M36-Pflanzen zu schnellerem Wachstum fortsetzte. Weiteres Auskreuzen mit der homozygoten Linie B73 soll zu einem einheitlicheren genetischen Hintergrund der Pflanzen führen, um so die Vergleichbarkeit der Pflanzen zu erhöhen und so eventuelle Wachstumsunterschiede des Sprosses belegen zu können.

#### *Überexpression des ZmAUX2 durch einen induzierbaren Promotor*

Die Verwendung eines induzierbaren Promotors sollte es ermöglichen Auswirkungen einer *ZmAUX2*-Überexpression in späteren Entwicklungsstadien in bis dahin unbeeinflusst gewachsenen Pflanzen zu untersuchen. Da kein entsprechendes Maissystem zur Verfügung stand, wurde auf Tabak ausgewichen. Es ist zwar möglich, dass das *ZmAUX2*-Genprodukt in Tabak nicht funktionell ist, die drei inzwischen aus Mais bekannten SAUR-verwandten Gene

haben ja nur begrenzte Homologien zu den *SAUR*-Genen aus Dikotyledonen und ihre Genprodukte sind auch etwas größer (siehe Einleitung), die Ergebnisse aus den Versuchen mit dem *ZmAUX2*-Promotor-GUS-Konstrukt ließen aber auf die Funktionalität auch des *ZmAUX2*-Genproduktes in Tabak hoffen – der *ZmAUX2*-Promotor ermöglichte ja eine spezifische Expression der  $\beta$ -Glucuronidase in heterologen Systemen.

In den Tabakpflanzen, die das *ZmAUX2*-Gen unter der Kontrolle des Tetracyclin-induzierbaren Promotors exprimieren sollten, konnte aber kein auf eine Überexpression des *ZmAUX2*-Gens beruhender Effekt festgestellt werden. Ein vermindertes Wurzelwachstum, wie es in den Pflänzchen, die mit Tetracyclin induziert wurden, beobachtet wurde, kennzeichnet zwar auch Mutanten mit erhöhter Auxinantwort, wie beispielsweise *axr3* (WORLEY *et al.*, 2000; siehe unten), allerdings ist auch eine hemmende Wirkung auf das Wurzelwachstum durch hoch dosiertes Tetracyclin (5 mg/l) bereits beschrieben. Die verwendete Dosierung (1 mg/l) gilt zwar als das Wurzelwachstum nicht beeinträchtigend (GATZ, 1995) – auch berichten JONES *et al.* (1998) trotz einer Tetracyclin-Konzentration von 4 mg/l von keiner Hemmung des Wurzelwachstums seiner Tabakpflanzen – aber da auch die nicht transgenen Kontrollen eine solche Hemmung des Wurzelwachstums nach Tetracyclin-Inkubation zeigten, beruht sie wohl nicht auf einem *ZmAUX2*-Effekt, sondern ist direkt auf das Tetracyclin zurückzuführen.

Dass auch der Spross zunächst im Tetracyclin-haltigen Medium schlechter wuchs, könnte auf einer schlechteren Ernährung durch das schlechter entwickelte Wurzelsystem beruhen. Die nach längerer Anzucht letzten Endes längeren Sprosse der mit Tetracyclin induzierten Pflanzen könnten ebenfalls durch die Ernährung bedingt sein. Die Keimlinge waren bis zu diesem Zeitpunkt so stark angewachsen, dass eventuell das Nährmedium für ein weiteres Wachstum limitierend geworden war. Ist das Wurzelwachstum aber gehemmt, so kann ein größerer Anteil in den Aufbau des Sprosses fließen. Für ein limitierendes Nährmedium spricht auch, dass die längeren Sprosse bei den im Dunkeln wachsenden, Tetracyclin-induzierten Pflänzchen. Etwaige auf die *ZmAUX2*-Überexpression beruhende Effekte konnten vor dem Hintergrund dieser Tetracyclin-Nebeneffekte nicht ermittelt werden.

Interessant wäre, den Einfluss von Tetracyclin auf die Elongation von Hypokotylsegmenten der transgenen Tabakkeimlinge zu messen. Bei den geringen Elongationsraten von Tabak-Hypokotylsegmenten wird dazu aber ein Extensometer benötigt, in das die Segmente eingespannt werden und so eine sehr genaue Messung der Elongation möglich ist. In den Zeiträumen, die für solche Messungen benötigt werden, spielen Tetracyclin-Nebeneffekte wohl keine Rolle.

Im Gegensatz zur Disruption erzeugte die konstitutive Überexpression des *ZmAUX2* nur einen schwachen Phänotyp, bei der Verwendung des Tetracyclin-induzierbaren Promotors ging ein etwaiger Phänotyp gar im Tetracyclin-Nebeneffekt unter. Positionseffekte bis hin zum „gene silencing“ könnten eine nur sehr schwache Überexpression erlaubt haben. Häufig werden auch bei einer Fremdexpression von pharmazeutischen Produkten in transgenen Pflanzen nur sehr geringe Mengen erhalten (Übersicht in DANIELL *et al.*, 2001). Die Mengen an produziertem *ZmAUX2*-Protein lagen also eventuell nur minimal über der endogen produzierten Menge. Dafür spricht das auch in den transgenen M36-Pflanzen kein Nachweis des *ZmAUX2*-Genproduktes in einer Immunoblot-Analyse gelang (Daten nicht gezeigt). Durch eine

Transformation der Chloroplasten könnte eine wesentlich effektivere Überexpression erreicht werden (Übersicht in HEIFETZ, 2000).

Die bisher einzigen Pflanzen in denen ein SAUR-Genprodukt in erhöhter Konzentration vorliegt sind *Arabidopsis-dst*-Mutanten. Diese wurden erzeugt um den durch das DST-Element vermittelten, schnellen Abbau zu untersuchen. In diesen *dst*-Mutanten konnte eine erhöhte Mengen an *SAUR-AC1*-mRNA detektiert werden, und es muss angenommen werden, dass noch weitere *SAUR*-Transkripte, die ebenfalls durch ein DST-Element destabilisiert sind, in diesen Pflanzen in erhöhten Konzentrationen vorliegen. Diese Pflanzen zeigten allerdings keinerlei Phänotyp (JOHNSON *et al.*, 2000).

Auch *ABP1* wurde mittels eines Tetracyclin-induzierbaren Promotor in Tabak überexprimiert, und auch diese Pflanzen zeigten äußerlich keinen Phänotyp, wenn sie mit Tetracyclin behandelt wurden. Allerdings waren die Protoplasten dieser Pflanzen größer, als die der nicht Tetracyclin-induzierten Pflanzen (JONES *et al.*, 1998).

Eine solche Auswertung der Zellgrößen fehlt sowohl für die M36-Pflanzen der vorliegenden Arbeit, als auch für die *dst*-Mutanten von JOHNSON *et al.*, (2000). Freilich ist ein solcher Phänotyp bei ganzen Pflanzen weitaus schwerer zu belegen, als bei Protoplasten.

Die Überexpression von *SAUR*-verwandten Genen scheint also ähnlich wie die Überexpression von *ABP1*, im Gegensatz zu einer Überexpression von *Aux/IAA*-Genen einen recht unauffälligen Phänotyp hervorzurufen. Möglicherweise kann die Pflanze eine *SAUR*-Überexpression sehr gut ausgleichen. Auch ist ein Fehlen eines wechselwirkenden Partners mit dem zusammen ein SAUR-Protein erst seine Funktion erfüllen kann, denkbar. Daneben werden wohl für das Wachstum sehr schnell andere Faktoren limitierend. Es ist anzunehmen, dass der ohnehin sehr schnell wachsende Hybridmais sich bereits nahe an einem Wachstums-limit befindet. Die Disruption eines *ZmAUX2*-Gens durch ein Transposon zeigte aber deutlich die Bedeutung der *SAUR*-Gene für das Wachstum.

### 5.7 Calmodulinbindung

Die einzige bisher nachgewiesene Wechselwirkung eines SAUR-Proteins ist diejenige mit Calmodulin (YANG & POOVAIAH, 2000). Die Fähigkeit zur Calcium-abhängigen Calmodulinbindung scheint typisch für alle SAUR-Genprodukte zu sein. Eine Calmodulinbindung konnte auch für *ZmAUX2* gezeigt werden. Die Verdrängung von radioaktiv markiertem *ZmAUX2* aus dem Komplex mit Calmodulin durch nicht radioaktives, *in vitro* translatiertes *ZmAUX2* bzw. durch das *ZmAUX2*-MBP-Fusionsprotein, aber nicht durch BSA, zeigt deutlich die Spezifität dieser Bindung. Mittels einer solchen Calmodulinbindung könnte ein Calciumsignal in ein SAUR-Signal übersetzt werden. Nach einer geotropen Reizung tritt ein solches Calciumsignal bereits nach 3 Minuten auf (GEHRING *et al.*, 1990b). Gehring nahm deshalb an, Calcium könnte ein „second messenger“ sein, der zur Anhäufung Auxin-regulierter RNA führt. Allerdings konnte der Calmodulin-Antagonist W-7, der die Auxin-induzierte Koleoptil-elongation in Mais hemmt, die Anhäufung von *ZmSAUR1* nach Auxin-Induktion nicht verhindern (YANG & POOVAIAH, 2000). Die Hemmung der Elongation durch Störung der Calmodulinfunktion sollte aber nicht überbewertet werden. Sie könnte auch auf der Hemmung anderer Enzyme, wie Calcium-abhängiger Proteinkinasen oder mitochondrialer Pyruvat-Dehydrogenase, beruhen. Nach REDDY *et al.* (1988) konnten auch Calcium-

Chelatoren wie EGTA die Auxin-induzierte Zellelongation in Erbsen-Epikotylsegmenten inhibieren, gleichzeitig hatte EGTA keinen Einfluss auf die Transkription der *Aux/IAA*-Genen *pIAA4/5* und *pIAA6*. Hingegen konnte BROCK *et al.* (1992), keine Beeinträchtigung des Auxin-induzierten Wachstums in Pulvini von *Avena sativa* durch EGTA erkennen.

*SAUR*-Proteine könnten, auch wenn sie nicht durch Calcium auf Transkriptionsebene reguliert werden, als Integrationspunkt eines Calciumsignals dienen. Es ist denkbar, dass *SAUR*-Proteine erst durch eine Calmodulinbindung eine Funktion als Transkriptionsfaktor ausüben oder aber durch eine solche Bindung in ihrer Funktion gestört werden. So werden eine Gruppe von „helix-loop-helix“-Transkriptionsfaktoren aus Säugern an einer DNA-Bindung durch Bindung von Calmodulin an ihrer DNA-Bindedomäne gehindert (CORNELIUSSEN *et al.*, 1994). Für den *Arabidopsis*-Transkriptionsfaktor TGA3 konnte eine Calmodulinbindung *in vitro* nachgewiesen werden (SZYMANSKI *et al.*, 1996). Auch das ebenfalls aus *Arabidopsis* stammende DNA-Bindeprotein DL10 bindet Calmodulin. Es ist im Kern lokalisiert und hat eine Domäne, die in Hefe die Transkription aktivieren konnte (BOUCHÉ, 2000; SNEDDEN & FROMM, 2001).

### 5.8 Kernlokalisierung

Um die auf Grund des identifizierten Kernlokalisierungssignals aufgestellte Hypothese *ZmAUX2* könnte ein Transkriptionsfaktor sein, zu überprüfen, wurde die Lokalisation des *ZmAUX2* mittels Fusion mit dem Reportergen GUS untersucht. Tatsächlich scheint *ZmAUX2* das Fusionsprotein in den Kern zu lenken, wenn auch nicht sehr effektiv. Möglicherweise spiegelt diese geringe Effektivität nicht den Transport von *ZmAUX2* alleine in den Kern wieder. Das Reportergen ist über viermal größer als *ZmAUX2*, und so ist es leicht vorstellbar, dass die Fusion die Sekundärstruktur des *ZmAUX2* negativ beeinflusst oder das Kernlokalisierungssignal teilweise verdeckt bzw. die Wechselwirkung mit Importin  $\alpha$  stört, das an zweigeteilte Kernlokalisierungssignale bindet (SMITH *et al.*, 1997). Auch könnten erst nachfolgende Schritte wie die Bindung von Importin  $\beta$ , das Andocken an die Kernpore etc. gestört sein (Übersicht in MEIER, 2001). Die Verwendung eines heterologen Systems scheint für die geringe Effektivität des Kerntransports des *ZmAUX2*-GUS-Fusionsproteins weniger verantwortlich zu sein. Mit der Zwiebelepidermis wurde ein monokotyles System gefunden, das gut handhabbar ist und selbst an Tabak angepasste Proteine sehr effektiv in den Kern transportiert, wie die Positivkontrolle zeigte. Auch konnte die Kernlokalisierung der *Aux/IAA*-Genprodukte, PS-IAA4 und PS-IAA6, zweifelsfrei mit einer GUS-Fusion im heterologen System nachgewiesen werden. Die *AUX/IAA*-Gene sind aber fast doppelt so groß wie *ZmAUX2*, so dass bei ihnen der angehängte GUS-Reporter weniger ins Gewicht fallen mag. Eventuell könnte auch eine Calmodulinbindung die Lokalisation des *ZmAUX2* beeinflussen. Ähnlich wie auch der Transkriptionsfaktor NFAT („nuclear factor of activated T cells“) in seiner Lokalisation durch Bindung mit Calcineurin, einer Calcium/Calmodulin abhängigen Proteinphosphatase, reguliert wird (LUO *et al.*, 1996).

Andererseits könnte selbst eine geringe Effektivität des Transportes ausreichend sein. So wird für den putativen Auxinrezeptor *ABPI* angenommen der geringe Anteil an der Plasmamembran (ca. 2 %) reiche aus um seine Funktion in der Auxinperzeption zu erfüllen (siehe Einleitung; DIEKMANN *et al.*, 1995).

### **5.9 Ein putatives Zielgen**

Für ZmAUX2 oder für andere SAUR-Genprodukte wurde eine Bindung an DNA oder gar an ein spezifisches Promotorelement eines Zielgens bisher nicht nachgewiesen. Ein mögliches Zielgen für ZmAUX2 stellt *ZMK1* dar, das für einen Kaliumkanal kodiert (PHILIPPAR *et al.*, 1999). *ZMK1* wird in denselben Geweben wie *ZmAUX2* durch Auxin induziert, kann aber erst etwas nach *ZmAUX2* detektiert werden. Auch gehört es nicht zu den Genen der primären Auxinantwort, es könnte also durch ZmAUX2 aktiviert werden. Tatsächlich tauchte in der Spur eines *ZMK1*-Promotorfragments eine zusätzlich Bande mit verzögertem Laufverhalten auf, wenn dieses Fragment mit ZmAUX2-Protein vorinkubiert worden war (Abb. 3-57). Dieses Ergebnis muss aber erst reproduziert werden, um von einer Bindung des ZmAUX2 an den *ZMK1*-Promotor wirklich ausgehen zu können. Dabei könnte die entdeckte Calmodulinbindung des ZmAUX2 hilfreich sein. ZmAUX2 könnte die Transkription aber auch Calmodulin-abhängig über eine Bindung an andere Transkriptionsfaktoren beeinflussen. Es erscheint deshalb am aussichtsreichsten in einem „yeast-two-hybrid“-System solche Interaktionspartner aufzuspüren. Auch wäre es interessant, die Auxin-Induzierbarkeit von *ZMK1* und anderen Auxin-induzierbaren Genen (z.B. Expansine) in den Transposonmutagenisierten Maiskoleoptilen zu untersuchen, um so Hinweise auf eventuelle Zielgene des ZmAUX2 zu finden.

## 5. Material und Methoden

### 5.1 Material

#### 5.1.1 Verwendete Organismen, Vektoren und Oligonucleotide

##### Verwendete Bakterienstämme

Name	Marker	Referenz
<i>Escherichia coli</i> <b>DH5<math>\alpha</math></b>	F <sup>-</sup> , endA1, hsdR17 (rk <sup>-</sup> , mk <sup>-</sup> ), supE44, thi-1, recA1, gyrA96, relA1, $\emptyset$ 80dlacZ[ $\Delta$ ]M15	HANAHAN (1983)
<i>E. coli</i> <b>RU4446</b>	e14-(mcrA), $\Delta$ (lac-proAB), thi-1, gyrA96, endA1, supE44, [F', traD36, proAB, lac $\phi$ Z $\Delta$ M15], dam <sup>-</sup> , CM <sup>R</sup> , mcrB1	N. SAUER (pers. Mitt.)
<i>E. coli</i> <b>TBI</b>	ara $\Delta$ (lac pro AB), rpsL( $\phi$ 80 lacZ $\Delta$ M15), hsdR	JOHNSTON <i>et al.</i> (1986)
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> <b>LBA4404</b>	Str <sup>R</sup> , Rif <sup>R</sup>	HOEKEMA (1983)

##### Verwendete Pflanzenstämme

Name	Referenz/Herkunft
<i>Arabidopsis thaliana</i> <b>C24</b>	ANDERSON & MULLIGAN (1992) Die Samen wurden freundlicherweise von Elisabeth Truernit zur Verfügung gestellt.
<i>Nicotiana tabacum</i> <b>cv. Xanthi</b>	Die Stecklinge wurden freundlicherweise von E. Truernit zur Verfügung gestellt.
<i>N. tabacum</i> <b>BY2</b>	<i>Nicotiana tabacum</i> L. cv. Bright Yellow 2 (NAGATA <i>et al.</i> , 1981)
<i>Zea mays</i> <b>cv. Alois</b>	Versuchssaatgut der BayWa Neutraubling
<i>Z. mays</i> <b>cv. B73</b>	Homozygoter Stamm; AgrEvo/Frankfurt
<i>Z. mays</i> <b>41-C-12, 41-F-12, 64-A-11, 89-D-07</b> , (weitere acht TUSC-Familien)	Abstammungslinien der Mutanten-Bank, jede dieser als Familie bezeichneten Linie geht auf ein unabhängiges Transpositionereignis des Transposon Mu zurück, Samen solcher Familien werden von Pioneer Hi Bred im Rahmen ihres TUSC-Programms („Trait Utility System for Corn“) zur Verfügung gestellt (5.2.4.6)
<i>Z. mays</i> <b>M36T4, -T2, -T4, -T5, -T10, -T12, -T14, -T15, -T17, -T18, -T24, -T25, -T26, -T30, -T31, -T34, -T36, -T44, -T46, -T48, -T49, -T50</b>	auf unabhängige Transformationsereignisse zurückgehende Mais-Linien („Familien“), die von AgrEvo mit <i>pSK-35S-AUX2</i> transformiert worden waren (5.3.4.5)
<i>Z. mays</i> <b>M37T5, -T7, -T8, -T11, -T12, -T17, -T32, -T38, -T39, -T45, -T47</b>	auf unabhängige Transformationsereignisse zurückgehende Mais-Linien („Familien“), die von AgrEvo mit <i>pPATGUS-39</i> transformiert worden waren (5.3.4.5)

## Verwendete Plasmide

Name	Größe, Marker	Referenz
<i>pB2-35SAcK</i>	4,1 kb, ori, Amp <sup>R</sup> , PAT	P. ECKES (pers. Mitt.)
<i>pBI-AUX2-(+)/(-)</i>	12,8 kb, ori, Amp <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup>	diese Arbeit (3.4.)
<i>pBIN-Hyg-TX</i>	ca. 13 kb, Hyg <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup>	C. GATZ (pers. Mitt.)
<i>pBHX-ZmAUX2</i>	ca. 13 kb, Hyg <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup>	diese Arbeit (3.8.)
<i>pBI 101</i>	12 kb, oriV, M13ori, trfA, tetA, geneIII, (Kan <sup>R</sup> )	JEFFERSON <i>et al.</i> (1987) FRISCH <i>et al.</i> (1995)
<i>pBI 121</i>	12 kb, oriV, M13ori, trfA, tetA, geneIII, nptII (Kan <sup>R</sup> ), nptIII, GUS, LacZ	JEFFERSON <i>et al.</i> (1987) FRISCH <i>et al.</i> (1995) CLONTECH (Palo Alto, USA)
<i>pBI221-ZmAUX2</i>	6,1 kb, ori, Amp <sup>R</sup>	diese Arbeit (3.9.)
<i>pBS(+)</i>	3,2 kb, ori, bla, lac Z'	STRATAGENE (Heidelberg)
<i>pPATGUS-39</i>	6,9 kb, ori, Amp <sup>R</sup> , PAT	diese Arbeit (3.7.)
<i>pRT 100</i>	3,3 kb, ori, Amp <sup>R</sup> , CaMV 35S Promotor	TÖPFER <i>et al.</i> (1987) TÖPFER <i>et al.</i> (1993)
<i>pRT-16</i>	3,8 kb, ori, Amp <sup>R</sup>	KNAUSS (1995), diese Arbeit (3.6.)
<i>pRTL2-GUS/NIA</i>	7,1 kb, ori, bla, CaMV 35S Promotor, GUS, NIA	L. ROSSINI (pers. Mitt.)
<i>pSAP-16</i>	7,5 kb, ori, Amp <sup>R</sup> , leu2	N. SAUER (pers. Mitt.), KNAUSS (1995), diese Arbeit (3.6.)
<i>pSK-35S-AUX2</i>	5,3 kb, ori, Amp <sup>R</sup> , PAT	diese Arbeit (3.6.)
<i>pTR 52</i>	3,8 kb, ori, bla, lac Z'	ROHRMEIER (1995)
<i>ZMK1-Promo/pCR2.1 topo</i>	5,7 kb, Amp <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup> , ColE1-ori	K. PHILIPPAR (pers. Mitt.) INVITROGEN (Groningen, Holland)

## Verwendete Oligonukleotide

Name	Sequenz
<i>Aux2 TUSC3</i>	5'- TGT GTG GCT CCA ACA TAC GGC GCC -3'
<i>Aux2 TUSC5</i>	5'- CGC CAA GAA GAT TGC TCA TCT CGC C -3'
<i>Aux2 TUSC5komp</i>	5'- GGC GAG ATG AGC AAT CTT CTT GGC G -3'
<i>Aux2TUSC Prom5</i>	5'- GGT AGC AAT CTC TGG GTG GCT AGG -3'
<i>GUS3</i>	5'- CAC CGA AGT TCA TGC CAG TCC AGC -3'
<i>GUS5</i>	5'- CCT GTG GGC ATT CAG TCT GGA TCG -3'
<i>GUS-5kompl</i>	5'- CGA TCC AGA CTG AAT GCC CAC AGG -3'
<i>Mu</i>	5'- AGA GAA GCC AAC GCC AWC GCC TCY ATT TCG TC -3'
<i>PRT S35-5</i>	5'- CAA CAT GGT GGA GCA CGA CAC TCT C -3'

## 5.1.2 Chemikalien und Enzyme

Die eingesetzten Chemikalien und Lösungsmittel waren analysenrein und wurden, wenn nicht anders angegeben, von der Firma Merck (Darmstadt) bezogen.

**Folgende Firmen lieferten:****Amersham LIFE SCIENCE** (Braunschweig)

Amplify™-Lösung, L-[<sup>35</sup>S]-Methionin-Cystein (70 %/30 %) (1200 Ci/mmol), Megaprime™ DNA labeling system.

**BioRad** (Richmond, USA)

Bromphenolblau, Coomassie Brilliant Blue R250, Proteinstandard „*low range*“, TEMED, Xylencyanol.

**Biosynth AG** (Skosie, USA)

Cyclohexylammoniumsalz der 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-Glucuronsäure (X-Gluc)

**Biozym** (Hameln)

DNA Agarose > 500 bp, Large DNA Agarose Low melt > 500 bp, Fast-Link™ DNA Ligation-Kit, Master Amp™ Tfl DNA Polymerase.

**Boehringer** (Mannheim)

1st Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR, Alkalische Phosphatase aus Kälberdarm, Ethidiumbromid, Proteaseinhibitoren, Rapid DNA Ligation Kit, Restriktionsenzyme mit zugehörigen Puffern, *Taq*-Polymerase.

**Difco** (Detroit, USA)

Bacto-Peptide, Bacto-Tryptone, Bacto-Yeast-Extract.

**DUCHEFA** (Haarlem, Niederlande)

Carbenicillin Disodium.

**EUROGENTEC** (Liege, Belgien)

Goldstar DNA Polymerase.

**GIBCO BRL** (Gaithersburg, USA)

Pferdeserum, Phytagar, *Taq*-DNA-Polymerase.

**Macherey-Nagel** (Düren)

NUCLEOBOND® AX PC-Kit 100.

**MBI Fermentas** (Heidelberg)

Gene Ruler™ 100bp, λ DNA EcoR I + Hind III

**Pharmacia** (Uppsala, Schweden)

Klenow Polymerase, Protein A Sepharose, Restriktionsenzyme, T4 DNA Ligase.

**Promega** (Madison, USA)

TNT® Coupled Reticulocyte Lysate System, Wizard™ Minipreps DNA Purification System, Wizard™ PCR Preps DNA Purification System.

**Qiagen** (Hilden)

DNA-Standards, HotStarTaq™-Polymerase, Rnase-Free DNase Set, RNeasy Plant Mini Kit.

**Roth** (Karlsruhe)

Acrylamid, N-,N'-Methylenbisacrylamid.

**Serva** (Heidelberg)

Ammoniumperoxodisulfat, Pflanzenhormone, DTT.

**Sigma** (Deisenhofen)

Aminosäuren, Antibiotika, Anti-Kaninchen IgG gekoppelt mit Meerrettichperoxidase, Calmodulin aus Rinderhirn, DAPI, HEPES, Lachssperma DNA Typ III (Na-Salz), MOPS, PEG 3350, PEG 4000, Ponceau S, Tween 20.

**Whatman** (Maidstone, England)  
3 MM Chromatographiepapier.

### 5.1.3 Häufig verwendete Lösungen und Puffer

BJ (6fach konzentriert)	0,25 % Bromphenolblau (w/v) 0,25 % Xylencyanol (w/v) 30 % Glycerin (w/v) 60 mM EDTA, pH 8,0
Coomassie Entfärber	10 % Isopropanol 10 % Essigsäure
Coomassie Färbelösung	25 % Isopropanol (v/v) 10 % Essigsäure (v/v) 0,05 % Coomassie Blue R 250
Denhardt's Lösung (50fach konzentriert)	1 % Polyvinylpyrrolidon (w/v) 1 % BSA (Pentax Frakt. V) (w/v) 1 % Ficoll 400 (w/v)
H <sub>2</sub> O/DEPC	H <sub>2</sub> O wird mit 0,2 % DEPC versetzt, bei RT mindestens 20 min stehen gelassen und zweimal autoklaviert
5 x MOPS-Puffer	0,2 M MOPS (pH 7,0) 50 mM NaOAc 5 mM EDTA
12 % SDS-Probenpuffer (6 x Probenpuffer)	250 mM Tris/HCl pH 6,8 20 % Glycerin (w/v) 12 % SDS (w/v) 20 % 2-Mercapto-Ethanol (w/v) 0,02 % Bromphenolblau (w/v)
SSC (20fach konzentriert)	3 M NaCl 0,3 M Trinatrium-Citrat
TE-Puffer	10 mM Tris/HCl, pH 8,0 1 mM EDTA, pH 8,0
TNET-Puffer	50 mM Tris/HCl pH 7,4 3 mM Na-EDTA 150 mM NaCl 1,25 % Triton X100 (v/v)

### 5.1.4 Medien

*Medien für Escherichia coli*

LB <sub>o</sub> -Medium	1 % Bacto-Tryptone (w/v) 0,5 % Yeast Extract (w/v) 1 % NaCl (w/v) (1,5 % Agar für Platten) bei Bedarf wurden folgende Antibiotika zugesetzt: Ampicillin 100 µg/ml, Kanamycin 100 µg/ml
-------------------------	---

---

SOC-Medium	2 % Bacto-Tryptone (w/v) 0,5 % Yeast Extract (w/v) 10 mM NaCl 2,5 mM KCl 10 mM MgCl <sub>2</sub> 10 mM MgSO <sub>4</sub> 20 mM Glucose
------------	--

*Medium für Agrobacterium tumefaciens*

YEB-Medium	0,5 % Pepton (w/v) 0,1 % Yeast Extract (w/v) 0,5 % Beef Extract (w/v) 0,5 % Saccharose (w/v) 2 mM MgSO <sub>4</sub> (eingestellt auf pH 7,2) bei Bedarf wurden folgende Antibiotika zugesetzt: Streptomycin 100 µg/ml, Kanamycin 100 µg/ml
------------	---

*Medien für Arabidopsis thaliana*

MS-Suc	1 x Murashige & Skoog Minimal Organics Media (Sigma M 6899) 2 % Saccharose (w/v) 0,5 g/l MES (mit 1 N KOH auf pH 5,7) (für Platten mit 1 % Phytagar)
Callus-inducing Medium (CIM)	1x Gamborg's B5 Basal Medium with minimal Organics (Sigma G-5893) 2 % Glucose (w/v) 0,5 g/l MES (mit 1 N KOH auf pH 5,7) 1 % Phytagar 0,5 mg/l 2,4-D; 0,05 mg/l Kinetin
Shoot-inducing Medium (SIM)	1 x Gamborg's B5 Basal Medium with minimal Organics (Sigma G-5893) 2 % Glucose (w/v) 0,5 g/l MES (mit 1 N KOH auf pH 5,7) 1 % Phytagar (Gibco 670-0675 IP) 5 mg/l 2ip (N6 - (2-isopentenyl)Adenin) 0,15 mg/l IAA (Indol-3-Essigsäure) 500 mg/l Carbenicillin 50 mg/l Kanamycin

---

Root-inducing Medium (RIM)	1 x Gamborg's B5 Basal Medium with minimal Organics (Sigma G-5893) 2 % Glucose (w/v) 0,5 g/l MES (mit 1 N KOH auf pH 5,7) 1 % Phytagar 12 mg/l IBA; 0,1 mg/l Kinetin
GM K50	1 x Murashige & Skoog Salt Mixture (Sigma M 5524) 1 % Saccharose (w/v) 1 ml/l Gamborgs Vitamine Solution (Sigma G 1019) 0,5 g/l MES 50 mg/l Kanamycin 1 % Phytagar
<i>Medien für Nicotiana tabacum</i>	
MS-Medium	1 x Murashige & Skoog Minimal Organics Media (Sigma M 6899) 2,0 mg/l Glycin 0,5 mg/l Nicotinsäure 0,1 mg/l Thiamin(HCl) 0,5 mg/l Pyridoxin(HCl) 3 % Saccharose 0,7 % Agar Agar hochrein (Merck 1613)
MS-Greening-Medium	wie MS-Medium mit 1,0 mg/l 6-Benzylaminopurin 0,1 mg/l 1-Naphtylelessigsäure bei Bedarf wurden folgende Antibiotika zugesetzt: Hygromycin 40 µg/ml, Kanamycin 100 µg/ml 500 mg/l Carbenicillin bzw. wie angegeben
BY2-Suspensionskultur-Medium	4,3 g/l MS-Salt base (Imperial) 2 g/l MES 100 mg/l Inosit 30 g/l Saccharose 200 mg/l KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1 mg/l Thiamin 0,2 mg/l 2,4-D
<i>Medien für Allium cepa</i>	
CHU-Medium	1 x Chu Basal Salt Mixture Powder (Sigma C1416) 3 % Saccharose 0,7 % Agar Agar hochrein (Merck 1613)

### 5.1.5 Computerprogramme

Die Tabellenauswertung, Ermittlung von Mittelwerten und Standardabweichungen, sowie die Erstellung von Grafiken zur Darstellung der Daten erfolgte in Microsoft Excel 2000. Statistische Tests wurden in GraphPad Prism 3.00 durchgeführt, wobei zum Vergleich von Datenmengen der zweiseitige Mann-Whitney-U-Test, als nicht parametrischer Test, der keine Gaus'sche Verteilung der Daten voraussetzt, verwendet wurde. Daneben kam der zweiseitige Student-t-Test zum Einsatz, wenn es keine Gründe gab, die gegen eine Gaus'sche Verteilung der Daten sprachen. Der Unterschied der Datenmengen wurde als signifikant gewertet, wenn die Wahrscheinlichkeit (P), dass die beiden Datenmengen aus derselben Grundgesamtheit entnommen sind, kleiner als 5 % war. In Lynnon BioSoft DNAMAN 4.0 wurden Sequenzvergleiche durchgeführt und grafische Darstellungen von Plasmiden generiert. Daneben kam CorelDRAW 8 zur Erstellung von Grafiken zum Einsatz.

## 5.2 Methoden

### 5.2.1 Physiologische Methoden

#### 5.2.1.1 Anzucht und Präparation von Maiskoleoptilen

Das Saatgut (*Zea mays cv. Alois*) wurde nach dem Abwaschen der Beize 24 h im Dunkeln bei Raumtemperatur (RT) in Wasser gequollen, in Keimschalen ausgesät und bei 25°C ebenfalls im Dunkeln angezogen. Die Schalen waren mit 4 Lagen Zellstoff ausgekleidet, die während der Anzucht ständig feucht gehalten wurden. 24 h vor der Ernte wurden die Keimlinge 1 min normalem Raumlicht ausgesetzt, um gerade wachsende, gut ausgebildete Koleoptilen zu bekommen (SCHOPFER, 1989). Am vierten Tag nach der Aussaat wurden die Koleoptilen nach der „Bruchmethode“ geerntet: von 2,5 - 3,5 cm langen Koleoptilen wurden die apikalen 4 mm der mit einer Rasierklinge abgeschnitten, 1 cm weiter wurde die Sollbruchstelle leicht angeritzt, ein 1 cm langes Segment abgebrochen und vom Primärblatt abgezogen.

#### 5.2.1.2 Inkubation der Koleoptilsegmente mit Hormonen

Die präparierten 1 cm langes Koleoptilsegmente wurden in Teilpopulationen von etwa 40 Stück aufgeteilt. Eine dieser Chargen wurde als *in situ*-Probe sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die anderen wurden in 10 ml wässrigen Lösungen 100 min bei 25°C und 120 UpM geschüttelt, abfiltriert und ebenfalls in flüssigem Stickstoff eingefroren. Brassinolid wurde aus einer methanolischen 4 mM Stammlösung zu Endkonzentrationen von 0,2 µM bzw. 2 µM zugegeben; als Kontrolle diente eine Charge die nur 0,05 % Methanol enthielt. IAA wurde aus einer 100 mM ethanolischen Stammlösung zu einer Endkonzentration von 10 µM zugegeben. Methyljasmonsäure wurde zu einer Endkonzentration von 0,007 % (v/v) zugegeben. Um eine Endkonzentration von etwa 1 ppm Ethylen zu erhalten wurde zunächst eine Serumflasche mit reinem Ethylen gefüllt, d.h. 45 min mit Ethylen über Kanülen, die durch das Septum im gasdicht schließenden Deckel gesteckt wurden, durchströmt, und mit einer gasdichten Spritze in einer zweiten gasdichten Serumflasche eine 1 : 100 Verdünnung hergestellt. Daraus wurden 25 µl mit der Spritze entnommen, in eine 30 ml H<sub>2</sub>O enthaltenden, gasdichte Serumflasche gegeben und ÜN geschüttelt, dabei sollte sich 1 ppm Ethylen im Wasser lösen (nach J. Linden, pers. Mitt.). In einer solche Flasche wurden dann die Koleoptilen inkubiert.

### 5.2.1.3 Biotest für die Auxin- bzw. Brassinolidwirkung

1 cm lange Koleoptilsegmente wurden in 10  $\mu\text{M}$  IAA, in 0,2  $\mu\text{M}$  bzw. 2  $\mu\text{M}$  Brassinolid bzw. als Kontrolle in 0,01 % EtOH (v/v) unter leichtem Schütteln etwa 16-22 h bei RT inkubiert und dann die Länge auf 0,5 mm genau gemessen. Waren im Vergleich zur Kontrolle die Auxin-inkubierten Koleoptilen um  $3 \pm 0,5$  mm länger, so galt die Auxininduktion als erfolgreich.

### 5.2.1.4 Versuche zu tropischen Krümmungsreaktionen

#### *Gravi- und phototrope Reizung von Tabakkeimlingen*

Tabak wurde auf MS-Medium mit 100 mg/l Kanamycin in Dosen für 2-5 Wochen angezogen. Zur geotropen Reizung wurden die Dosen auf die Seite gelegt, also 90° gedreht, und so 6–13h inkubiert. Zur phototropen Reizung wurden die Dosen in Schachteln mit nur einer seitlichen Öffnung gestellt, und über diese Öffnung seitlich 12 h bestrahlt.

#### *Gravitrope Reizung von Maiskeimlingen*

Die Wurzeln mitsamt dem Korn von 5-7 Tage alten, im Dunkeln angezogenen Maiskeimlingen mit einer Koleoptillänge zwischen 2 und 3,5 cm wurden mit feuchtem Zellstoff umwickelt, und in Plastikröhrchen gut feucht gehalten. Die Plastikröhrchen wurden so fixiert, dass die Koleoptile waagrecht mit der Spitze auf eine senkrechte Messskala zeigt, dabei wurde darauf geachtet, dass die beiden Leitbündel der Koleoptile senkrecht übereinander zu liegen kamen. Die Lage der Koleoptilspitze wurde über die Zeit von 7 h in kurzen Abständen dokumentiert, und noch einmal nach 22 h. Die Versuchsanordnung wurde über die gesamte Versuchsdauer im Dunkeln gehalten.

### 5.2.1.5 Messung der Sprosshöhe

Da der Vegetationspunkt des Sprosses beim Mais während des Heranwachsens von den Blattscheiden der obersten Blätter umhüllt ist, wurde als Referenzpunkt für die Sprosshöhe die oberste sichtbare Blattligula herangezogen, und ihre Höhe über dem Pflanzsubstrat gemessen. Sobald die Spitze des männlichen Blütenstandes aus der Umhüllung von Blattscheiden heraus trat, löste diese die Blattligula als Referenzpunkt ab.

### 5.2.1.6 GUS-Aktivitätstest

Für den GUS-Aktivitätstest wurden 20 mg 5-Bromo-4-Chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-Glucuronid (X-Gluc) in 200  $\mu\text{l}$  DMF gelöst und in 35 ml 100 mM Tris/HCl pH 7,6 mit 0,5 % Triton X-100 und einer Spatelspitze Ascorbat gegeben. Zu testende Pflänzchen wurden darin untergetaucht, im Vakuum infiltriert und bis zu zwei Tagen bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Pflänzchen mit 70 % EtOH mehrmals gewaschen und in 70 % EtOH gelagert. Aktive  $\beta$ -Glucuronidase spaltet X-Gluc wodurch ein blauer Farbstoff entsteht.

### 5.2.1.7 Tetracyclininduktion

Sterile Tabaksamen wurden in sterilen Dosen mit MS-Medium mit 40 mg/l Hygromycin ausgesät. Nach ein bis zwei Wochen wurden gleich große Agarstücke mit gleich vielen Keimlingen ausgeschnitten und in neue sterile Dosen verfrachtet. Dort wurde je 20 ml flüssiges MS-Medium mit 40 mg/l Hygromycin mit bzw. ohne Tetracyclin zu einer Endkonzentration von 1 mg/l zugegeben und die Keimlinge bei 26°C bei Licht oder im Dunkeln weiter angezogen. Das Flüssigmedium wurde alle zwei bis drei Tage gewechselt.

## 5.2.2 Molekularbiologische Methoden

Nicht näher beschriebene molekularbiologische Methoden wurden nach SAMBROOK *et al.* (1989) durchgeführt.

### 5.2.2.1 RNA-Isolierung

Die Gesamt-RNA aus Koleoptilen wurde nach PALMITER (1974) gewonnen. Dazu wurden die gefrorenen Koleoptilen zunächst in flüssigem Stickstoff zu feinem Pulver zerrieben und in Falconröhrchen (50 ml) mit dem Extraktionsgemisch aus 10 ml 0,1 M Tris/HCl pH 9,0 und 10 ml an Tris gesättigtem Phenol fünfmal für 15 s mit dem Ultra-Turax T25 bei 25 000 UpM homogenisiert. Nach der Phasentrennung (3500 UpM, 10 min, Hettich Rotina S) wurde die wässrige Phase unter starkem Mixen mit 10 ml äquilibriertem Phenol nachextrahiert; die Phenolphase wurde nochmals dreimal für 15 s mit 5 ml 0,1 M Tris/HCl pH 9,0 mit dem Ultra-Turax bei 25000 UpM behandelt. Nach erneuter Phasentrennung (s. o.) wurden die beiden wässrigen Phasen vereinigt und nochmals mit äquilibriertem Phenol extrahiert und schließlich mit 10 ml Chloroform gereinigt. Die RNA wurde mit 2 ml 3 M NaOAc (pH 5,2) und 20 ml EtOH ÜN bei -20°C gefällt und anschließend pelletiert (16 000 x g, 20 min, 4°C). Zur weiteren Aufreinigung wurde das Pellet in 0,5 ml H<sub>2</sub>O<sub>DEPC</sub> resuspendiert, 5 ml 3 M NaOAc (pH 5,2) zugegeben und erneut pelletiert (s. o.). Wieder in 0,5 ml H<sub>2</sub>O<sub>DEPC</sub> resuspendiert wurden nun 4,5 ml 0,3 M NaCl zugegeben und bei 10 000 x g (20 min, 4°C) zentrifugiert. Die im Überstand gelöst bleibende RNA wurde nun mit 10 ml EtOH vermengt und bei -20°C ÜN gefällt, schließlich nochmals pelletiert (16 000 x g, 1 h, 4°C), im Vakuum getrocknet und in 50 µl H<sub>2</sub>O<sub>DEPC</sub> aufgenommen.

Daneben wurde zur RNA-Gewinnung aus Pflanzengewebe auch der RNeasy-Plant-Mini-Kit nach Anleitung verwendet.

### 5.2.2.2 Plasmidisolierung aus Bakterien

Zur Isolierung von Plasmid-DNA wurde eine Minipräparation nach den Angaben von ISH-HOROWICZ & BURKE (1981) durchgeführt. Sollte besonders reine Plasmid-DNA erhalten werden, wie dies z. B. für Sequenzierungen nötig war, so wurde das Promega Wizard™ Minipreps DNA Purification System verwendet. Die einzelnen Arbeitsschritte wurden gemäß der mitgelieferten Benutzeranleitung ausgeführt. Um größere Mengen an Plasmid-DNA zu isolieren, z. B. für Klonierungen, fand auch der NUCLEOBOND®AX PC-KIT 100 Verwendung. Auch hier wurde nach den Angaben des Herstellers verfahren.

### 5.2.2.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Zur Bestimmung der DNA- und RNA-Konzentration wurde die Absorption bei 260 nm gemessen: 1 OD<sub>260</sub> entspricht 40 µg RNA/ml, 1 OD<sub>260</sub> entspricht 50 µg DNA/ml  
Die Reinheit wurde über das Verhältnis der Absorption bei 260 und 280 nm abgeschätzt.

#### 5.2.2.4 Northernblot-Analyse

##### *Gelelektrophorese und Northernblot*

Je 50 µg RNA wurden mit je 10 µl Formamid, 5 µl Formaldehyd und 4 µl MOPS-Puffer 15 min bei 55°C inkubiert, mit 3 µl BJ (6-fach konzentriert) versetzt, sofort auf Eis gestellt und auf einem 2,2 M Formaldehyd enthaltenden 1,4%igen Agarosegel in 1 x MOPS-Puffer mit 0,1 µg/ml Ethidiumbromid für 12 h bei 22 V elektrophoretisch aufgetrennt. Das Gel wurde anschließend in entionisiertem Wasser 1 h gewaschen, wobei das Wasser mehrmals gewechselt wurde. Die RNA wurde sodann mit 20 x SSC als Transferpuffer auf Nitrocellulose (Hybond™-C extra) 4 h bei 60 cm Wassersäule vakuumgeblottet (LKB 2016 Vacu Gene Blotting Apparatur). Die Banden auf dem Blot wurden schließlich unter UV-Licht angezeichnet.

##### *Sondenherstellung*

Radioaktiv markierte Sonden für die Northernanalyse wurden mit dem Megaprime™ DNA Labeling System der Firma Amersham nach dem Herstellerprotokoll unter Verwendung von 50 µCi  $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP synthetisiert.

##### *Hybridisierung*

Der Northernblot wurde vor dem Hybridisieren 2 h bei 80°C gebacken. Vorhybridisiert wurde 2 h bei 38°C in einer Lösung von:

50 % Formamid	6 x SSC
0,1 % SDS	5 x Denhardts
50 µg/ml Lachssperma-DNA (5 min bei 95°C denaturiert)	

Hybridisiert wurde in der gleichen Lösung bei 38°C ÜN mit der zugefügten radioaktiv markierten Sonde. Danach wurde der Blot noch zweimal 30 min in 2 x SSC, 0,1 % SDS und einmal in 1 h in 0,2 x SSC, 0,1 % SDS bei jeweils 40°C gewaschen und anschließend autoradiographiert.

#### 5.2.2.5 Amplifikation von DNA mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Es wurden die Thermocycler PCR-Express bzw. PCR-Sprint der Firma Hybaid verwendet und nach dem Herstellerprotokoll verfahren. Als Polymerasen dienten die RT-PCR HotStarTaq™-Polymerase, die Goldstar DNA Polymerase, die MasterAmp™Tfl DNA Polymerase und die Taq-Polymerase.

RNA für die RT-PCR wurde mit dem RNeasy-Plant-Mini-Kit isoliert, wobei in einem zusätzlichen Schritt die RNA von eventuell mitisolierter DNA, unter Verwendung des RNase-Free-DNase-Sets befreit wurde. Die cDNA wurde mit dem 1st-Strand-cDNA-Synthesis-Kit for-RT-PCR synthetisiert und in eine Standard-PCR eingesetzt. Es wurde jeweils nach den Herstellerangaben verfahren.

#### 5.2.2.6 Enzymatische Behandlung von DNA

Die Behandlung von DNA mit Restriktionsendonukleasen, mit dem Klenow-Fragment, mit Alkalischer Phosphatase und mit Ligase erfolgte jeweils nach den Angaben des Herstellers.

### 5.2.2.7 DNA-Analyse

#### *Agarosegele*

DNA-Fragmente wurden in horizontalen, 0,8-1,5%igen analytischen bzw. präparativen Agarosegelen entsprechend den Beschreibungen von MANIATIS *et al.* (1982) der Länge nach aufgetrennt. Sollten die DNA-Fragmente aus dem Gel isoliert werden, wurde LMP-Agarose verwendet. Als Längenstandard diente *EcoR I / Hind III* geschnittene  $\lambda$ -DNA, bzw. der Gene Ruler™ 100 bp.

#### *Sequenzanalyse*

Sequenzierungen wurden in einer abgewandelten Form nach SANGER *et al.* (1977) von F. Pfannenschmid am Lehrstuhl für Genetik der Universität Regensburg durchgeführt.

## 5.2.3 Biochemische Methoden

### 5.2.3.1 „Pulse-Chase“-Experimente

#### *Metabolische Markierung von Maiskoleoptilsegmenten*

Für eine metabolische Markierung musste die Cuticula der Koleoptilsegmente teilweise entfernt werden. Dazu wurden die Koleoptilen vor dem Schneiden (s. 5.2.1.1) viermal durch eine Schleife aus sehr feinem Schleifpapier (999 Korn) gezogen.

Je 20 aufgeraute Maiskoleoptilsegmente wurden in 10 ml H<sub>2</sub>O - zur Auxininduktion mit 10  $\mu$ M IAA – und 14  $\mu$ Ci/ $\mu$ l mit <sup>35</sup>S-Methionin-Cystein (70 %/30 %) bei 25°C geschüttelt (120 UpM). Nach 45 min wurden nochmals 100  $\mu$ Ci zugegeben und 15 min weiter geschüttelt. Dann wurde mit 20 ml H<sub>2</sub>O gewaschen und in 5 mM Cystein, 5 mM Methionin, 10  $\mu$ M IAA weiter inkubiert. Eine Probe wurde als Nullwert nach dem Waschen sofort in flüssigem Stickstoff gefroren. Die anderen Proben wurden für bestimmte Zeiten weiter geschüttelt und dann nach nochmaligem Waschen in flüssigem Stickstoff tiefgefroren.

#### *NaOH-Aufschluss und Immunpräzipitation*

Tiefgefrorene Koleoptile wurden in flüssigem Stickstoff zu feinem Pulver zerrieben. Das Pulver einer Probe mit je 600  $\mu$ l Aufschlusspuffer (50 mM Tris/HCl pH 7,5, 1 mM PMSF, 1 mM Benzamidin) und 360  $\mu$ l frischem 1,85 M NaOH/7,5 % EtSH gemixt und 15 min auf Eis unter wiederholtem starken Mischen stehen gelassen. Dann wurden 360  $\mu$ l 50%ige TCA zugegeben und gemixt und 15 min bei 13 000 UpM (Biofuge A) abzentrifugiert. Das Pellet wurde mit 1 M Tris-Base gewaschen und in 350  $\mu$ l Resuspensionspuffer (25 mM Tris/HCl pH 7,5, 2 mM EDTA, 1 % SDS) gelöst und beide Fraktionen einer Probe wieder vereinigt. Um das Pellet in Lösung zu bringen wurde kräftig gemixt, 5 min bei 95°C inkubiert und dazwischen immer wieder mit Ultraschall behandelt. Nach Zugabe von 1 ml TNET wurde noch mal gemixt und 30 min bei 20 000 UpM (SS-34-Rotor) abzentrifugiert. Zum Überstand, der einen pH zwischen 7 und 8 hatte, wurden 15 ml affinitätsgereingter Antikörper zugegeben, gemixt und bei 4°C ÜN inkubiert. Um eventuell entstandene Aggregate zu entfernen wurde erneut abzentrifugiert (20 000 UpM, 40 min). Die Antikörper wurden dann an je 10 mg vorgequollener Protein-A-Sepharose gebunden (3 h bei 4°C „end over end“ inkubiert). Nach viermaligem Waschen mit TNET und anschließendem Waschen in Tris-Saline (jeweils 2 min 14 000 x g) wurde der Antigen-Antikörper-Komplex mit 40  $\mu$ l und ein zweites Mal mit 35  $\mu$ l SDS-Probenpuffer abgelöst (5 min 95°C).

### *SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese*

Nach Laemmli (1970) wurden die Proben auf ein 17,5 % Polyacrylamid-Gel aufgetragen und bei 30 mA für 3<sup>1</sup>/<sub>2</sub> h aufgetrennt, Coomassie gefärbt, entfärbt, für 30 min in „Amplify“ gebadet und bei 60°C getrocknet. Nach einer Autoradiografie wurde das Gel noch in einem Instant-Imager gescannt und die Strahlung der einzelnen Banden ausgezählt; davon wurde ein ebenfalls ausgezählter Hintergrundwert abgezogen.

### **5.2.3.2 „Mobility Shift Assay“ mit dem ZMK1-Promotor**

Der ZMK1-Promotorbereich von 1748 bp, der auf dem Plasmid ZMK1-Promo/pCR2.1-topo vorhanden ist, wurde mit den Restriktionsenzymen Bgl I und Nsi I in Stücke von 175, 218, 289, 369 und 705 bp Länge geschnitten. Je 100 ng DNA wurden mit 1 µg des affinitätsgereinigtes MBP:ZmAUX2-Fusionsproteins (ROHRMEIER, 1995), welches mit dem Faktor Xa verdaut worden war (4 h RT in 10 µl 2 M NaCl, 1 µl 1 mM Tris/HCl pH 7,6, 2 µl 50 mM EDTA, 1,2 µl Faktor Xa, 15 µl Fusionsprotein (7,5 mg/ml), 70,8 µl H<sub>2</sub>O), in 20 µl binding buffer (12 mM HEPES pH 8, 4 mM Tris/HCl pH 8,0, 0,06 M KCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT) mit 1 µg BSA und 8 % Glycerin für 20 min bei RT inkubiert. Die Ansätze wurden dann mit 30 % Glycerin Beladungspuffer auf ein bereits bei 4°C und 100 V vorgelaufenes Polyacrylamidgel aufgetragen und in 1 x Tris-Glycin bei 200 V aufgetrennt. Polyacrylamidgel:

- 1,86 ml 5x Tris-Gycin (50 mM Tris/HCl, 380 mM Glycin, 13 mM EDTA, pH 8,5)
- 1,95 ml Acrylamid (30 %-0,38 % bis)
- 1,4 ml 50 % Glycerin
- 70 µl APS (30 %)
- 24 µl TEMED

Die Gele wurden nach dem Lauf mit 0,5 µg/ml EtBr gefärbt und unter UV-Licht fotografiert.

### **5.2.3.3 Calmodulinbindungsstudien**

#### *In vitro Transkription und Translation*

Zur Gewinnung <sup>35</sup>S-Met markiertem ZmAUX2-Protein wurde das TNT-Reticulocyten-Lysat nach Anleitung verwendet, wobei in typischen 50 µl-Ansätzen 1 µg zirkuläre pTR52-DNA und 20 µCi <sup>35</sup>S-Methionin eingesetzt wurde.

#### *„Mobility Shift Assay“*

In 30 µl Bindungsansätzen wurde 1 µl des TNT-Lysats mit dem <sup>35</sup>S-Met-markiertem ZmAUX2 in 100 mM Tris/HCl (pH 7,2) mit 1 mM CaCl<sub>2</sub> eingesetzt und 1 h bei RT mit 2 µg Calmodulin aus Rinderhirn inkubiert. Die Ansätze wurden quantitativ auf nicht denaturierenden 15 % Polyacrylamid Gelen (6 ml Acrylamid, 3 ml Tris/HCl pH 8,8, 0,24 ml 50 mM CaCl<sub>2</sub>, 4 µl TEMED, 0,12 ml APS, 2,66 H<sub>2</sub>O) in 25 mM Tris/HCl (pH 8,3), 192 mM Glycin, 1 mM CaCl<sub>2</sub> Laufpuffer bei 25 mA und 4°C aufgetrennt. Die Gele wurden Coomassie gefärbt, der Standard markiert, wieder entfärbt, mit „Amplify“ behandelt, getrocknet und schließlich autoradiographiert.

## 5.2.4 Herstellung rekombinanter Organismen

### 5.2.4.1 Transformation von *Escherichia coli*

*E. coli*-Zellen wurden durch mehrmaliges Waschen in eiskaltem H<sub>2</sub>O kompetent gemacht und bis zur Verwendung bei -70°C gelagert (SAMBROOK *et al.*, 1989). Zur Elektroporation wurde eine Apparatur von BioRad (Gene Pulser System) verwendet und nach der Anleitung vorgegangen. Nach dem Strompuls wurde der Transformationsansatz sofort in 1 ml SOC-Medium resuspendiert und nach 1 h Rollern bei 37°C auf Selektionsmediumplatten ausplattiert.

### 5.2.4.2 Transformation von *Agrobacterium tumefaciens*

Um Agrobakterien zu transformieren wurde nach der Methode nach HÖFGEN & WILLMITZER (1988) vorgegangen. Um kompetente Zellen zu erhalten wurden 200 ml YEB-Medium mit 2 ml einer 3 ml YEB<sub>Strp.(25 µg/ml)</sub> ÜN-Kultur angeimpft. Nach 4 h logarithmischen Wachstums bei 28°C wurden die Zellen geerntet (3000 x g, 4°C, 20 min), mit gekühltem TE-Puffer (pH 7,5) gewaschen, in 20 ml YEB-Medium aufgenommen und zu je 500 µl aliquotiert. Diese kompetenten Zellen wurden direkt in die Transformation eingesetzt oder in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bei -70°C aufbewahrt.

Zur Transformation wurden kompetente Zellen auf Eis aufgetaut, je 500 µl mit 0,5 - 1,0 µg Plasmid-DNA gemischt und nacheinander je 5 min auf Eis, in flüssigem Stickstoff und bei 37°C inkubiert. Dann wurde mit 1 ml YEB-Medium verdünnt, 3-4 h bei 28°C geschüttelt (200 UpM) und schließlich auf YEB-Platten mit Streptomycin und Kanamycin zur Selektion (je 100 µg/ml) ausplattiert. Die Platten wurden zwei Tage bei 28°C inkubiert, dann konnten Einzelkolonien gepickt und analysiert werden.

### 5.2.4.3 Transformation von *Arabidopsis thaliana*

Es wurde nach der von E. TRUERNIT abgewandelten Methode von VALVEKENS *et al.* (1988) vorgegangen. Die Arbeiten wurden unter der Sterilbank ausgeführt. Inkubiert wurde stets im 22°C-Anzuchttraum mit einem Hell-Dunkel-Rhythmus von 16 h Licht und 8 h Dunkelheit.

#### *Samensterilisation*

Die mindestens zwei Wochen bei 4°C zur Stratifikation aufbewahrten Samen des Stammes C 24 wurden zur Sterilisation mit 1 ml 10 % Na-Hypochlorid und 2-3 Tropfen 10 % SDS überschichtet, gemixt und 15 min bei RT inkubiert. Dann wurden die Samen abzentrifugiert (Mikrotischzentrifuge, 5 min), dreimal mit sterilem H<sub>2</sub>O gewaschen und schließlich unter der Sterilbank auf sterilisiertem Whatmanpapier getrocknet.

#### *Anzucht*

Etwa 100 sterile Samen wurden auf MS-Suc-Platten ausgesät. Dazu wurde der Deckel der Petrischale, in der die Samen auf Whatmanpapier lagerten, kurz gerieben, wodurch er elektrostatisch aufgeladen wird, und die Samen kurzzeitig an ihm haften bleiben. Der Deckel mit den anhaftenden Samen wurde dann über eine Schale mit Aussaatmedium gebracht, und die Samen wieder vom Deckel geklopft. Nach etwa 3 Wochen wurden die nun auf eine Größe von ca. 1 cm herangewachsenen Pflänzchen in 100 ml flüssiges MS-Suc-Medium enthaltende 250 ml Erlenmeyerkolben überführt und unter leichtem Schütteln weiter inkubiert.

### *Transformation*

Nach 10 Tagen wurden die Pflanzen mit etwas Medium in Petrischalen gegeben. Die Wurzeln wurden mit einem Skalpell abgeschnitten, zerteilt und verletzt, und auf einer CIM-Platte („*Callus-inducing Medium*“) verteilt. Nach 3 Tagen Inkubation wurden die Wurzeln auf eine neue Petrischale gebracht und dort mit dem das gewünschte Plasmid enthaltenden Agrobakterienstamm infiziert. Der betreffende Agrobakterienstamm war dazu zuvor 24 h in LB-Medium mit je 100 µg/ml Streptomycin und Kanamycin angezogen und anschließend in antibiotikafreiem LB-Medium aufgenommen worden. Die Wurzeln wurden nach 2 min wieder auf CIM-Platten gebracht und 3 Tage inkubiert, bis sie mit Agrobakterien voll überwachsen waren. Nun wurden die Wurzeln auf SIM-Platten („*Shoot-inducing Medium*“) übertragen, die 500 mg/l Carbenicillin enthielten um die Agrobakterien abzutöten und 50 mg/l Kanamycin zur Selektion auf transformierte *Arabidopsis*-Zellen. Es wurde auf guten Kontakt der einzeln liegenden Wurzeln mit dem Medium geachtet. Alle 2 bis 3 Wochen wurde das Medium erneuert.

### *Regeneration der transformierten Pflanzen*

Etwa drei Wochen nach der Infektion mit Agrobakterien erschienen die ersten grünen Kalli, an denen sich nach weiteren zwei Wochen die ersten Blättchen bildeten. Hatten die Pflänzchen weitere vier bis fünf Blättchen gebildet, so wurden sie zur Induktion der Wurzelbildung auf RIM-Platten („*Root-inducing Medium*“) übertragen und dort zehn Tage inkubiert. Zur Samenbildung wurden die Pflanzen dann in 5-7 ml festes MS-Suc-Medium enthaltende Pflanzenkulturgläser (Sigma C-5916) gesetzt, die einen lockeren Wattebauschstopfen trugen, so dass ein langsames Austrocknen möglich war. Geerntete Samen wurden mindestens zwei Wochen zur Stratifikation bei 4°C gelagert und vor der Aussaat auf GM-K50-Platten sterilisiert.

#### **5.2.4.4 Transformation von *Nicotiana tabacum***

Es wurde nach der Methode von HORSCH *et al.* (1985), abgeändert nach TRUERNIT (pers. Mitt.), vorgegangen. Auch hier wurden alle Arbeiten unter der Sterilbank durchgeführt. Inkubiert wurde stets im 26°C-Anzuchttraum wobei eine Lichtphase von 16 h mit einer Dunkelphase von 8 h abwechselte.

### *Anzucht*

Tabakpflanzen des Stammes *N. tabacum cv. Xanthi* wurden auf MS-Medium mit 3 % Saccharose in sterilen geschlossenen Einmachgläsern kultiviert. Wurden die Pflanzen zu groß oder war das Nährmedium aufgezehrt, so wurden die Vegetationsspitzen mit den ersten 3-4 Blättchen abgeschnitten und in neue Kulturgläser überführt.

### *Transformation*

Für die Transformation wurde der Agrobakterienstamm, welcher das gewünschte Plasmid enthielt, in 10 ml LB-Medium mit Streptomycin und Kanamycin (je 100 µg/ml) angezogen, nach 24 h geerntet und in 5 ml antibiotikafreiem LB-Medium aufgenommen. In eine Petrischale mit dieser Agrobakterienlösung wurden junge Blätter einer steril gezogenen Tabakpflanze gegeben und in etwa 1 cm<sup>2</sup> große Stücke geschnitten. Die Blattstückchen wurden nun auf antibiotikafreiem MS-Greening-Platten, die 1,0 mg/l 6-Benzylaminopurin und 0,1 mg/l 1-Naphtyllessigsäure enthielten, für drei Tage inkubiert, bis sie von

Agrobakterien überwachsen waren. Dann wurden sie auf 500 mg/l Carbenicillin enthaltende MS-Greening-Platten überführt, wo die Agrobakterien abgetötet werden sollten.

#### *Regeneration der transformierten Pflanzen*

Nach einem weiteren Tag kamen die infizierten und noch rasch wachsenden Blattstückchen auf MS-Greening-Platten, die nun zusätzlich 300 mg/l Kanamycin (bzw. 40 mg/l Hygromycin) zur Selektion auf transformierte Zellen enthielten. Dabei wurde stets auf guten Kontakt mit dem Medium geachtet. Die Blattstückchen vergilbten nun allmählich und bildeten an ihren Rändern kleine Kalli. Nach etwa 6 Wochen waren die an den Kalli entstehenden Pflänzchen mit einer Größe von 1 cm soweit, dass sie von den Kalli abgeschnitten und auf MS-Medium, jetzt ohne Hormone, aber immer noch mit 250 mg/l Carbenicillin und 150 mg/l Kanamycin (bzw. 40 mg/l Hygromycin), gesetzt werden konnten. Hier bildeten die erstarkenden Pflanzen rasch Wurzeln, so dass sie nach 3 Wochen auf Erde umgesetzt werden konnten. Geerntete Samen wurden mindestens zwei Wochen bei 4°C zur Stratifikation gehalten und mit Na-Hypochlorid sterilisiert (s. 5.2.4.3). Angesät wurden die Samen auf MS-Medium ohne Hormone, mit entsprechenden Antibiotika.

#### **5.2.4.5 Transformation von *Zea mays***

Die Transformation von Mais wurde von der Firma AgrEvo durchgeführt. Dabei wurden Suspensionskulturen eines Hybridmais protoplastiert und in Gegenwart von PEG mit nackter DNA transformiert. Mikrokalli wurden schließlich auf Selektionsmedium ausplattiert und angezogen. Von den Kalli wurden Proben geschickt, die mittels PCR auf Transgenität getestet wurden. Dabei kamen im Falle der Transformation mit dem Vektor pSK-35S-AUX2 die Oligonucleotide PRT-S35-5 und Aux2-TUSC5komp zum Einsatz, mit deren Hilfe der *CaMV*-35S-Promotor und ein Stück des 5'-Endes der kodierenden *ZmAUX2*-Sequenz amplifiziert wurden. Zusätzlich wurde eine RT-PCR mit Hilfe der Oligonucleotide Aux2TUSC5 und Aux2TUSC3 durchgeführt, die überprüfen sollte, ob *ZmAUX2* tatsächlich in den Kalli transkribiert wird. Diese Oligonucleotide ermöglichten es die kodierende Sequenz des *ZmAUX2*-Gens zu amplifizieren; sie sind also nicht spezifisch für die Transgenität. Im Falle der Transformation mit dem Vektor pPATGUS-39 wurden die Kalli mit den Oligonucleotiden Aux2TUSCProm5 und GUS5kompl und dem Oligonucleotidpaar GUS5 und GUS3 auf Transgenität getestet. Dabei wurden einmal der *ZmAUX2*-Promotor und das 5'-Ende des *GUS*-Gens amplifiziert, und im zweiten Ansatz das *GUS*-Gen. Aus welchen Kalli der beiden Transformationen jeweils Fragmente der richtigen Größe amplifiziert wurden, wurde AgrEvo mitgeteilt.

Dort wurden aus den Kalli ganze Pflanzen regeneriert, die mit Pollen der homozygoten Maislinie B73 bestäubt wurden. Reife Samen wurden dann von AgrEvo erhalten.

#### **5.2.4.6 TUSC-Programm der Firma Pioneer-Hi-Bred**

In ihrem „Trait Utility System for Corn“ (TUSC) stellt die Firma Pioneer-Hi-Bred durch das Transposon Mu mutagenisierte Mais-Samen zur Untersuchung bereit. Die Firma hat eine Sammlung genomischer DNA von 42 000 Pflanzen (F<sub>1</sub>-Generation). Das Genom jeder dieser Pflanzen enthält mehrere Kopien des Transposons Mu. Mu ist hoch mutagen und sollte in den Pflanzen durch Insertion Gene ausgeschaltet haben. Von diesen Pflanzen wurden nach Selbstbestäubung Samen erhalten (F<sub>2</sub>-Generation).

Zum Auffinden einer F<sub>1</sub>-Pflanze, deren *ZmAUX2*-Gen disruptiert worden war, wurden die Oligonucleotide Aux2 TUSC5 und Aux2 TUSC3 entworfen und in einer PCR unter den von Pioneer vorgegebenen Bedingungen (2' 94°C, 35 Zyklen mit je 1' 94°C, 2' 62°C, 2' 72°C und 5' 72°C). Mit jeweils einem dieser Oligonucleotide und einem Mu-spezifischen, an die invertierten Enden des Mu-Transposons bindenden, wurde bei Pioneer nun die gepoolte, genomische DNA der F<sub>1</sub>-Generation PCR-Experimente durchgeführt. Amplifiziert werden sollten nur Fragmente aus genomischer DNA, die eine Mu-Insertion im *ZmAUX2*-Gen trägt, nur dort sind Bindungsstellen beider Oligonucleotide nahe genug zusammen. In „dot blot“-Analysen wurden die PCR-Ansätze mit *ZmAUX2*-DNA hybridisiert. Von positiven DNA-Pools wurde wieder eine PCR mit den entsprechenden Primern angesetzt, die entstandenen Fragmente auf einem Gel aufgetrennt, geblottet und wieder mit *ZmAUX2* hybridisiert. Dann wurde mit DNA-Proben individueller Pflanzen der F<sub>1</sub>-Generation der positiven Pools das Verfahren wiederholt bis einzelne positive F<sub>1</sub>-Pflanzen identifiziert waren. Von zwölf solcher Pflanzen wurden F<sub>2</sub>-Samen erhalten, die jeweils als Familien der entsprechenden F<sub>1</sub>-Individuen bezeichnet werden. Zusätzlich wurde bei Pioneer noch eine PCR mit anschließender Hybridisierung von DNA der F<sub>2</sub>-Generation durchgeführt, wobei nur drei der zwölf ein starkes Signal zeigten. Von diesen drei wurde das PCR-Produkt kloniert und sequenziert.

#### 5.2.4.7 Transiente Transformation von Tabakprotoplasten

BY2-Tabak-Suspensionskulturen wurden in 250 ml Erlenmeyerkolben bei 24°C geschüttelt. Alle sieben Tage wurde ein Aliquot von 10 ml in 100 ml neues BY2-Medium überführt.

##### *Protoplastierung*

Die Protoplastierung von Tabaksuspensionszellen wurde nach HOWARD *et al.* (1992) durchgeführt. Dabei wurden 2,5 ml Tabaksuspensionskultur bei 5 min 100 x g geerntet in 5 ml Protoplasten-Isolationsmedium (PIM: 0,25 M Mannitol, 12 mM NaAc, 50 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 5,8) resuspendiert und mit 0,5 % Serva Onozuka Cellulase, 0,1 % Macerocyme, 0,02 % Seishin-Y-23-Pektolyase mit 14,4 mM β-Mercaptoethanol für 2 h bei RT bei leichtem Rollern verdaut.

##### *Transformation durch Elektroporation und GUS-Aktivitätstest*

Nach dreimaligem Waschen in PIM wurde nach Abschätzung der Zelldichte in der Thomakammer ca. 2x10<sup>6</sup> Zellen in 1 ml Elektroporationspuffer (10 mM HEPES pH 7,2; 0,2 M Mannitol, 150 mM NaCl, 5 mM CaCl<sub>2</sub>) aufgenommen, 50 µl Protoplasten mit 25 µg Plasmid-DNA gemischt, 10 min auf Eis inkubiert und bei 960 µF, 1000 Ω und 250 V elektroporiert, bei diesen Einstellungen ergaben sich typischerweise Stromstöße von 30 ms Dauer. Nach weiteren 10 min auf Eis wurden die Protoplasten in 5 ml 0,4 M Mannitol bei 25°C 20 h inkubiert. 50 ml regenerierter Protoplasten wurden dann bei 50 x g geerntet und in 500 ml GUS-asseymix (0,3 M Mannitol, 50 mM Phosphatpuffer pH 6,5, 4,3 g/l MS salts, 10 mM EDTA, 0,5 mM Kaliumferricyanid, 0,5 mM -ferrocyanid und 2 mM X-Gluc) gefärbt.

#### 5.2.4.8 Mikrobombardierung von Zwiebelepidermiszellen

Ruhende Zwiebeln von *Allium cepa* wurden der Länge nach in vier gleiche Teile geschnitten und die einzelnen Schalen voneinander gelöst. Aus der konkaven Seite wurde die nur locker mit dem Mesophyll verbundene Epidermis in mehrere rechteckige Felder zerteilt, mit der Pinzette abgezogen und auf CHU-Medium-Platten aufgebracht, wobei auf gutes Anliegen der verletzten Seite am Medium geachtet wurde.

Die Mikrobombardierung wurde mit einer Biolistic PDS-1000/He-Apparatur mit folgenden Einstellungen durchgeführt:

Mikroträger:	1,6 µm Goldpartikel
„rupture disk“-Makroträger-Spalt:	8 mm
Distanz Makroträger-Stopnetz:	6 mm
Kammervakuum:	27 mm/Hg
Heliumdruck:	1100 psi
Zieldistanz:	12 cm

Nach dem Beschuss konnten die Epidermiszellen 15-24 h im Dunkeln bei RT regenerieren und wurden dann nach HALL *et al.* (1998) für 2h bei 37°C in:

100 mM Natrium-Phosphat-Puffer pH 7	
1 M EDTA	
1 % Triton X-100	
5 mM Kalium Ferricyanid	
5 mM Kalium Ferrocyanid	
1 mM X-Gluc	zum GUS-Aktivitätstest

## 6. Literaturverzeichnis

- Abel, S. & Theologis, A. (1996): Early Genes and Auxin Action. *Plant Physiol* 111: 9-17.
- Abel, S., Oeller, P. W. & Theologis, A. (1994): Early auxin-induced genes encode short-lived nuclear proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 326-330.
- Abel, S., Nguyen, M. D., Chow, W. & Theologis, A. (1995a): *ACS4*, a Primary Indoleacetic Acid-responsive Gene Encoding 1-Aminocyclopropane-1-carboxylate Synthase in *Arabidopsis thaliana*. Structural characterization, expression in *Escherichia coli*, and expression characteristics in response to auxin. *J Biol Chem* 270 (32): 19093-19099.
- Abel, S., Nguyen, M. D. & Theologis, A. (1995b): The *PS-IAA4/5*-like Family of Early Auxin-inducible mRNAs in *Arabidopsis thaliana*. *J Mol Biol* 251(4): 533-549.
- Adam, G. (1994): Brassinosteroide – eine neue Phytohormon-Gruppe? *Naturwissenschaften* 81: 210-217.
- Allen, G. J., Chu, S. P., Harrington, C. L., Schumacher, K., Hoffmann, T., Tang, Y. Y., Grill, E. & Schroeder, J. I. (2001): A defined range of guard cell calcium oscillation parameters encodes stomatal movements. *Nature* 411: 1053-1057.
- Anai, T., Kono, N., Kosemura, S., Yamamura, S., Hasegawa, K. (1998): Isolation and characterization of an auxin-inducible *SAUR* gene from radish seedlings. *DNA Seq* 9:329-333.
- Anderson, M. & Mulligan, B. (1992): *Arabidopsis* mutant collection. EMBO/EEC Advanced Laboratory course on *Arabidopsis* molecular genetics: 420.
- Baker, D. A. (2000): Long-distance vascular transport of endogenous hormones in plants and their role in source: sink regulation. *Israel J Plant Sci* 48: 199-203.
- Barbier-Brygoo, H., Ephritikhine, G., Klämbt, D & Ghislain, M. (1989): Functional evidence of an auxin receptor at the plasmalemma of tobacco mesophyll protoplasts. *Proc Nat Acad Sci USA* 86: 891-895.
- Bauly, J. M., Sealy, I. M., Macdonald, H., Brearley, J, Dröge, S., Hillmer, S., Robinson, D. G., Venis, M. A., Blatt, M. R., Lazarus, C. M. & Napier, R. M. (2000): Overexpression of Auxin-Binding Protein Enhances the Sensitivity of Guard Cells to Auxin. *Plant Physiol*. 124: 1229-1238.
- Bennett, M. J., Marchant, A., Green, H. G., May, S. T., Ward, S. P., Millner, P. A., Walker, A. R., Schulz, B. & Feldmann, K. A. (1996): *Arabidopsis AUX1* Gene: A Permease-Like Regulator of Root Gravitropism. *Science* 273: 948-950.
- Bergfeld, R., Speth, V. & Schopfer, P. (1988): Reorientation of microfibrils and microtubules at the outer epidermal wall of maize coleoptiles during auxin-mediated growth. *Botanica Acta* 101: 57-67.
- Bilang, J. & Sturm, A. (1995): Cloning and Characterization of a Glutathione S-Transferase That Can Be Photolabeled with 5-Azido-indole-3-acetic Acid. *Plant Physiol* 109: 253-260.
- Bouché N. (2000): Calcium/calmodulin transduction pathways in *Arabidopsis thaliana*: a genetic approach. PhD dissertation, Université Paris-Sud, Centre d'Orsay, Paris, France.
- Brock, T. G., Burg, J., Ghosheh, N. S. & Kaufman, P. B. (1992): The role of calcium in growth induced by indole-3-acetic acid and gravity in the leaf-sheath pulvinus of oat (*Avena sativa*). *J Plant Growth Regul* 11: 99-103.
- Bronsema, F. B. F., van Oostveen, W. J. F & van Lammeren, A. A. M. (1998): Immunocytochemical localisation of auxin-binding proteins in coleoptiles and embryos of *Zea mays* L. *Protoplasma* 202: 65-75.

- Brown, D. E., Rashotte, A. M., Murphy, A. S., Normanly, J., Tague, B. W., Peer, W. A., Taiz, L. & Muday, G. K. (2001):** Flavonoids Act as Negative Regulators of Auxin Transport in Vivo in Arabidopsis. *Plant Physiol* 126: 524-535.
- Caderas, D., Muster, M., Vogler, H., Mandel, T., Rose, J. K. C., McQueen-Mason, S. & Kuhlemeier, C. (2000):** Limited Correlation between Expansin Gene Expression and Elongation Growth Rate. *Plant Physiol* 123: 1399-1413.
- Carpin, S., Crèvecoeur, M., Greppin, H. & Penel, C. (1999):** Molecular cloning and tissue-specific expression of an anionic peroxidase in zucchini. *Plant Physiol* 120(3): 799-810.
- Catalá, C., Rose, J. K. C. & Bennett, A. B. (2000):** Auxin-Regulated Genes Encoding Cell Wall-Modifying Proteins Are Expressed during Early Tomato Fruit Growth. *Plant Physiol* 122: 527-534.
- Chen, W. & Singh, K. B. (1999):** The auxin, hydrogen peroxide and salicylic acid induced expression of the Arabidopsis *GST6* promoter is mediated in part by an ocs element. *Plant J* 19 (6): 667-677.
- Chen, R., Hilson, P., Sedbrook, J., Rosen, E., Caspar, T. & Masson, P. (1998):** The *Arabidopsis thaliana* *AGRAVITROPIC 1* gene encodes a component of the polar-auxin-transport efflux carrier. *Proc Natl Acad Sci* 95: 15112-15117.
- Chen, J. G., Ullah, H., Young, J. C., Sussman, M. R. & Jones, A. M. (2001):** ABP1 is required for organized cell elongation and division in *Arabidopsis* embryogenesis. *Genes Dev* 15: 902-11.
- Cho, H.-T. & Cosgrove, D. J. (2000):** Altered expression of expansin modulates leaf growth and pedicel abscission in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA* 97 (17): 9783-9788.
- Christie, J. M., Reymond, P., Powell, G. K., Bernasconi, P., Raibekas, A. A., Liscum, E. & Briggs, W. R. (1998):** *Arabidopsis* NPH1: a Flavoprotein with the Properties of a Photoreceptor for Phototropism. *Science* 282: 1698-1701.
- Christie, J. M., Salomon, M., Nozue, K., Wada, M. & Briggs, W. R. (1998):** LOV (light, oxygen, or voltage) domains of the blue-light photoreceptor phototropin (*nph1*): Binding sites for the chromophore flavin mononucleotide. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 8779-8783.
- Claussen, M., Lüthen, H., Blatt, M. & Böttger, M. (1997):** Auxin-induced growth and its linkage to potassium channels. *Planta* 201: 227-234.
- Cleland, R. E. (1980):** Auxin and H<sup>+</sup>-excretion: the state of our knowledge. In *Plant Growth Substances* 1979, ed. Skoog, F. (Springer, Berlin), pp. 71-78.
- Cleland, R. E., Buckley, G., Nowbar, S., Lew, N. M., Stinemetz, C., Evans, M. L. & Rayle, D. L. (1991):** The pH profile for acid-induced elongation of coleoptile and epicotyl sections is consistent with the acid-growth theory. *Planta* 186: 70-74.
- Colón-Carmona, A., Chen, D. L., Yeh, K.-C. & Abel, S. (2000):** Aux/IAA Proteins Are Phosphorylated by Phytochrome in Vitro. *Plant Physiol* 124: 1728-1738.
- Corneliusson, B., Holm, M., Waltersson, Y., Onions, J., Hallberg, B., Thornell, A. & Grundstrom, T. (1994):** Calcium/calmodulin inhibition of basic-helix-loop-helix transcription factor domains. *Nature* 368: 760-764.
- Cosgrove, D. J. (1997):** Relaxation in a High-Stress Environment: The Molecular Bases of Extensible Cell Walls and Cell Enlargement. *Plant Cell* 9: 1031-1041.
- Cosgrove, D. J. (2000):** Loosening of plant cell walls by expansins. *Nature* 407: 321-326.
- Daniell, H., Streatfield, S. J. & Wycoff, K. (2001):** Medical molecular farming: production of antibodies, biopharmaceuticals and edible vaccines in plants. *Trends Plant Sci* 6 (5): 219-226.
- Darwin, C. (assisted by Darwin, F.) (1880):** *The Power of Movement in Plants*. London.

- David, K., Carnero-Diaz, E., Leblanc, N., Montestiez, M., Grosclaude, J. & Perrot-Rechenmann, C. (2001): Conformal Dynamics Underlie the Activity of the Auxin-binding Protein, Nt-abp1. *J. Biol. Chem.* 276 (37): 3417-3423.
- Dehesh, K., Bruce, W. B. & Quail, P. H. (1990): A *trans*-acting factor that binds to a GT-motif in a phytochrome gene promoter. *Science* 250: 1397-1399.
- del Pozo, J. C. & Estelle, M. (1999): The *Arabidopsis* cullin AtCUL1 is modified by the ubiquitin-related protein RUB1. *Proc Natl Acad Sci USA* 96(26): 15342-15347.
- Diekmann, W., Venis, M. A. & Robinson, D. G. (1995): Auxins induce clustering of the auxin-binding protein at the surface of maize coleoptile protoplasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 3425-3429.
- Edelmann, H. G. (2001): Lateral redistribution of auxin is not the means for gravitropic differential growth of coleoptiles: A new model. *Physiol Plant* 122: 119-126.
- Edelmann, H. G. & Samajova, O. (1999): Physiological evidence for the accumulation of restrained wall loosening potential on the growth-inhibited side of graviresponding rye coleoptiles. *Plant Biol* 1:57-60.
- Ettliger, C. & Lehle, L. (1988): Auxin induces rapid changes in phosphatidylinositol metabolites. *Nature* 331: 176-178.
- Felle, H. (1988): Auxin causes oscillations of cytosolic free calcium and pH in *Zea mays* coleoptiles. *Planta* 174: 495-499.
- Firn, R. D. & Digby, J. (1980): The Establishment Of Tropic Curvatures In Plants. *Ann Rev Plant Physiol* 31: 131-148.
- Franco, A. R., Gee, M. A. & Guilfoyle, T. J. (1990): Induction and Superinduction of Auxin-responsive mRNAs with Auxin and Protein Synthesis Inhibitors. *J Biol Chem* 265: 15845-15849.
- Frias, I., Caldeira, M. T., Perez-Castineira, J. R., Navarro-Avino, J. P., Culianez-Macia, F. A., Kuppinger, O., Stransky, H., Pages, M., Hager, A. & Serrano, R. (1996): A Major Isoform of the Maize Plasma Membrane H<sup>+</sup>-ATPase: Characterization and Induction by Auxin in Coleoptiles. *Plant Cell* 8: 1533-44.
- Frisch, D. A., Harris-Haller, L. W., Yokubaitis, N. T., Thomas, T. L., Hardin, S. H. & Hall, T. C. (1995): Complete sequence of the binary vector Bin 19. *Plant Mol Biol* 27: 405-409.
- Gälweiler, L., Guan, C., Müller, A., Wisman, E., Mendgen, K., Yephremov, A. & Palme, K. (1998): Regulation of polar auxin transport by AtPIN1 in *Arabidopsis* vascular tissue. *Science* 282: 2226-2230.
- Gatz, C. (1995): Novel Inducible/Repressible Gene Expression Systems. *Meth Cell Biol* 50: 411-424.
- Gee, M. A., Hagen, G. & Guilfoyle, T. J. (1991): Tissue-Specific and Organ-Specific Expression of Soybean Auxin-Responsive Transcripts GH3 and SAURs. *Plant Cell* 3: 419-430.
- Gehring, C. A., Irving, H. R. & Parish, R. W. (1990a): Effects of auxin and abscisic acid on cytosolic calcium and pH in plant cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 9645-9649.
- Gehring, C. A., Williams, D. A., Cody, S. H. & Parish, R. W. (1990b): Phototropism and geotropism in maize coleoptiles are spatially correlated with increases in cytosolic free calcium. *Nature* 345: 528-530.
- Geldner, N., Friml, J., Stierhof, Y. D., Jurgens, G. & Palme, K. (2001): Auxin transport inhibitors block PIN1 cycling and vesicle trafficking. *Nature* 413: 425-428.
- Gil, P. & Green, P. J. (1996): Multiple regions of the *Arabidopsis SAUR-AC1* gene control transcript abundance: the 3' untranslated region functions as an mRNA instability determinant. *EMBO J* 15 (7): 1678-1686.
- Gil, P. & Green, P. J. (1997): Regulatory activity exerted by the *SAUR-AC1* promoter region on transgenic plants. *Plant Mol Biol* 34: 803-808.
- Gil, P., Liu, Y., Orbovic, V., Verkamp, E., Poff, K. L. & Green, P. J. (1994): Characterization of the auxin-inducible *SAUR-AC1* gene for use as a molecular genetic tool in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 104: 777-784.

- Gil, P., Dewey, E., Friml, J., Zhao, Y., Snowden, K. C., Putterill, J., Palme, K., Estelle, M. & Chory, J. (2001):** BIG: a calossin-like protein required for polar auxin transport in *Arabidopsis*. *Genes Dev* 15: 1985-1997.
- Gray, W. M. & Estelle, I. (2000):** Function of the ubiquitin-proteasome pathway in auxin response. *Trends Biochem Sci* 25: 133-138.
- Gray, W. M., del Pozo, J. C., Walker, L., Hobbie, L., Risseeuw, E., Banks, T., Crosby, W. L., Yang, M., Ma, H. & Estelle, M. (1999):** Identification of an SCF ubiquitin-ligase complex required for auxin response in *Arabidopsis thaliana*. *Genes Dev* 13: 1678-1691.
- Grove, M. D., Spencer, G. F., Rohwedder, W. K., Mandava, N. B., Worley, J. L., Warthen Jr, J. D., Steffens, G. L., Flippen-Anderson, J. L. & Cook Jr, J. C. (1979):** Brassinolide, a plant growth-promoting steroid isolated from *Brassica napus* pollen. *Nature* 218: 216-217.
- Guilfoyle, T. J (1999):** Auxin-regulated genes and promoters. In *Biochemistry and Molecular Biology of Plant Hormones*. 423-459. Eds. Hooykaas, P. J. J., Hall, M. A., Libbenga, K. R. Elsevier Science B. V.
- Guilfoyle, T. J., Hagen, G., Li, Y., Ulmasov, T., Liu, Z., Strabala, T. & Gee, M. (1993):** Auxin-regulated Transkription. *Aust J Plant Physiol* 20: 489-502.
- Hagen, G., Kleinschmidt, A. & Guilfoyle, T. (1984):** Auxin-regulated gene expression in intact soybean hypocotyl and excised hypocotyl sections. *Planta* 162: 147-153.
- Hagen, G. & Guilfoyle, T. (1985):** Rapid Induction of Selective Transcription by Auxins. *Mol Cell Biol* 5 (6): 1197-1203.
- Hall, L. N., Rossini, L. , Cribb, L. & Langdale, J. A. (1998):** GOLDEN 2: A Novel Transcriptional Regulator of Cellular Differentiation in the Maize Leaf. *Plant Cell* 10: 925-936.
- Hanahan, D.(1983):** Studies of Transformation of *Escherichia coli* with Plasmids. *J Mol Biol* 166: 557-580.
- Heifetz, P. B. (2000):** Genetic engineering of the chloroplast. *Biochimie* 82: 655-666.
- Henderson, J., Baully, J. M., Ashford, D. A., Oliver, S. C., Hawes, C. R., Lazarus, C. M. Venis, M. A. & 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. (1995):** Auxin binding protein 1 is a red herring. *J Exp Bot* 46: 461-462.
- Höfgen, R. & Willmitzer, L. (1988):** Storage of competent cells for *Agrobacterium* transformation. *Nucl Acids Res* 16: 9877.
- Hoekema, A., Hirsch, P. R., Hooykaas, P. J. J. & Schilperoort, R. A.(1983):** A binary plant vector strategy based on separation of *vir*- and T-region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmid. *Nature* 303: 179-180.
- Horsch, R. B., Fry, J. E., Hoffmann, N. L. Eichholtz, D., Rogers, S. G. & Fraley, R. T. (1985):** A Simple and General Method for Transferring Genes into Plants. *Science* 227: 1229-1231.
- Howard., E. A., Zupan, J. R., Citovsky, V. & Zambryski, P. C. (1992):** The VirD2 Protein of *A. tumefaciens* Contains a C-Terminal Bipartite Nuclear Localization Signal: Implications for Nuclear Uptake of DNA in Plant Cells. *Cell* 68: 109-118.
- Hsieh, H. L., Okamoto, H., Wang, M., Ang, L. H., Matsui, M., Goodman, H. & Deng, X. W. (2000):** FIN219, an auxin-regulated gene, defines a link between phytochrome A and the downstream regulator COP1 in light control of *Arabidopsis* development. *Genes Dev* 14 (15): 1958-1970.
- Hutchinson, K. W., Singer, P. B., McInnis, S., Diaz-Sala, C. & Greenwood, M. S. (1999):** Expansins Are Conserved in Conifers and Expressed in Hypocotyls in Response to Exogenous Auxin. *Plant Physiol.* 120: 827-831.
- Ish-Horowicz, D. & Burke, J. F. (1981):** Rapid and efficient cosmid cloning. *Nucl Acids Res* 9: 2989-2998.

- Jefferson, R. A., Kavanagh, T. A. & Bevan, M. W. (1987):** GUS fusions:  $\beta$ -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J* 6: 3901-3907.
- Johnson, M. A., Pérez-Amador, M. A., Preetmoninder, L. & Green P. J. (2000):** Mutants of *Arabidopsis* defective in a sequence-specific mRNA degradation pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 97 (25): 13991-13996.
- Johnston, T. C., Thompson, R. B. & Baldwin, T. O. (1986):** Nucleotide sequence of the luxB gene of *Vibrio harveyi* and the complete amino acid sequence of the beta subunit of bacterial luciferase. *J Biol Chem* 261: 4805-4811.
- Jones, A. M. (1994):** Auxin-Binding Proteins. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 45: 393-420.
- Jones, A. M. (1998):** Auxin Transport: Down and Out and Up Again. *Science* 282: 2201-2202.
- Jones, A. M., Im, K. H., Savka, M. A., Wu, M. J., DeWitt, N. G., Shillito, R. & Binns, A. N. (1998):** Auxin-Dependent Cell Expansion Mediated by Overexpressed Auxin-Binding Protein 1. *Science* 282: 1114-7.
- Kieber, J. J. & Ecker, J. R. (1993):** Ethylene gas: it's not just for ripening any more! *Trends Gen* 9: 356-362.
- Kim, B. C., Soh, M. C., Kang, B. J., Furuya, M. & Nam, H. G. (1996):** Two dominant photomorphogenic mutations of *Arabidopsis thaliana* identified as suppressor mutations of *hy2*. *Plant J* 9 (4): 441-456.
- Kim, B. C., Soh, M. S., Hong, S. H., Furuya, M. & Nam, H. G. (1998a):** Photomorphogenic development of the *Arabidopsis shy2-1D* mutation and its interaction with phytochromes in darkness. *Plant J* 15 (1): 61-68.
- Kim, Y.-S., Kim, D. & Jung, J. (1998b):** Isolation of a novel auxin receptor from soluble fractions of rice (*Oriza sativa* L.) shoots. *FEBS Lett.* 438: 241-244.
- Kim, Y.-S., Min J.-K., Kim, D. & Jung, J. (2001):** A Soluble Auxin-binding Protein, ABP<sub>57</sub>. Purification with Anti-Bovine Serum Albumin Antibody and Characterization of Its Mechanistic Role in the Auxin Effect on Plant Plasma Membrane H<sup>+</sup>-ATPase. *J Biol Chem* 276 (14): 10730-10736.
- Klämbt, D. (1990):** A view about the function of auxin-binding proteins at plasma membranes. *Plant Mol Biol* 14: 1045-1050.
- Knauss, S. (1995):** Untersuchungen zur Expression der auxininduzierten *ZmAUX*-Gene aus *Zea mays* – Heterologe Expression in *Saccharomyces cerevisiae* – Promotoranalysen in transgener *Arabidopsis thaliana* und *Nicotiana tabacum*. Diplomarbeit, Universität Regensburg, Lehrstuhl für Pflanzenphysiologie und Zellbiologie.
- Koda, Y. & Kikuta, Y. (1994):** Wound-induced Accumulation of Jasmonic Acid in Tissues of Potato Tubers. *Plant Cell Physiol* 335: 751-756.
- Kooter, J. M., Matzke, M. A. & Meyer, P. (1999):** Listening to the silent genes: transgene silencing, gene regulation and pathogen control. *Trends Plant Sci* 4 (9): 340-347.
- Koshiba, T., Ballas, N., Wong, L.-M. & Theologis, A. (1995):** Transcriptional Regulation of *PS-IAA4/5* and *PS-IAA6* Early Gene Expression by Indoleacetic Acid and Protein Synthesis Inhibitors in Pea (*Pisum sativum*). *J Mol Biol* 253: 396-413.
- Kovtun, Y., Chiu, W.-L., Zeng, W. & Sheen, J. (1998):** Suppression of auxin signal transduction by MAPK cascade in higher plants. *Nature* 395: 716-720.
- Kovtun, Y., Chiu, W.-L., Tena, G. & Sheen, J. (2000):** Functional analysis of oxidative stress-activated mitogen-activated protein kinase cascade in plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 2940-2945.
- Kutschera, U. (1994):** The current status of the acid-growth hypothesis. *New Phytol* 126: 549-569.
- Laemmli, U. K. (1970):** Cleavage of the structural proteins during the assemble of the head of the bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.

- Leblanc, N., David, K., Grosclaude, J., Pradier, J.-M., Barbier-Brygoo, H., Labiau, S. & Perrot-Rechenmann, C. (1999):** A Novel Immunological Approach Establishes That the Auxin-binding Protein, Nt-abp1, Is an Element Involved in Auxin Signaling at the Plasma Membrane. *J Biol. Chem.* 274 (40): 28314-28320.
- Lee, Y., Choi, D. & Kende, H. (2001):** Expansins: ever-expanding numbers and functions. *Curr Opin Plant Biol* 4: 527-532.
- Leyser, O. (2001):** Auxin signalling: the beginning, the middle and the end. *Curr Opin Plant Biol* 4:382-386.
- Leyser, H. M. O., Pickett, F. B., Dharmasiri, S. & Estelle, M. (1996):** Mutations in the *AXR3* gene of *Arabidopsis* result in altered auxin response including ectopic expression from the *SAUR-AC1* promoter. *Plant J* 10 (3): 403-413.
- Li, Y., Hagen, G. & Guilfoyle, T. J. (1991):** An auxin-responsive promoter is differentially induced by auxin gradients during tropisms. *Plant Cell* 3: 1167-1175.
- Li, Z.-C., Durachko, D. M. & Cosgrove, D. J. (1993):** An oat coleoptile wall protein that induces wall extension in vitro and that is antigenically related to a similar protein from cucumber hypocotyls. *Planta* 191: 349-356.
- Li, Y., Liu, Z.-B., Shi, X., Hagen, G. & Guilfoyle, T. J. (1994a):** An Auxin-Inducible Element in Soybean SAUR Promoters. *Plant Physiol* 106: 37-43.
- Li, Y., Strabala, T. J., Hagen, G. & Guilfoyle, T. J. (1994b):** The soybean SAUR open reading frame contains a *cis* element responsible for cycloheximide-induced mRNA accumulation. *Plant Molecular Biol* 24: 715-723.
- Li, Y., Wu, Y. H., Hagen, G. & Guilfoyle, T. (1999):** Expression of the Auxin-Inducible GH3 Promoter/GUS Fusion Gene as a Useful Molecular Marker for Auxin Physiology. *Plant Cell Physiol* 40 (7): 675-682.
- Löbler, M. & Klämbt, D. (1985):** Auxin-binding protein from coleoptile membranes of corn (*Zea mays L.*). *J Biol Chem* 260: 9854-9859.
- Luo, C., Shaw, K. T.-Y., Raghavan, A., Aramburu, J., Garcia-Cozar, F., Perrino, B. A., Hogan, P. G. & Rao, A. (1996):** Interaction of calcineurin with a domain of the transcription factor NFAT1 that controls nuclear import. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 8907-8912.
- Luschnig, C. (2001):** Auxin transport: why plants like to think BIG. *Curr Biol* 1: R831-833.
- Maniatis, T., Fritsch, E. F. & Sambrook, J. (1982):** In: *Molecular cloning: A Laboratory Manual* 2nd, Cold Spring Harbour Lab., New York.
- McClure, B. A., Guilfoyle, T. (1989):** Rapid redistribution of auxin-regulated RNAs during gravitropism. *Science* 243: 91-93.
- McClure, B. A., Hagen, G., Brown, C. S., Gee, M. A. & Guilfoyle, T. J. (1989):** Transcription, Organisation, and Sequence of an Auxin-Regulated Gene Cluster in Soybean. *Plant Cell* 1: 229-239.
- McQueen-Mason, S., Durachko, D. M. & Cosgrove, D. J. (1992):** Two Endogenous Proteins That Induce Cell Wall Extension in Plants. *Plant Cell* 4: 1425-1433.
- McQueen-Mason, S., Fry, S. C., Durachko, D. M. & Cosgrove, D. J. (1993):** The relationship between xyloclucan endotransglycosylase and in vitro cell wall extension in cucumber hypocotyls. *Planta* 190: 327-331.
- McQueen-Mason, S. & Cosgrove, D. J. (1994):** Disruption of hydrogen bonding between plant cell wall polymers by proteins that induce wall extension. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 6574-6578.
- McQueen-Mason, S. & Cosgrove, D. J. (1995):** Expansin mode of action on cell walls: Analysis of wall hydrolysis, stress relaxation, and binding. *Plant physiol.* 107: 87-100.
- Meier I. (2001):** The plant nuclear envelope. *Cell Mol Life Sci* 58:1774-1780.

- Millner, P. A., Groake, D. A. & White, I. R. (1996):** Synthetic peptides as probes of plant cell signalling. *G-proteins and the auxin signalling pathways*. Plant Hormone Signal Perception and Transduction: 217-221.
- Mito, N. & Bennett, A. B. (1995):** The *diageotropica* Mutation and Synthetic Auxins Differentially Affect the Expression of Auxin-Regulated Genes in Tomato. Plant Physiol 109: 293-297.
- Mizoguchi, T., Gotoh, Y., Nishida, E., Yamaguchi-Shinozaki, K., Hayashida, N., Iwasaki, T., Kamada, H. & Shinozaki, K. (1994):** Charakterization of two cDNAs that encode MAP kinase homologues in *Arabidopsis thaliana* and analysis of the possible role of auxin in activating such kinase activities in cultured cells. Plant J. 5: 111-122.
- Mockaitis, K. & Howell, S. H. (2000):** Auxin induces mitogenic activated protein kinase (MAPK) activation in roots of *Arabidopsis* seedlings. Plant J 24 (6): 785-796.
- Muday, G. K. & DeLong, A. (2001):** Polar auxin transport: controlling where and how much. Trends Plant Sci. 6 (11): 535-542.
- Müller, A., Guan, C., Galweiler, L., Tanzler, P., Huijser, P., Marchant, A., Parry, G., Bennett, M., Wisman, E. & Palme, K. (1998):** *AtPIN2* defines a locus of *Arabidopsis* for root gravitropism control. EMBO J 17 (23): 6903-6911.
- Nagao, R. T., Goekjian, V. H., Hong, J. C. & Key, J. L. (1993):** Identification of protein-binding DNA sequences in an auxin-regulated gene of soybean. Plant Mol Biol 21(6): 1147-1162.
- Nagpal, P., Walker, L. M., Young, J. C., Sonawala, A., Timpte, C., Estelle, M. & Reed, J. W. (2000):** *AXR2* Encodes a Member of the Aux/IAA Protein Family. Plant Physiol 123: 563-574.
- Nakazawa, M., Yabe, N., Ichikawa, T., Yamamoto, Y. Y., Yoshizumi, T., Hasunuma, K. & Matsui, M. (2001):** *DFLI*, an auxin-responsive *GH3* gene homologue, negatively regulates shoot cell elongation and lateral root formation, and positively regulates the light response of hypocotyl length. Plant J 25 (2): 213-221.
- O'Grady, K., Goekjian, V. H., Naim, C. J., Nagao, R. T. & Key, J. L. (2001):** The transcript abundance of GmGT-2, a new member of the GT-2 family of transcription factors from soybean, is down-regulated by light in a phytochrome-dependent manner. Plant Mol Biol, Oct 47 (3): 367-78.
- Ouellet, F., Overvoorde, P. J. & Theologis, A. (2001):** IAA17/AXR3: Biochemical Insight into an Auxin Mutant Phenotype. Plant Cell 13 (4): 829-841.
- Palme, K. & Galweiler, L. (1999):** PIN-pointing the molecular basis of auxin transport. Curr Opin Plant Biol 2: 375-381.
- Park, Y. D., Papp, I., Moscone, E. A., Iglesias, V. A., Vaucheret, H., Matzke, A. J. & Matzke, M. A. (1996):** Gene silencing mediated by promoter homology occurs at the level of transcription and results in meiotically heritable alterations in methylation and gene activity. Plant J 9:183-194.
- Paul, R. U., Holk, A. & Scherer, G. F. E. (1998):** Fatty acids and lysophospholipids as potential second messengers in auxin action. Rapid activation of phospholipase A<sub>2</sub> activity by auxin in suspension-cultured parsley and soybean cells. Plant J 16 (5): 601-611.
- Perera, I. Y., Heilmann, I., Chang, S. C., Boss, W. F. & Kaufman, P. B. (2001):** A Role for Inositol 1,4,5-Trisphosphate in Gravitropic Signaling and the Retention of Cold-Perceived Gravistimulation of Oat Shoot Pulvini. Plant Physiol 125: 1499-1507.
- Philippar, K., Fuchs, I., Lüthen, H., Hoth, S., Bauer, C. S., Haga, K., Thiel, G., Ljung, K., Sandberg, G., Böttger, M., Becker, D. & Hedrich, R. (1999):** Auxin-induces K<sup>+</sup> channel expression represents an essential step in coleoptile growth and gravitropism. Proc Natl Acad Sci USA 96 (21): 12186-12191.
- Quail, P. H., Boylan, M. T., Parks, B. M., Short, T. W., Xu, Y. & Wagner, D. (1995):** Phytochrome: Photosensory perception and signal transduction. Science 268: 675-680.

- Raizada, M. N., Nan, G.-L. & Walbot, V. (2001):** Somatic and Germinal Mobility of the *RescueMu* Transposon in Transgenic Maize. *Plant Cell* 13: 1587-1608.
- Ramos, J. A., Zenser, N., Leyser, O. & Callis, J. (2001):** Rapid Degradation of Auxin/Indoleacetic Acid Proteins Requires Conserved Amino Acids of Domain II and Is Proteasome Dependent. *Plant Cell* 13: 2349-2360.
- Rashotte, A. M., DeLong, A. & Muday, G. K. (2001):** Genetic and Chemical Reductions in Protein Phosphatase Activity Alter Auxin Transport, Gravity Response, and Lateral Root Growth. *Plant Cell* 13: 1683-1697.
- Rayle, D. L. & Cleland, R. E. (1970):** Enhancement of wall loosening and elongation by acid solutions. *Plant Physiol.* 46: 250-253.
- Rayle, D. L. & Cleland, R. E. (1977):** Control of plant cell enlargement by hydrogen ions. *Curr. Top. Dev. Biol.* 11: 187-214.
- Rayle, D. L. & Cleland, R. E. (1992):** The Acid Growth Theory of Auxin-Induced Cell Elongation Is Alive and Well. *Plant Physiol* 99: 1271-1274.
- Reddy, A. S. N., Koshiba, T., Theologis, A. & Poovaiah, B. W. (1988):** The Effect of Calcium Antagonists on Auxin-induced Elongation and on the Expression of Two Auxin-Regulated Genes in Pea Epicotyls. *Plant Cell Physiol* 29 (7): 1165-1170.
- Reed, J. W. (2001):** Roles and activities of Aux/IAA proteins in Arabidopsis. *Trends Plant Sci* 6 (9): 420-425.
- Reed, J. W., Elumalai, R. P. & Chory, J. (1998):** Suppressors of an *Arabidopsis thaliana phyB* Mutation Identify Genes That Control Light Signaling and Hypocotyl Elongation. *Genetics* 148: 1295-1310.
- Reid, M. S. (1987):** Ethylene in Plant Growth, Development, and Senescence. In: *Plant Hormones and their role in Plant Growth and Development*. 257-279. Ed. Davies, Martinus Nijhoff, Kluwer Academic, Dordrecht, The Netherlands.
- Restrepo, M. A., Freed, D. D. & Carrington, J. C. (1990):** Nuclear Transport of Plant Potyvirus Proteins. *Plant Cell* 2: 987-998.
- Rohrmeier, T. (1995):** Isolierung und Charakterisierung auxin- und wundinduzierter Gene aus Maiskoleoptilen. Dissertation, Universität Regensburg, Lehrstuhl für Pflanzenphysiologie und Zellbiologie.
- Roux, C., Bilanz, J., Theunissen, B.H. & Perrot-Rechenmann, C. (1998):** Identification of new early auxin markers in tobacco by mRNA differential display. *Plant Mol Biol* 37: 385-389.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989):** In: *Molecular cloning: A Laboratory Manual* 2nd edition, Cold Spring Harbour Lab., New York.
- Sanger, F., Milklen, S. & Coulson, A. R. (1977):** DNA-Sequencing with chain-termination inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 74: 5463-5467.
- Scherer, G. F. E. & André, B. (1993):** Stimulation of phospholipase A<sub>2</sub> by auxin in microsomes from suspension-cultured soybean cells is receptor-mediated and influenced by nucleotides. *Planta* 191: 515-523.
- Scherer, G. F. E., Hecker, D. & Müller, J. (1993):** Ca<sup>2+</sup> Ions and Lysophospholipids Activate Phosphorylation of Different Proteins in Plasma Membranes and Tonoplast. *J Plant Physiol* 142: 425-431.
- Scherer, G. F. & André, B. (1997):** Inhibitors of animal phospholipase A<sub>2</sub> enzymes are selective inhibitors of auxin-dependent growth. Implications for auxin-induced signal transduction. *Planta* 202: 462-469.
- Schiebl, C., Walther, A., Rescher, U. & Klämbt (1997):** Interaction of auxin-binding protein 1 with maize coleoptile plasma membranes in vitro. *Planta* 201: 470-476.

- Schopfer, P. (1989):** Experimentelle Pflanzenphysiologie. Bd. 2. Einführungen in die Anwendungen. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 229ff.
- Schopfer, P. & Brennicke, A. (1999):** Pflanzenphysiologie. Springer-Verlag, Berlin.
- Schultz, L., Kerckhoffs, L. H., Klahre, U., Yokota, T. & Reid, J. B. (2001):** Molecular characterization of the brassinosteroid-deficient *lkb* mutant in pea. *Plant Mol Biol* 47:491-498.
- Schwark, A. & Bopp, M. (1993):** Interaction of ethylene and auxin in the regulation of hook growth II: The role of ethylene in different growing regions of the hypocotyl hook of *Phaseolus vulgaris*. *J Plant Physiol* 142: 585-592.
- Schwechheimer, C., Serino, G., Callis, J., Crosby, W. L., Lyapina, S., Deshaies, R. J., Gray, W. M., Estelle, M. & Deng, X.-W. (2001):** Interactions of the COP9 Signalosome with the E3 Ubiquitin Ligase SCF<sup>TIR1</sup> in Mediating Auxin Response. *Science* 292: 1379-1382.
- Shen, W. H., Escudero, J., Schlappi, M., Ramos, C., Hohn, B. & Koukolikova-Nicola, Z. (1993):** T-DNA transfer to maize cells: histochemical investigation of beta-glucuronidase activity in maize tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 90 (4): 1488-1492.
- Shimomura, S., Sotobayashi, T., Futai, M. & Fukui, T. (1986):** Purification and Properties of an Auxin-Binding Protein from Maize Shoot Membranes. *J Biochem* 99: 1513-1524.
- Shimomura, S., Watanabe, S. & Ichikawa, H. (1999):** Characterization of auxin-binding protein 1 from tobacco: content, localization and auxin-binding activity. *Planta* 209: 118-25.
- Smith, H. M. S., Hicks, G. R. & Raikhel, N. V. (1997):** Importin alpha from *Arabidopsis thaliana* is a nuclear import receptor that recognizes three classes of import signals. *Plant Physiol* 114: 411-417
- Snedden, W. A., Fromm, H. (2001):** Calmodulin as a versatile calcium signal transducer in plants. *New Phytologist* 151: 35-66.
- Steffens, B., Feckler, C., Palme, K., Christian, M., Bottger, M. & Luthen, H. (2001):** The auxin signal for protoplast swelling is perceived by extracellular ABP1. *Plant J.* 27(6): 591-599.
- Suge, H. (1971):** Stimulation of oat and rice mesocotyl growth by ethylene. *Plant & Cell Physiol* 12: 831-837.
- Swarup, R., Marchant, A. & Bennett, M. J. (2000):** Auxin transport: providing a sense of direction during plant development. *Biochem Soc Trans* 28: 481-485.
- Swarup, R., Friml, J., Marchant, A., Ljung, K., Sandberg, G., Palme, K. & 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: 2648-53.
- Szymanski, D. B., Liao B. & Zielinski, R. E. (1996):** Calmodulin isoforms differentially enhance the binding of cauliflower nuclear proteins and recombinant TGA3 to a region derived from the *Arabidopsis* Cam-3 promoter. *Plant Cell* 8: 1069-1077.
- Taiz, L. (1984):** Plant cell expansion: regulation of cell wall mechanical properties. *Annu Rev Plant Physiol* 35: 585-657.
- Taiz, L. (1994):** Expansins: Proteins that promote cell wall loosening in plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 7387-7389.
- Takahashi, K., Fujino, K., Kikuta, Y. & Koda, Y. (1994):** Expansion of potato cells in response to jasmonic acid. *Plant Science* 100: 3-8.
- Takahashi, Y., Hasezawa, S., Kusaba, M. & Nagata, T. (1995):** Expression of the auxin-regulated *parA* gene in transgenic tobacco and nuclear localisation of its gene products. *Planta* 196: 111-117.
- Takezawa, D., Ramachandrian, S., Paranjape, V. & Poovaiah, B. W. (1996):** Dual Regulation of a Chimeric Plant Serine/Threonine Kinase by Calcium and Calcium/Calmodulin. *J. Biol. Chem.* 271: 8126-8132.

- Tena, G. & Renaudin, J. P. (1998):** Cytosolic acidification but not auxin at physiological concentration is an activator of MAP kinases in tobacco cells. *Plant J* 16: 173-182.
- Thiel, G., Blatt, M. R., Fricker, M. D., White, I. R. & Millner, P. (1993):** Modulation of K<sup>+</sup> channels in *Vicia* stomatal guard cells by peptide homologs to the auxin-binding protein C terminus. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 11493-7.
- Timpte, C., Wilson, A. K. & Estelle, M. (1994):** The *axr2-1* mutation of *Arabidopsis thaliana* is a gain-of-function mutation that disrupts an early step in auxin response. *Genetics* 138:1239-1249.
- Timpte, C., Lincoln, C., Pickett, F. B., Turner, J. & Estelle, M. (1995):** The *AXR1* and *AUX1* genes of *Arabidopsis* function in separate auxin-response pathways. *Plant J* 8 (4): 561-569.
- Tiwari, S. B., Wang, X. J., Hagen, G. & Guilfoyle, T. J. (2001):** AUX/IAA Proteins Are Active Repressors, and Their Stability and Activity Are Modulated by Auxin. *Plant Cell* 13: 2809-2822.
- Töpfer, R., Maas, C., Hörlicke-Grandpierre, C., Schell, J. & Steinbiss, H.-H. (1993):** Expression Vectors for High-Level Gene Expression in Dicotyledonous and Monocotyledonous Plants. *Methods Enzymol.* 217: 66-78.
- Töpfer, R., Matzeit, V., Gronenborn, B., Schell, J. & Steinbiss, H.-H. (1987):** A set of plant expression vectors for transcriptional and translational fusions. *Nucl Acids Res* 15 (14): 5890.
- Ulmasov, T., Hagen, G. & Guilfoyle, T. (1994):** The *ocs* element in the soybean *GH2/4* promoter is activated by both active and inactive auxin and salicylic acid analogues. *Plant Mol Biol* 26:1055-1064.
- Ulmasov, T., Liu, Z. B., Hagen, G. & Guilfoyle, T. J. (1995a):** Composite Structure of Auxin Response Elements. *Plant Cell* 7: 1611-1623.
- Ulmasov, T., Ohmiya, A., Hagen, G., Guilfoyle, T. (1995b):** The soybean *GH2/4* gene that encodes a glutathione S-transferase has a promoter that is activated by a wide range of chemical agents. *Plant Physiol* 108: 919-927.
- Ulmasov, T., Hagen, G. & Guilfoyle, T. J. (1997):** ARF1, a Transcription Factor That Binds to Auxin Response Elements. *Science* 276: 1865-1868.
- Ulmasov, T., Hagen, G. & Guilfoyle, T. J. (1999):** Activation and repression of transcription by auxin-response factors. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 5844-5849.
- Valvekens, D., van Montagu, M. & van Lijsebettens M. (1988):** *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* root explants by using kanamycin selection. *Proc Nat Acad Sci USA* 85: 5536-5540.
- Varagona, M. J., Schmidt, R. J. & Raikhel, N. V. (1992):** Nuclear Localization Signal(s) Required for Nuclear Targeting of the Maize regulatory protein Opaque-2. *Plant Cell* 4: 1213-1227.
- Venis, M. A. (1995):** Auxin binding protein 1 is a red herring? Oh no it isn't! *J Exp Bot* 46: 463-465.
- Venis, M. A., Napier, R. M., Barbier-Brygoo, H., Maurel, C., Perrot-Rehchenmann, C. & Guern, J. (1992):** Antibodies to a peptide from the maize auxin-binding protein have auxin agonist activity. *Proc Nat Acad Sci USA* 89: 7208-7212.
- Vriezen, W. H., de Graaf, B., Mariani, C. & Voeselek, L. A. C. J (2000):** Submergence induces expansin gene expression in flooding-tolerant *Rumex palustris* and not in flooding-intolerant *R. acetosa*. *Planta* 210: 956-963.
- Watillon, B., Kettmann, R., Arredouani, A., Hecquet, J. F., Boxus, P. & Burny, A. (1998):** Apple messenger RNAs related to bacterial lignostilbene dioxygenase and plant SAUR genes are preferentially expressed in flowers. *Plant Mol Biol* 36:909-915.
- Weinmann, P., Gossen, M., Hillen, W., Bujard, H. & Gatz, C. (1994):** A chimeric transactivator allows tetracycline-response gene expression in whole plants. *Plant J.* 5 (4): 559-569.

- Went, F. W. (1928):** Wuchsstoff und Wachstum. Re. Trav. Bot. Neerl. 29: 379-396.
- Worley, C. K., Zenser, N., Ramos, J., Rouse, D., Leyser, O., Theologis, A. & Callis, J. (2000):** Degradation of Aux/IAA proteins is essential for normal auxin signalling. *Plant J* 21 (6): 553-562.
- Wyatt, R. E., Ainley, W. M., Nagao, R. T., Conner, T. W. & Key, J. L. (1993):** Expression of the *Arabidopsis AtAux2-11* auxin-responsive gene in transgenic plants. *Plant Mol Biol* 22:731-749.
- Yamamoto, M. & Yamamoto, K., T. (1998):** Differential effects of 1-naphthaleneacetic acid, indole-3-acetic acid and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on the gravitropic response of roots in an auxin-resistant mutant of *Arabidopsis*, *aux1*. *Plant Cell Physiol* 6: 660-4.
- Yamamoto, K. T., Mori, H. & Imaseki, H. (1992):** cDNA Cloning of Indole-3-Acetic Acid-Regulated Genes: Aux22 and SAUR from Mung Bean (*Vigna radiata*) Hypocotyl Tissue. *Plant Cell Physiol*. 33(1): 93-97.
- Yang, T. & Poovaiah, B. W. (2000):** Molecular and Biochemical Evidence for the Involvement of Calcium/Calmodulin in Auxin Action. *J. Biol. Chem.* 275 (5): 3137-3143.
- Yi, H., Park, D. & Lee, Y. (1996):** In vivo evidence for the involvement of phospholipase A and protein kinase in the signal transduction pathway for auxin-induced corn coleoptile elongation. *Physiol plant* 96: 359-368.
- Yi, H. C., Joo, S., Nam, K. H., Lee, J. S., Kang, B. G. & Kim, W. T. (1999):** Auxin and brassinosteroid differentially regulate the expression of three members of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase gene family in mung bean (*Vigna radiata* L.) *Plant Mol Biol* 41: 443-454 .
- Yopp, J. H., Mandava, N. B. & Sasse, J. M. (1981):** Brassinolide, a growth-promoting steroidal lactone. I. Activity in selected auxin bioassays. *Physiol Plant* 53: 445-454.
- Zenser, N., Ellsmore, A., Leasure, C. & Callis, J. (2001):** Auxin modulates the degradation rate of Aux/IAA proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 98 (20): 11795-11800.
- Zhang, N. & Hasenstein, K. H. (2000):** Distribution of Expansins in Gravitropically Responding Maize Roots. *Plant Cell Physiol* 41 (12): 1305-1312.
- Zurfluh, L. L. & Guilfoyle T. J. (1982):** Auxin-induced changes in the population of translatable messenger RNA in elongating maize coleoptile sections. *Planta* 156: 525-527.
- Zurek, D. M., Rayle, D. L., McMorris, T. C. & Clouse, S. D (1994):** Investigation of Gene Expression, Growth Kinetics, and Wall Extensibility during Brassinosteroid-Regulated Stem Elongation. *Plant Physiol* 104: 505-513.
- Zurfluh, L. L. & Guilfoyle T. J. (1982):** Auxin-induced changes in the population of translatable messenger RNA in elongating maize coleoptile sections. *Planta* 156: 525-527.
- Zwerger, K. & Hirt, H. (2001):** Recent Advances in Plant MAP Kinase Signalling. *Biol Chem* 382:1123-1131.

## 7. Anhang

### 7.1 Abkürzungen

2,4-D	2,4-Dichlorphenoxyessigsäure	mg	Milligramm
3,5-D	3,5-Dichlorphenoxyessigsäure	min	Minute
Abb.	Abbildung	ml	Milliliter
ADH	Alkoholdehydrogenase	mM	Millimolar
Amp	Ampicillin	MOPS	3-(N-Morpholino)- propansulfonsäure
AuxRE	<i>Auxin responsive element</i>	μl	Mikroliter
bp	Basenpaare	μg	Mikrogramm
BSA	Rinderserumalbumin	NAA	Naphthylessigsäure
CaM	Calmodulin	NaOAc	Natriumacetat
cDNA	Komplementäre DNA	NOS	Nopalinsynthase
cm	Zentimeter	OD <sub>x</sub>	Optische Dichte, gemessen bei x nm Wellenlänge
Ci	Curie	P	Promotor
d	Tag	PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
2,4-D	2,4-Dichlorphenoxyessigsäure	PEG	Polyethylenglycol
3,5-D	3,5-Dichlorphenoxyessigsäure	pers. Mitt.	Persönliche Mitteilung
DEPC	Diethylpyrocarbonat	PMA1	Plasmamembran-ATPase-1
DMF	N, N-Dimethylformamid	PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
DMSO	Dimethylsulfoxid	ppm	<i>parts per million</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure	RNA	Ribonukleinsäure
DST	down stream	RT	Raumtemperatur
DTT	1,3-Dithiothreitol	s	Sekunde
EDTA	Ethylendinitrilotetraessigsäure Dinatriumsalz-Dihydrat ( <i>Titriplex® III</i> )	SAUR	<i>small auxin up RNA</i>
EtOH	Ethanol	SDS	Natriumdodecylsulfat
EtSH	Mercaptoethanol	SSC	<i>standard saline citrate</i>
GUS	β-Glukuronidase	Tab.	Tabelle
h	Stunde	TEMED	N, N, N', N'- Tetramethylethylendiamin
HAc	Essigsäure	T	Terminator
HEPES	N-[2-Hydroxyethyl-]1-Piperazin- N'-[2-Ethansulfonsäure]	Tris	Tris-(hydroxymethyl)- aminomethan
Hyg	Hygromycin	U	<i>Unit</i>
IAA	Indol-3-Essigsäure	ÜN	Über Nacht
Kan	Kanamycin	UpM	Umdrehungen pro Minute
kb	Kilobasenpaare	UV	Ultravioletter Spektralbereich
kDa	Kilodalton	V	Volt
l	Liter	vgl.	vergleiche
LB/RB	linke/rechte Bordersequenz	v/v	Volumenanteile pro Gesamtvolumen
LMP	<i>Low melting point</i>	W	Watt
Leu	Leucin	w/v	Gewichtsanteile pro Gesamtvolumen
M	Molar	x g	-fache Erdbeschleunigung
MBP	Maltose-Binde-Protein		
MCS	<i>Multi cloning site</i>		
Met	Methionin		

## 7.2 Sequenz des genomischen Klons von *ZmAUX2*

1	GGATCCACCGGTAGCAATCTCTGGGTGGCTAGGGCGATATCACAATGTGCTGCCATGCTG	60
61	CTATGCCTCATGGGCCATGAACACCACATGTTGATTGGGTCCAAGATATCTGACAGTTCC	120
121	TCGACAGCTTTATCGCCCTAATCAGTTTGCGATACAGTCTATCTGATTAAGCCTGTCCAC	180
181	CAGAAGTTGCTCGACAGCTTCATCGCCTCTTCGCGCCTGCAGCTGGATCAGTAGCACGT	240
241	CATGTGAGCTTTATTTTCGACAGCATAGCATTGCCATCTGATCGAGACACTCAGCCAAATGCT	300
301	TCCCTGTCCATATTTTGA TGTCCCTCGTTGATCGTCGATGCATCCGAAGACACAACAAGC	360
361	ATGGCATTCCAAGCACTGAAAGCGCCCCATGACCGGCACCAGCATATGGCAAACACTCGG	420
421	CCCATCAAAATCTCATCCAAATCGTGCTCCCTGACACGTCTTGGGACATCACACTCACC	480
481	GCGCCCATGGCCTTGCCTCTCGCCCAACCATTTTCGCTCCAGCAGTTGAGTGAGCTATATA	540
541	TATTCACGGTCAGGTGGCCTTTCAACATCATAACTTGACATCACAAAGCAAATGAAAG	600
601	TCACTCACAGCTCTCCAGCTTCCATCCAGAAAGAAGGAAACGAGCTAGTGAACAGCTAAC	660
661	CATGATCAACGCCAAGAAGATTGCTCATCTCGCCAAGAAGTGGCAGAGGATGGCCTGTAT	720
1	M I N A K K I A H L A K K W Q R M A C I	20
721	AAGGAGGAGGTGCCTCACCTTGGGGGCGGCATCAGCAAATGGAGCGGACGAGTGCTGCGAG	780
21	R R R C L T L G A A S A N G A D E C C S	40
781	CTCTGTGGCGAGAAAGGGCCATTGCGCGGTGTACACGGCCGACGGGGCACGGTTTCGAGGT	840
41	S V A R K G H C A V Y T A D G A R F E V	60
841	GCCTCTTGCCTGCCTTAGCACCCCTGTCTTCGTGGAGCTCCTGCAGATGTCAGAGGAGGA	900
61	P L A C L S T P V F V E L L Q M S E E E	80
901	GTTTGGCTTCGCGGGCGGCATGGCAGGATCACGCTGCCCTGCGACGCGGCGGTCATGGA	960
81	F G F A G G D G R I T L P C D A A V M E	100
961	GTACGCCTTGTGTTTGTCTCAGGAGAGGAGCCTCTGCTGAGCTAGAGCAGGCGTTCCCTTAG	1020
101	Y A L C L L R R G A S A E L E Q A F L S	120
1021	CACCATGGCCATATCATGCCACTGTGCCAGCCACTTGGCGCCGTATGTTGGAGCCACACA	1080
121	T M A I S C H C A S H L A P Y V G A T Q	140
1081	GCAGATCGCTGTTTAGTTGATGTTCACTGTAGTGTAGATATATAGTGGAGCAAAGATATT	1140
141	Q I A V *	144
1141	AGCTAGGTAAAGAAGTAAATAATTATTCAAACCTTCGAATCCTGCAAGGCTGCAACTGAG	1200
1201	CAAGCAATGAAGCAAGGTGTTACAAGTACAAGAAGTTAGAGAGATATGATTCGTGTTCTG	1260
1261	TACAAATGTTTATGGAAATTGTGAGGACTACTCACATTGCATACTTACGTAGCAAACGAC	1320
1321	TTTCTTGTGGACTTGGAACCAACGGGTAGTGTGAGGGTCAGAATTGTTTCAGGCGCTGTTT	1380
1381	GGTTTTAGGGATTGGAGCTCCGGATTGATTTCTAGCCAGATTATTTCTCTAATTTATATA	1440
1441	GATTTTGTGAGCTGGAATGAATCCGGATTTATTCCTGTACAAACGAACGGAGCTGGCAT	1500
1501	GGCGGTTGTGTCATCAGATACATCAGCAGATAAATTCTGGGCTTATTTTCAGAACAGGGTGA	1560
1561	TGAGGATTTCTTGTGTTGCTTTTCAGGCTGAAAACAAGACACTTCCCCAGCAAGATGGGGGA	1620
1621	CAGGGTGAATGGACTGAAGTGTTCAGCAGATGGCAATGC	1662

D1-Element mit **zentralem Motiv**, überlappt mit den Repetitiven Sequenzen, DUE- bzw. NDE-Element

AuxRE, TATA-BOX, ○ : Transkriptionsstart, □ : Stopcodon 5'vor dem Start-ATG,

Zweigeteiltes Kernlokalisierungssignal, DST-Element, Casein-Kinase-II-Phosphorylierungsstelle

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei all jenen bedanken, die zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. L. Lehle für die Möglichkeit in seinem Arbeitskreis zu promovieren, für sein stetes Interesse am Fortgang der Arbeiten und für sein Vertrauen, mir die nötige Freiheit und Selbständigkeit in meiner Arbeit zu gewähren.

Dr. G. Donn von der Firma AgrEvo danke ich für die Durchführung der Maistransformationen.

Die Firma Pioneer Hi bred hat für mich ihren Mutanten Bank nach ZmAUX2-Disruptanten durchsucht und die entsprechenden Samen bereitgestellt.

Dr. Katrin Philippar schickte mir bereitwillig das Plasmid mit dem *ZMK1*-Promotor.

Ohne Frau Angelika Rechenmacher - die Seele der Arbeitsgruppe - geht nix im Lehle-Labor. Ihr und all den anderen Laborkollegen, besonders Dr. Roland Knaur, Dr. Christian Elflein, Ingeborg Schleip, Constanze Riel und Markus Schwarz gilt mein Dank für die nie endende Hilfsbereitschaft, Antworten auf tausend Fragen und das angenehm freundschaftliche Arbeitsklima.

Dr. Eckhard Loos hat mit seiner ruhigen Art viel zur Ordnung meiner Gedanken beigetragen.

Herrn Günther Peissig möchte ich für die hervorragende Betreuung von Mais und Tabak danken.

Pablo Serrano Fernandez danke ich für die Beratung bei der computergestützten statistischen Auswertung.

Besonders möchte ich mich bei Dr. Iris Maldener bedanken, ohne sie wäre die Arbeit wohl immer noch nicht fertig, muchas gracias y hasta la vitoria, siempre!

Danken möchte ich auch meinen kritischen Korrekturlesern Dr. Bettina Staiger und Winfried Köppelle, die diese Arbeit in einen lesbaren Zustand versetzt haben und alle dummen Fehler fanden.

Ganz besonders danke ich meiner Familie, ohne deren Rückhalt und Unterstützung diese Arbeit nicht einmal begonnen worden wäre.