

**Die Rolle von Phosphoinositiden bei der
Auxinsignalleitung von *Arabidopsis
thaliana***

Dissertation

zur Erlangung des

mathematisch-naturwissenschaftlichen Doktorgrades

"Doctor rerum naturalium"

der Georg-August-Universität Göttingen

im Promotionsprogramm Biologie

der Georg-August University School of Science (GAUSS)

vorgelegt von

Stephanie Werner

aus Kassel

Göttingen 2012

Betreuungsausschuss:

Mitglied des Betreuungsausschusses (1. Referent):

Prof. Dr. Ivo Feußner: Abteilung Biochemie der Pflanze, Albrecht-von-Haller-Institut für Pflanzenwissenschaften, Georg-August-Universität Göttingen

Mitglied des Betreuungsausschusses (2. Referent):

Prof. Dr. Ingo Heilmann: Abteilung Zelluläre Biochemie, Institut für Biochemie und Biotechnologie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg. Vormalig Abteilung Biochemie der Pflanze, Albrecht-von-Haller-Institut für Pflanzenwissenschaften, Georg-August-Universität Göttingen

Mitglieder der Prüfungskommission

Mitglied des Betreuungsausschusses (1. Referent):

Prof. Dr. Ivo Feußner: Abteilung Biochemie der Pflanze, Albrecht-von-Haller-Institut für Pflanzenwissenschaften, Georg-August-Universität Göttingen

Mitglied des Betreuungsausschusses (2. Referent):

Prof. Dr. Ingo Heilmann: Abteilung Zelluläre Biochemie, Institut für Biochemie und Biotechnologie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg. Vormalig Abteilung Biochemie der Pflanze, Albrecht-von-Haller-Institut für Pflanzenwissenschaften, Georg-August-Universität Göttingen

weitere Mitglieder der Prüfungskommission:

Prof. Dr. Ernst Wimmer: Abteilung Entwicklungsbiologie, Johann-Friedrich-Blumenbach-Institut für Zoologie und Anthropologie

PD Dr. Michael Hoppert: Abteilung für Allgemeine Mikrobiologie, Institut für Mikrobiologie und Genetik

PD Dr. Thomas Teichmann: Abteilung Pflanzenzellbiologie, Albrecht-von-Haller-Institut für Pflanzenwissenschaften

Dr. Dieter Klopfenstein: Abteilung Biophysik, Drittes Physikalisches Institut

Tag der mündlichen Prüfung: 20. Februar 2013

Hiermit bestätige ich, dass die vorliegende Arbeit unabhängig und ohne Zuhilfenahme anderer Quellen und Hilfsmittel als der angegebenen verfasst wurde.

Stephanie Werner

I. Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Pflanzenwachstum und Phytohormone	1
1.2. Auxin als Vermittler direktionalen Wachstums	2
1.3. Die Biosynthese von Auxin	3
1.4. Der gerichtete Transport von Auxin durch pflanzliche Gewebe	6
1.5. Mediatoren der polaren PIN-Verteilung.....	9
1.6. Wahrnehmung von Auxin und Auxinsignaltransduktion.....	10
1.7. Phosphoinositide und Inositolpolyphosphate	13
1.8. Synthese von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat in <i>A. thaliana</i>	15
1.9. Funktionen von PtdIns4P und PtdIns(4,5)P ₂ in <i>A. thaliana</i>	17
1.10. Synthese und Funktion von IPPs.....	19
1.11. Pflanzenlinien mit Störungen in der Synthese von PIs und IPPs	22
1.12. Zwei Hypothesen für das Zusammenspiel von PIs und Auxin	22
2. Material und Methoden	24
2.1. Chemikalien	24
2.2. Software und Programme	26
2.3. Verwendete Oligonukleotide.....	26
2.4. Pflanzenlinien	28
2.5. Pflanzenmedien	29
2.6. Wachstumsbedingung und Kultivierung von Pflanzen.....	29
2.7. Kreuzungen verschiedener Pflanzenlinien	30
2.8. DNA-Isolation aus Pflanzenmaterial.....	30
2.9. Bestimmung der gravitropen Krümmung von Wurzeln und Hypokotylen von <i>A. thaliana</i>	31
2.10. Bestimmung bei der gravitropen Krümmungsreaktion veränderter Transkripte	31
2.10.1. Ernte gravitrop stimulierter Wurzelspitzen.....	32
2.10.2. RNA-Isolation und Reinigung.....	32
2.10.3. DNase-Behandlung von isolierter RNA.....	33
2.10.4. Fällung von RNA für das Transkrip-Array	33
2.10.5. Fällung von RNA für die quantitative RT-PCR.....	33
2.10.6. Elektrophoretische Trennung von Nukleinsäuregemischen	34
2.10.7. Transkript-Array-Analysen.....	34
2.10.8. Bestimmung spezifischer Transkriptgehalte durch quantitative <i>real-time</i> RT-PCR ..	35
2.11. Subzelluläre Verteilung von PIN-Proteinen nach Gabe von Brefeldin A und Auxin ...	36
2.12. Mikroskopie	36
2.13. Verteilung von DR5::GFP in verschiedenen <i>A. thaliana</i> Linien.....	37
2.14. Darstellung der Auxinverteilung über DR5::GUS.....	38
2.15. Auxintransporttest.....	38
3. Ergebnisse	40
3.1. Der Einfluss von PtdIns(4,5)P ₂ auf den polaren Auxintransport.....	40
3.1.1. Charakterisierung der <i>pip5k1 pip5k2</i> -Doppelmutante.....	41
3.1.2. Auxintransportmessung mit radioaktiv markiertem IAA.....	43
3.1.3. Verminderte gravitrope Krümmung der <i>pip5k1 pip5k2</i> -Doppelmutante	44
3.1.4. Veränderte Lokalisation von PIN-Auxin-Efflux-Proteinen in der <i>pip5k1 pip5k2</i> - Doppelmutante.....	45
3.1.5. Endozytisches „Cycling“ der PIN-Transporter	49
3.1.6. Ermittlung der Auxin-Verteilung mittels GUS-Färbung in der <i>pip5k1 pip5k2</i> - Doppelmutante.....	50
3.1.7. Wachstum der <i>pip5k1 pip5k2</i> -Doppelmutante auf verschiedenen Auxinen	52
3.2. Verminderte Sensitivität für Auxin in Pflanzen mit reduzierten Gehalten an InsP ₆	55

3.2.1. Verminderte gravitrope Krümmung der <i>ipk1-1</i> -Pflanzen.....	55
3.2.2. Auxintransportmessung mit radioaktiv markiertem IAA.....	57
3.2.3. Lokalisierung verschiedener Auxintransporter in <i>ipk1-1</i> -Pflanzen.....	57
3.2.4. Unveränderte endozytische Internalisierung von PIN2-Proteinen in <i>ipk1-1</i> -Mutanten	60
3.2.5. Asymmetrische Verteilung von Auxin während der Gravistimulation	62
3.2.6. Änderung der Genexpression nach Gravistimulation.....	65
3.2.7. Verifizierung im Transkript-Array gefundener Transkriptgehalte ausgewählter Kandidatengene mittels qPCR	71
3.3. Komplexe Änderung im PI-Stoffwechsel und der Auxinsignalleitung in der <i>InsP 5- Ptase</i> -Pflanze	74
3.3.1. Verminderte gravitrope Krümmung der <i>InsP 5-ptase</i> -Pflanzen	75
3.3.2. Auxintransportmessung mit radioaktiv markiertem IAA.....	76
3.3.3. Lokalisierung verschiedener Auxintransporter in der <i>InsP 5-Ptase</i> Pflanzen	77
3.3.4. Veränderte endozytotische Internalisierung von PIN2:GFP in <i>InsP 5-Ptase</i> -Pflanzen	79
3.3.5. Asymmetrische Verteilung von Auxin während der Gravistimulation	82
3.3.6. Änderung der Genexpression nach Gravistimulation.....	84
3.3.7. Verifizierung im Transkript-Array gefundener Transkriptgehalte ausgewählter Kandidatengene mittels qPCR	88
4. Diskussion	91
4.1. Methoden zur Untersuchung auxinabhängiger Prozesse.....	91
4.2. Sowohl PIs als auch IPPs haben Einfluss auf die gravitrope Krümmungsreaktion nach Gravistimulation	92
4.3. Die Verteilung von Auxin wird durch PIN-Proteine diktiert	93
4.4. <i>pip5k1 pip5k2</i> -Doppelmutanten zeigen kein Auxinmaximum in der Wurzelspitze	97
4.5. Trotz verringerten Auxintransports sind <i>pip5k1 pip5k2</i> -Doppelmutanten auxinsensitiv	97
4.6. Die <i>ipk1-1</i> -Mutante zeigte verminderte Krümmung ohne Defizite beim Auxintransport.....	98
4.7. <i>InsP 5-Ptase</i> -Pflanzen zeigten Defekte für den Auxintransport trotz korrekter PIN- Lokalisation	100
4.8. Die <i>InsP 5-Ptase</i> -Pflanzen zeigten eine gestörte Auxinwahrnehmung	103
4.9. PIs sind wichtige Mediatoren der polaren Verteilung von Auxinsignalen.....	104
4.10. Der $InsP_6$ -Kofaktor von TIR1 ist relevant für die auxinvermittelte Genexpression ...	105
4.11. Ausblick.....	106
5. Zusammenfassung	107
6. Anhang.....	109
7. Literaturverzeichnis	110
8. Abkürzungsverzeichnis.....	121
9. Danksagung.....	123
10. Lebenslauf.....	126

1. Einleitung

1.1. Pflanzenwachstum und Phytohormone

Pflanzen als sessile Organismen zeichnen sich durch polares Wachstum aus. Diese Polarität wird schon in der frühen Embryonalentwicklung vor der ersten Zellteilung festgelegt und führt dazu, dass sich der ganze pflanzliche Körper, die Organe und Gewebe an einer polaren Achse orientieren, an deren oberem Ende das Spitzenapikalmeristem und am unteren Ende das Wurzelapikalmeristem steht. Diese asymmetrische Entwicklung wird schon vor der ersten Teilung in der Zygote festgelegt, in der sich die Vakuole in den unteren basalen Teil der Zelle und der zytoplasmatische Anteil des Zelllumens in den apikalen Teil der Zelle bewegt. Während dieser Zeit polarisiert die Zelle und verlängert sich entlang dieser Achse bis es zu einer asymmetrischen Teilung zwischen apikaler und basaler Hälfte der Zelle kommt. Fast der ganze Embryo und die spätere Pflanze entstehen aus der kleineren, apikalen Zelle. Aus der basalen Zelle, die hauptsächlich aus Vakuole besteht wird zunächst der Suspensor, welcher den Embryo mit dem vaskulären Gewebe der Mutterpflanze verbindet (Laux und Jurgens, 1997). Aus der Zelle des Suspensors, welche dem Embryo am nächsten liegt entwickeln sich später nur die Kolumella und das Ruhezentrum im Apikalmeristem der Wurzel.

Wachstum und Entwicklung sind streng regulierte Prozesse, die im Rahmen der natürlichen Entwicklung der Pflanze von inneren Entwicklungsprogrammen wie auch von äußeren Faktoren wie Licht, Temperatur, Wasser, dem Nährstoffgehalt im Boden oder auch dem Vorkommen von Fraßfeinden bestimmt werden. Pflanzen haben viele Strategien entwickelt, auch die äußeren Reize wahrzunehmen. Licht wird zum Beispiel durch spezialisierte Photorezeptoren wahrgenommen, die es der Pflanze ermöglichen, eine Lichtquelle zu lokalisieren und auf sie zuzuwachsen (Whippo und Hangarter, 2006). Ein anderes Beispiel sind Rezeptoren, die der Abwehr verschiedener Schadorganismen dienen, auf bestimmte Substanzen reagieren, die bei der Beschädigung des Gewebes frei werden und eine Signalkaskade in Gang setzen, die zur Produktion pflanzlicher Abwehrstoffe führen können (Schillmiller und Howe, 2005). Die Übermittlung der wahrgenommenen Reize erfolgt innerhalb der Pflanze mithilfe chemischer Signale, deren wichtigste als Phytohormone beschrieben werden. Ein wichtiges Signal für jede pflanzliche Zelle stellt das Phytohormon Auxin dar. Die Lokalisation von Transportern dieses Hormons wird ständig je nach Entwicklungsstufe des Embryos oder auf Grund externer Stimuli angepasst, so dass

Auxin sehr flexibel in das Zielgewebe transportiert werden kann. So ändert sich die Verteilung des Auxinmaximums ständig an Schlüsselstellen der Embryonalentwicklung. Auch später wird das polare Wachstum der Pflanze durch den Auxingradienten aufrechterhalten, da er gewebe- und richtungsspezifisch Zellteilung und -streckung induziert oder hemmt und dem Wachstum somit eine Richtung vorgibt.

Die wichtigsten Phytohormone, die den ganzen Lebenszyklus von der Keimung, über die Ausbildung von Früchten, bis zum Abwurf der Blätter bestimmen, sind Auxine, Gibberelline, Ethylen, Cytokinine, Abscisinsäure und die Brassinosteroide. Weitere wichtige Hormone, die besonders relevant sind für die Pathogenabwehr sind Jasmonsäure und Salicylsäure. Diese Signal-Botenstoffe liegen im pflanzlichen Gewebe ausnahmslos in sehr geringer Konzentration vor, sind aber dennoch in der Lage, über weite Strecken durch Bindung an spezialisierte Rezeptorproteine gravierende Änderungen im Wuchs der Pflanze hervorzurufen. So wird Auxin hauptsächlich im Apikalmeristem einer Pflanze gebildet, sorgt aber dennoch dafür, dass weiter unten am Spross liegende Seitentriebe nicht auswachsen, damit die sogenannte Apikaldominanz gewährleistet bleibt. Dieser Prozess wird jedoch nicht allein durch Auxin kontrolliert, sondern beruht auf dem Zusammenspiel mehrerer Phytohormone wie beispielsweise Cytokinin und anderer Substanzen (Tanaka et al., 2006). Allgemein ist hervorzuheben, dass die meisten Adaptionen von Pflanzen an Umweltreize von dem Zusammenspiel einer Vielzahl von Hormonen und anderen regulatorischen Komponenten gesteuert werden. Dennoch kann man viele grundlegende pflanzentypische Reaktionen auf die Wirkweise hauptsächlich eines Phytohormons reduzieren. So wird Auxin, dessen Bezeichnung sich vom altgriechischen $\alpha\upsilon\chi\alpha\nu\omega$ („wachsen“) ableitet, in der Literatur auch oft als Wachstumshormon beschrieben, da es wichtige Prozesse der pflanzlichen Embryonalentwicklung, des Wurzelwachstums und auch der Sprossentwicklung reguliert (Teale et al., 2006).

1.2. Auxin als Vermittler direktionalen Wachstums

Auxin war das erste, wissenschaftlich untersuchte Phytohormon. Schon im späten 19. Jahrhundert wurde der Effekt des sogenannten Phototropismus von Charles Darwin untersucht und in seinem Artikel „The Power of Movement in Plants“ von 1880 beschrieben. Später fand Frits Went heraus, dass es möglich war, die Substanz, die die Krümmung hervorrief, aus einer abgeschnittenen Coleoptile eines Grasgewächses in einen Agarblock diffundieren zu lassen (Went, 1926). Somit war bewiesen, dass es sich um eine chemische Substanz handeln musste, die sich auf Grund ihrer Eigenschaften als authentisches Pflanzenhormon qualifizierte (Teale et al., 2006). Mitte der 1930-iger stellte

sich heraus, dass es sich bei der chemischen Substanz um Indol-3-Essigsäure (IAA) handelt, welche das häufigste in der Pflanze natürlich vorkommende Auxin ist. Heute ist bekannt, dass Auxine wichtige Regulatoren der pflanzlichen embryonalen und postembryonalen Entwicklung und des Gravi- und Phototropismus darstellen. Damit nehmen sie Einfluss auf die Zellteilung, die Zellstreckung und auch die Differenzierung von Geweben (Teale et al., 2006). Viele Aspekte, wie Auxin diese Prozesse reguliert, sind jedoch noch unbekannt und Gegenstand der aktuellen Forschung.

Ein besonderer Fokus dieser Arbeit lag auf der Untersuchung molekularer Mechanismen, über die Auxin die gravitrope Krümmungsreaktion von Pflanzen vermittelt, welche dazu führt, dass sich Spross und Wurzel nach dem Schwerkraftvektor orientieren. Legt man eine Pflanze auf die Seite, so beginnt sich der Spross wieder nach oben zu biegen und die Wurzel nach unten. Dieser Effekt ist darauf zurückzuführen, dass sich Auxin nach Reorientierung der Pflanze relativ zum Schwerkraftvektor asymmetrisch im Pflanzenkörper verteilt. Für den Spross bedeutet dies, dass sich Auxin an der lateralen Seite sammelt und das Gewebe dort dazu anregt schneller zu wachsen. In der Wurzel ist der Prozess der gleiche, jedoch hat Auxin dort eine gegensätzliche Wirkung. Ein Transport an die laterale Seite führt hier zu einer Hemmung des Wachstums, so dass sich das Gewebe an der Oberseite der Wurzel, mehr streckt als die Unterseite. Die Wahrnehmung der Reorientierung relativ zum Schwerkraftwinkel beginnt sowohl im Spross, als auch in der Wurzel in stärkehaltigen Geweben. Für das Wurzelgewebe wurde die sogenannte Statolythen-Theorie aufgestellt, welche besagt, dass sich die Lage stärkehaltiger Amyloplasten innerhalb der Columella-Zellen der Wurzelspitze nach der Schwerkraft orientiert (MacCleery und Kiss, 1999). Ändert sich die Orientierung der Wurzelspitze, so fallen diese Amyloplasten innerhalb der Zelle auf die Seite und lösen damit eine Signalkaskade aus, die zur Umverteilung von Auxin führt. Wie diese Umorientierung der Amyloplasten jedoch innerhalb der Zelle wahrgenommen wird und ob dies der einzige Weg der Schwerkraftperzeption ist, ist bisher nicht eindeutig geklärt. Man nimmt aber an, dass das Aktinzytoskelett dabei eine Rolle spielt (Morita, 2010). In jedem Fall kann dieser Effekt experimentell genutzt werden, um Pflanzen auf auxinvermittelte Prozesse zu untersuchen und Mutanten zu identifizieren, die Störungen in der Auxinantwort und somit veränderte Krümmungsreaktion aufweisen.

1.3. Die Biosynthese von Auxin

Die Auxinsynthese ist ein komplexer Prozess, der noch nicht gänzlich verstanden ist. Die Auxinsynthese findet hauptsächlich in jungen Geweben statt und im Meristem des Sprosses

und der Wurzelspitze (Ljung et al., 2001). Es wurden bisher fünf Synthesewege postuliert, von denen vier Tryptophan (Trp)-abhängig sind und einer Trp-unabhängig (Mano und Nemoto, 2012). Trp wird zunächst durch mehrere Reaktionen aus Chorismat im Chloroplasten gebildet (Radwanski und Last, 1995) und durch verschiedene enzymatische Reaktionen zu Indol-3-Essigsäure umgewandelt.

1. Indol-3-acetamid (IAM)-Weg:

Der IAM-Weg wurde zunächst für bakterienspezifisch gehalten. Das Bakterium *Agrobacterium rhizogenes* enthält auf seinem Ri-Plasmid zwei Enzyme, die Trp zu IAA konvertieren. Die Gene dafür wurde *aux1* und *aux2* genannt und kodieren für eine Oxygenase und eine Hydrolase (Gaudin et al., 1993). Ein Gen, für ein im Cytoplasma vorliegendes Protein mit Hydrolase-Funktion das IAM zu IAA umwandelt, wurde aus *Nicotiana sp.* isoliert und *NtAMI1* genannt (Nemoto et al., 2009). Ein homologes Gen wurde ebenfalls für *Arabidopsis thaliana* (*A. thaliana*) identifiziert (*AtAMI1*) (Pollmann et al., 2003). Das Intermediat IAM konnte in vielen Pflanzen nachgewiesen werden, unter anderen auch in Citrusfrüchten, Kürbisgewächsen und *A. thaliana*, aber auch in monokotylen Pflanzen wie Mais und Reis (Lemcke et al., 2000; Mano and Nemoto, 2012; Pollmann et al., 2002; Sugawara et al., 2009), was dafür spricht, dass der IAM-Weg im Pflanzenreich weit verbreitet ist. Dennoch wurde bisher kein Gen identifiziert, welches dem auf dem Ri-Plasmid kodierten *aux1*-Gen entspricht und die Reaktion von Trp zu IAM katalysiert. Eine weitere Möglichkeit ist, dass dieses Intermediat durch den Trp-unabhängigen Weg synthetisiert wird.

2. Indol-3-Pyruvat (IPA)-Weg

Der IPA-Weg beschreibt die Synthese von Trp über IPA katalysiert durch *TRYPTOPHAN AMINOTRANSFERASE OF ARABIDOPSIS 1* (TAA1). Identifiziert wurde das Gen durch Analysen an Mutanten, welche unter anderem Defekte in der Ethylen-Antwort aufwiesen (Stepanova et al., 2008). Später fanden Yamada et al. heraus, dass TAA1 isogen mit *TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE 2* (*TIR2*) ist (Yamada et al., 2009). Der Syntheseweg über IPA kommt nicht nur in Pflanzen vor, sondern auch in Bakterien. Dort wird IPA durch eine Indol-3-Pyruvat-Decarboxylase zu Indol-3-Acetaldehyd (IAD) decarboxyliert (Costacurta et al., 1994) und anschließend zu IAA oxidiert. In Pflanzen wurde kein Enzym identifiziert, welches die Reaktion von IPA zu IAD katalysiert. Zudem konnte IAD bisher nur in Erbsen-Gewächsen nachgewiesen werden (Quittenden et al., 2009). Kandidaten für Aldehyd-Oxidasen (AO), welche IAD zu IAA umsetzen, wurden in mehreren Pflanzenspezies nachgewiesen. Unter anderem in *A. thaliana* (Seo et al., 1998). Diese Enzyme zeichnen sich durch ein breites Substratspektrum aus und spielen in vielen Entwicklungsprozessen eine

entscheidende Rolle (Mendel und Bittner, 2006). Neuste Studien belegen, dass IPA auch ein Substrat für Enzyme der YUCCA (flavin monooxygenase-like proteins (YUC))-Familie darstellen (Mashiguchi et al., 2011). Die Produkte der *YUC*-Gene wurden bisher einer separaten, vom IPA-Weg unabhängigen IAA-Synthese zugeordnet, dem sogenannten YUCCA-Weg, obwohl TAA-Mutanten und YUC-Mutanten ähnliche Phänotypen ausbilden (Zhao, 2010). Ein neuer Weg postuliert eine zweistufige Reaktion von Trp über IPA (katalysiert von TAA1) zu IAA (katalysiert von YUC1) und scheint den Hauptsyntheseweg für IAA in Pflanzen darzustellen (Mashiguchi et al., 2011).

3. Der Tryptamin (TAM)-Weg

Der Erste Schritt des TAM-Weges ist die Decarboxylierung von Trp zu Tryptamin durch eine Trp-Decarboxylase (TDC). Hierbei handelt es sich um cytosolisch vorkommende Enzyme, welche sowohl in dikotylen als auch in monokotylen Pflanzen nachgewiesen wurden. TAM stellt in Pflanzen ein Intermediat bei der Herstellung von Alkaloiden und Serotonin dar. TDC-Überexpressionslinien weisen hohe Gehalte an TAM auf, jedoch nicht an IAA (Songstad et al., 1990), dafür aber an Serotonin, was dafür spricht, dass TAM eher zur Produktion dieser Stoffe als zur IAA-Synthese genutzt wird. Von Zhao et al wurde postuliert, dass TAM ein Zwischenschritt in der IAA-Synthese ist und von Proteinen der YUCCA-Familie zu N-hydroxytryptamin oxidiert wird, das wiederum eine Vorstufe zu IAA darstellen sollte (Zhao et al., 2001). Dieses Konzept wurde von Tivendale et al. allerdings wiederlegt, so dass es bisher kaum Hinweise dafür gibt, dass der TAM-Weg in Pflanzen der Synthese von IAA dient (Tivendale et al., 2010).

4. Der Indol-3-acetaldoxim (IAOX)-Weg

Der IAOX-Weg wurde bisher nur in Brassicaceen nachgewiesen, und die Enzyme CYP79B2 sowie CYP79B3, die aus Trp IAOX synthetisieren, wurden bisher nur hier gefunden (Hull et al., 2000). IAOX ist ein Intermediat der Synthese von Sekundärmethaboliten wie Indol-Glucosinolaten, Camalexin und Indol-3-Acetonitril (IAN) (Hansen und Halkier, 2005). Zunächst wurde angenommen, dass IAN eine Vorstufe von IAA darstellt. Dies konnte jedoch bis heute nicht bestätigt werden und man nimmt an, dass es eher als Phytoalexin wirkt und eine Rolle in der Abwehr gegen Pilze einnimmt (Pedras et al., 2002).

Für den Trp-unabhängigen Weg wird angenommen, dass das Indol-3-Glycerinphosphat oder Indol, aus welchem Trp synthetisiert wird, eine Vorstufe von IAA darstellt (Zhang et al., 2008). Es gibt also einige mögliche Wege, die zur Bildung von IAA führen. Keiner dieser Wege ist jedoch bisher in all seinen Details erfasst. Am wahrscheinlichsten ist ein Zusammenspiel mehrerer Wege in Pflanzen, wobei es wohl auch Spezies-exklusive Synthesemöglichkeiten gibt, die sich evolutionär in Anpassung an bestimmte

Gegebenheiten entwickelt haben könnten. Der hauptsächlich genutzte Weg zur Synthese von IAA könnte jedoch der von Mashiguchi et al. vorgeschlagene Weg über IPA sein, was durch die TAA1-Aktivität entsteht und von Enzymen der YUCCA-Familie zu IAA umgesetzt wird.

1.4. Der gerichtete Transport von Auxin durch pflanzliche Gewebe

Der Transport von Auxin innerhalb einer Pflanze und auch innerhalb einer Zelle ist streng reguliert. Auxin ist für eine Vielzahl von Prozessen wie die Embryonalentwicklung, die Entwicklung der Gewebeidentität, polares und tropisches Wachstum und auf zellulärer Ebene für die Zellteilung, Zelldifferenzierung oder auch die Zellexpansion nötig (Löpfke et al., 2012). Da die Auxinsynthese hauptsächlich in meristematischen Geweben stattfindet, muss das Hormon durch andere Gewebe transportiert werden. Dieser Transport findet im Zentralzylinder statt. Da das Apikalmeristem den Hauptsyntheseort für Auxin darstellt, wird dieses hauptsächlich unidirektional Richtung Wurzel transportiert. Eine weitere Möglichkeit des Transports ist der nicht polare Transport über das Phloem, der über „source-sink“-Verhältnisse funktioniert (Friml, 2003). Dabei wird IAA durch das Auxin-Import-Protein AUXIN RESISTANCE 1 (AUX1) in das vaskuläre Gewebe geschleust. Dieser Transport ist unter anderem für das Auswachsen von Lateralwurzeln nötig. Mutanten, denen AUX1 fehlt zeigen im Vergleich zum Wildtyp weniger Lateralwurzeln, da weniger IAA über das Phloem Richtung Wurzel transportiert wird (Marchant et al., 2002).

Der polare Transport ist jedoch die Hauptform der Auxinverteilung und findet ausschließlich mit der aktiven, freien Form des Auxins statt, was nicht durch Konjugation an zum Beispiel Aminosäuren, Methylgruppen oder auch ganze Peptide inaktiviert wurde (gebundenes, inaktives IAA wird nur wenig transportiert) (Ludwig-Muller, 2011). Der Transport freien Auxins von Zelle zu Zelle findet über Import- und Exportproteine in der Zellmembran statt, wobei der Import von IAA auch über freie Diffusion stattfinden kann. Hierbei kann die im Apoplasten vorliegende lipophile, protonierte Form durch die Plasmamembran diffundieren. Innerhalb der Zelle kommt es dann zu einer Deprotonierung, wodurch eine Diffusion aus der Zelle ausgeschlossen wird. Für diesen Weg ist aktiver Transport essenziell. Der Import von IAA wird neben der Diffusion von den Transportproteinen AUX1 und LIKE AUX1 (LAX) koordiniert. AUX1 und die Importer LAX1-LAX3 scheinen als Protonen/Auxin-Symporter zu funktionieren (Carrier et al., 2008). Mutanten der korrespondierenden Gene zeigen Defekte in der Entwicklung des embryonalen Ruhezentrums und der Kolumellazellen der Wurzel (Ugaratechea-Chirino et al., 2010). Außerdem zeigt die *aux1*-Mutante

agravitropes Wachstum, wodurch deutlich wird, dass der aktive Auxin-Import in Zellen nicht allein durch Diffusion ausgeglichen werden kann und wichtig für die Reaktion auf gravitrope Stimulation ist (Bennett et al., 1996). Eine weitere Klasse der Auxinimporter ist der NITRATE TRANSPORTER 1.1 (NRT1.1), welcher zu vermehrter Auxinaufnahme bei Stickstoffmangel führt (Krouk et al., 2010). Dies deutet auf eine Verbindung der Nährstoffwahrnehmung durch die Pflanze und zielgerichteten Wachstum hin.

Die vielleicht prominentesten Vertreter von Proteinen zum polaren Auxintransport sind die Auxinexporter. Zu diesen zählen die PIN-FORMED- (PIN) und die ATP-BINDING-CASSETTE B- (ABCB) Auxineffluxproteine. PIN-Proteine lassen sich in zwei Typen unterteilen. Zu den typischen Exportern zählen PIN1, 2, 3, 4 und 7. Diese PIN-Isoformen zeichnen sich durch eine lange hydrophile Region in ihrer Mitte aus und werden daher auch als lange Exporter bezeichnet. PIN5, 6 und 8 besitzen dagegen nur eine sehr kurze hydrophile Region und zählen zu den atypischen kurzen PINs (Löfke et al., 2012). Manchmal wird PIN6 wegen seiner Ähnlichkeit zu Exportern mit langer hydrophiler Region zu den typischen PINs gezählt (Krecek et al., 2009). Diese hydrophile Region scheint wichtig für die Bindung an die Plasmamembran zu sein, da die typischen PINs ausnahmslos dort lokalisieren. Die atypischen PINs hingegen lokalisieren intrazellulär, wie etwa PIN5 am ER, wo es wohl eine Rolle bei der intrazellulären Homöostase des Auxins eine Rolle spielt (Mravec et al., 2009). Im Gegensatz zu AUX1, welches sowohl symmetrisch als auch asymmetrisch je nach Zelltyp an der Membran lokalisiert, zeigen die plasmamembranständigen PINs asymmetrische Verteilungsmuster und liegen meist polar an einer Seite der Membran vor (Blilou et al., 2005; Swarup et al., 2001). Auch die gewebespezifische Expression ist stark reguliert und ändert sich während der Entwicklung der Pflanze. So sind manche PINs in bestimmten Geweben in der Embryonalentwicklung vertreten und erst später wieder an anderer Stelle relevant. PIN1 zeigt das breiteste Expressionsmuster über Gewebe und Entwicklungsstadien und ist in apikalen Geweben des frühen Embryostadiums, innerhalb des vaskulären Gewebes bis fast in die Wurzelspitze, im Sprossspitzenmeristem und in sich entwickelnden Organen vorhanden (Krecek et al., 2009). PIN2, 3 und 4 sind hauptsächlich in der Wurzelspitze vertreten und spielen eine wichtige Rolle bei der Auxinumverteilung nach gravitroper Stimulation (Friml et al., 2002a; Friml et al., 2002b; Müller et al., 1998). PIN7 lokalisiert ebenfalls in der Wurzelspitze, ist aber auch bei der Embryonalentwicklung wichtig. PIN5 ist ubiquitär exprimiert, während PIN8 nur im männlichen Gametophyten vorkommt (Krecek et al., 2009). Die PIN-Aktivität kann über viele Faktoren reguliert werden, unter anderem über transkriptionale Regulation, Abbau, subzellulären Vesikelverkehr oder Transportaktivität. Zum Beispiel induziert Auxin die Transkription

langer PINs, jedoch nicht die der kurzen, wie für PIN5 gezeigt wurde (Mravec et al., 2009). Ein anderes Beispiel ist der subzelluläre Vesikelverkehr. PIN-Proteine werden ständig zwischen der Plasmamembran und Endomembranen transportiert, um eine flexible Lokalisierung zu gewährleisten. PIN1 lokalisiert an der basalen Seite der Plasmamembran in den Zellen im Zentralzylinder. PIN2 lokalisiert in Kortexzellen basal und in der Epidermis an der apikalen Membran. PIN3, 4 und 7 zeigen weitestgehend keine Präferenz, da sie hauptsächlich in der Wurzelspitze lokalisieren und dort vornehmlich die Verteilung von Auxin zu allen Seiten regeln.

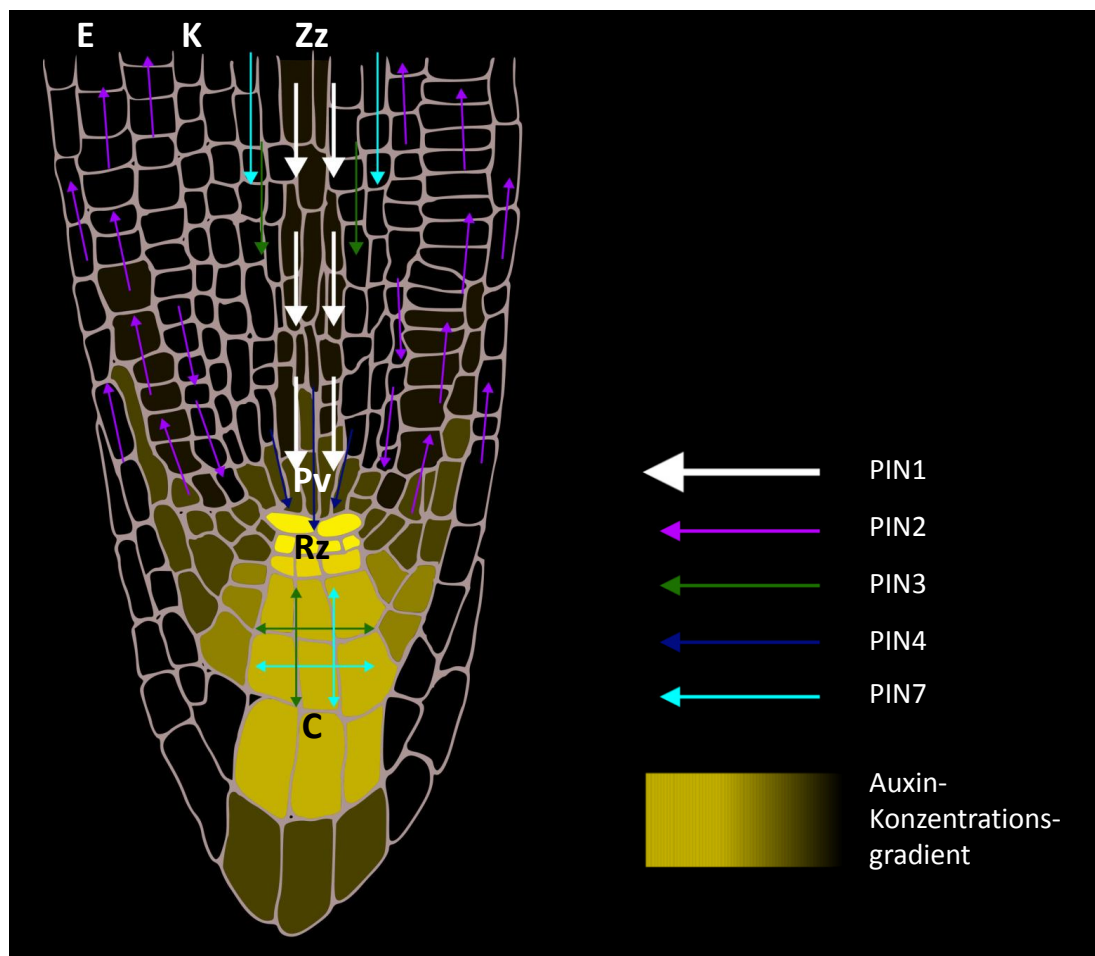


Abb. 1.1: **Der gerichtete Transport von Auxin durch pflanzliche Gewebe.** PIN-vermittelte Richtung des Auxintransports in den Geweben der Wurzelspitze und die durch sie erzeugten Auxingradienten in *A. thaliana*. PIN1 transportiert Auxin im Zentralzylinder (Zz) zur Wurzelspitze. PIN3, 4 und 7 beteiligen sich ebenfalls an diesem Transport, wobei PIN3 und PIN7 Auxin auch in den Kolumellazellen (C) zu den Seiten transportieren. PIN7 wird zudem auch für das provaskuläre Gewebe beschrieben. PIN4 transportiert Auxin in das Ruhende Zentrum (Rz), liegt aber auch teilweise in den Kolumellazellen vor. PIN2 lokalisiert in der Epidermis (E) und dem Kortex (K). Verändert nach Křeček et al., 2009.

PINs ermöglichen eine schnelle und flexible Umverteilung von Auxin. Bei gravitroper Stimulation zum Beispiel oder auch im Falle von Phototropismus muss Auxin zügig asymmetrisch im Pflanzengewebe verteilt werden. Diese asymmetrische Verteilung wird

dadurch gewährleistet, dass die PIN-Proteine den Fluss des Auxins in den Geweben durch ihre polare Verteilung vorgeben (Wisniewska et al., 2006) (siehe Abb. 1.1).

1.5. Mediatoren der polaren PIN-Verteilung

Die Lokalisation von PINs an die apikale oder an die basale Membran wird über zwei antagonistische Mechanismen gesteuert. So ist eine Phosphorylierung von PINs in ihrer langen hydrophilen Region eine wichtige Voraussetzung für die Rekrutierung an die apikale Seite der Plasmamembran (Dhonukshe et al., 2010). Die erste Protein-Kinase, die in diesem Zusammenhang identifiziert wurde, war PINOID (PID), eine Serin/Threonin-Kinase (Benjamins et al., 2001). 2010 wurden zwei weitere dieser Kinasen, WAG1 und WAG2 entdeckt (Dhonukshe et al., 2010). Alle diese Protein-Kinasen lokalisieren unipolar zu allen Seiten der Plasmamembran. PINs werden an der Plasmamembran phosphoryliert und über einen komplexen Transzytoseweg an die apikale Plasmamembran rekrutiert (Kleine-Vehn et al., 2009). In PID- oder auch WAG1- oder 2-Überexpressionsmutanten kommt es so zu einer verstärkten apikalen Lokalisation von PIN1, welches normalerweise nur an der basalen Membran lokalisiert (Dhonukshe et al., 2010). Dies führt unter anderem zum Verlust der gravitropen Krümmungsantwort der Wurzel.

Ein Gegenspieler der PID- und WAG-Kinasen ist die PROTEIN PHOSPHATASE 2A (PP2A), welche PINs dephosphorylieren kann (Kleine-Vehn et al., 2009). Der antagonistische Weg, der PIN-Proteine an die basale Plasmamembran rekrutiert, wird weiterhin durch GNOM, einen GDP/GTP-Austauschfaktor für kleine G-Proteine (GEF) der ARF Klasse (ARF-GEF) gesteuert. ARF-Proteine spielen eine Rolle beim Vesikelverkehr und der Vesikelknospung (Geldner et al., 2003). GNOM lokalisiert in endosomalen Einschlüssen, die Recycling-Endosomen genannt werden und scheint die Rekrutierung von nicht-phosphorylierten PINs an die basale Membran zu vermitteln (Geldner et al., 2003). PP2A dient also als Vermittler zwischen dem GNOM-abhängigen basalen Weg und dem GNOM-unabhängigen apikalen Weg der Rekrutierung, da der Phosphorylierungsstatus der PIN-Proteine darüber entscheidet, zu welcher Membran sie transportiert werden (Kleine-Vehn et al., 2009).

Ein weiterer wichtiger Faktor, der auf die polare Verteilung der PIN-Proteine Einfluss nimmt, ist die Zellwand. Wie kürzlich herausgefunden wurde, zeigen Pflanzen mit einer Mutation im Gen für die CESA3 (Cellulose Synthase Catalytic Subunit A3) Störungen in der polaren Verteilung von PIN-Proteinen (Feraru et al., 2011). CESA3 ist Teil des Cellulose Synthase Komplexes (CSC), welcher Beta-1,4-Glucane synthetisiert, die dann assoziieren und Cellulose-Mikrofibrillen bilden (Desprez et al., 2007). Kommt es zu einer Störung der

Zellwandintegrität, verlieren auch die PIN-Proteine ihre polare Lokalisation und verteilen sich unpolar an der ganzen Membran. Dieser Effekt zeigt sich am deutlichsten, wenn Pflanzen mit zellwandverdauenden Enzymen wie Cellulase behandelt werden. Diese Behandlung führt nach kurzer Zeit zu einer Ablösung der Zellwand von der Membran und schon nach kurzer Zeit setzt auch die Umverteilung der PIN-Proteine ein (Feraru et al., 2011).

Auch Auxin selbst nimmt Einfluss auf die PIN-Verteilung, da es die Endozytose der Transportproteine aktiv verhindern kann. Dies geschieht über die Bindung von Auxin an ein extrazellulär an der Plasmamembran liegendes Protein namens AUXIN BINDING PROTEIN 1 (ABP1). ABP1 nimmt durch einen bisher nicht gänzlich verstandenen Mechanismus Einfluss auf die Clathrin-vermittelte Endozytose von PIN-Proteinen, so dass diese in Anwesenheit von Auxin die Membran nicht mehr verlassen und endozytiert werden (Robert et al., 2010). Neuere Studien zeigten, dass ROP-GTPasen ebenfalls involviert sind (Xu et al., 2010) und einen Regulator zwischen ABP1 und der Clathrin-vermittelten Endozytose darstellen. Xu et al. zeigten beispielsweise, dass die Verzahnung von Epidermiszellen durch einen ABP1-gesteuerten Prozess über ROP6 und ROP2 vermittelt wird.

Für die polare Lokalisation von PIN-Proteinen ist also ein Zusammenspiel multipler Mechanismen notwendig, deren Summe letztendlich bestimmt, wie sich der Auxinfluss innerhalb der Wurzel verteilt. Fällt nur einer dieser Mechanismen aus, kann es zu gravierenden Störungen, besonders in der Polarität des Wachstums kommen.

Neben der selektiven Veränderung der Genexpression bestimmter beteiligter Enzyme ist die experimentelle Behandlung mit chemischen Substanzen eine weitere Möglichkeit, die PIN-Verteilung zu beeinflussen. Das Pilzgift Brefeldin A (BFA) ist ein Hemmstoff für Endozytose-Prozesse von Membranproteinen, da es selektiv den GNOM-vermittelten Transport zur Plasmamembran hemmt und unter anderem PIN-Proteine in sogenannten BFA-Körper einschließt (Kleine-Vehn et al., 2008). BFA ist somit ein selektives Werkzeug, mit dem Transportprozesse basal lokalisierender PIN-Proteine wie PIN1 oder kortikalen PIN2s untersucht werden können.

1.6. Wahrnehmung von Auxin und Auxinsignaltransduktion

Auxine regulieren nicht nur ihren eigenen Transport, sondern nehmen auch massiv Einfluss auf die Genexpression bei Prozessen wie Zellteilung und Differenzierung (Tan et al., 2007). Dabei wird das Hormon über einen Signalweg wahrgenommen, in dessen Mittelpunkt der SCF^{AFB/TIR1}-E3-Ubiquitin-Ligase-Komplex steht. Dieser Komplex umfasst die Proteine

ARABIDOPSIS SKP1-LIKE 1 oder 2 (ASK1, ASK2), CULLIN1 (CUL1), RING-BOX PROTEIN 1 (RBX1) und eines der F-Box-Protein, TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE 1 (TIR1) oder AUXIN-BINDING F-BOX (AFB), von dem es fünf Paraloge (AFB1-AFB5) gibt. SCF-Komplexe nehmen in vielen Signalwegen regulatorische Funktionen ein, indem sie gezielt Proteine durch Ubiquitinierung für den Abbau durch das 26S-Proteasom markieren. Das 26S-Proteasom ist ein großer, aus mehreren Untereinheiten bestehender, ATP-abhängiger Protease-Komplex, welche ubiquitinierte Zielproteine entfaltet (Santner and Estelle, 2010; Voges et al., 1999) und zu kurzen Peptiden abbaut (Fu et al., 2001; Yang et al., 2004). Die Ubiquitinierung eines Zielproteins beginnt mit der Aktivierung von Ubiquitin durch das Ubiquitin aktivierende Enzym E1, welches Ubiquitin ATP-abhängig aktiviert. E2 konjugiert den aktivierten Ubiquitin-Rest anschließend an einen Lysin-Rest des Zielproteins, welches durch die E3-Einheit rekrutiert wird (Pickart, 2001). Die Zielspezifität der E3-Einheit wird dabei durch das F-Box-Protein vermittelt. Die Konjugation mehrerer Ubiquitine (Polyubiquitinierung) führt anschließend zur Degradierung des Zielproteins durch das 26S-Proteasom.

Die Degradierung von Proteinen, die durch den SCF-Komplex markiert wurden, stellt in vielen Hormonsignalwegen einen regulatorischen Schritt dar, darunter nicht nur Auxin, sondern auch Jasmonat, Gibberellin und Ethylen. Der Aufbau des SCF-Komplexes ist dabei in seinem Grundgerüst wenig variabel. Im Genom von *A. thaliana* kommen lediglich fünf Cullin-Proteine vor, von denen jedoch nur CUL1 und CUL2 Teil des SCF-Komplexes sein können. Für RBX1 gibt es im Genom von *A. thaliana* lediglich 2 Gene und für ASK 21 (Cheng et al., 2004; Marrocco et al., 2003; Moon et al., 2004; Risseuw et al., 2003; Takahashi et al., 2004). Die F-Box-Proteine stellen wahrscheinlich ein variables Element dar, da diese mit über 700 Kandidaten im Genom von *A. thaliana* vertreten sind (Moon et al., 2004) und damit eine breite Substratspezifität und auch eine große Bandbreite an regulierbaren Signalwegen ermöglichen. Für den Auxinsignalweg ist das bekannteste und am besten erforschte F-Box-Protein TIR1. Tan et al. konnte 2007 zeigen, dass IAA an TIR1 bindet und dadurch die Substratbindungs-Aktivität von TIR1 erhöht. Substrate der SCF^{AFB/TIR1}-E3-Ligase sind Transkriptionsregulatoren der AUX/IAA-Familie, welche von TIR1/AFBs spezifisch erkannt und zur Ubiquitinierung bereitgestellt werden (siehe Abb. 1.2).

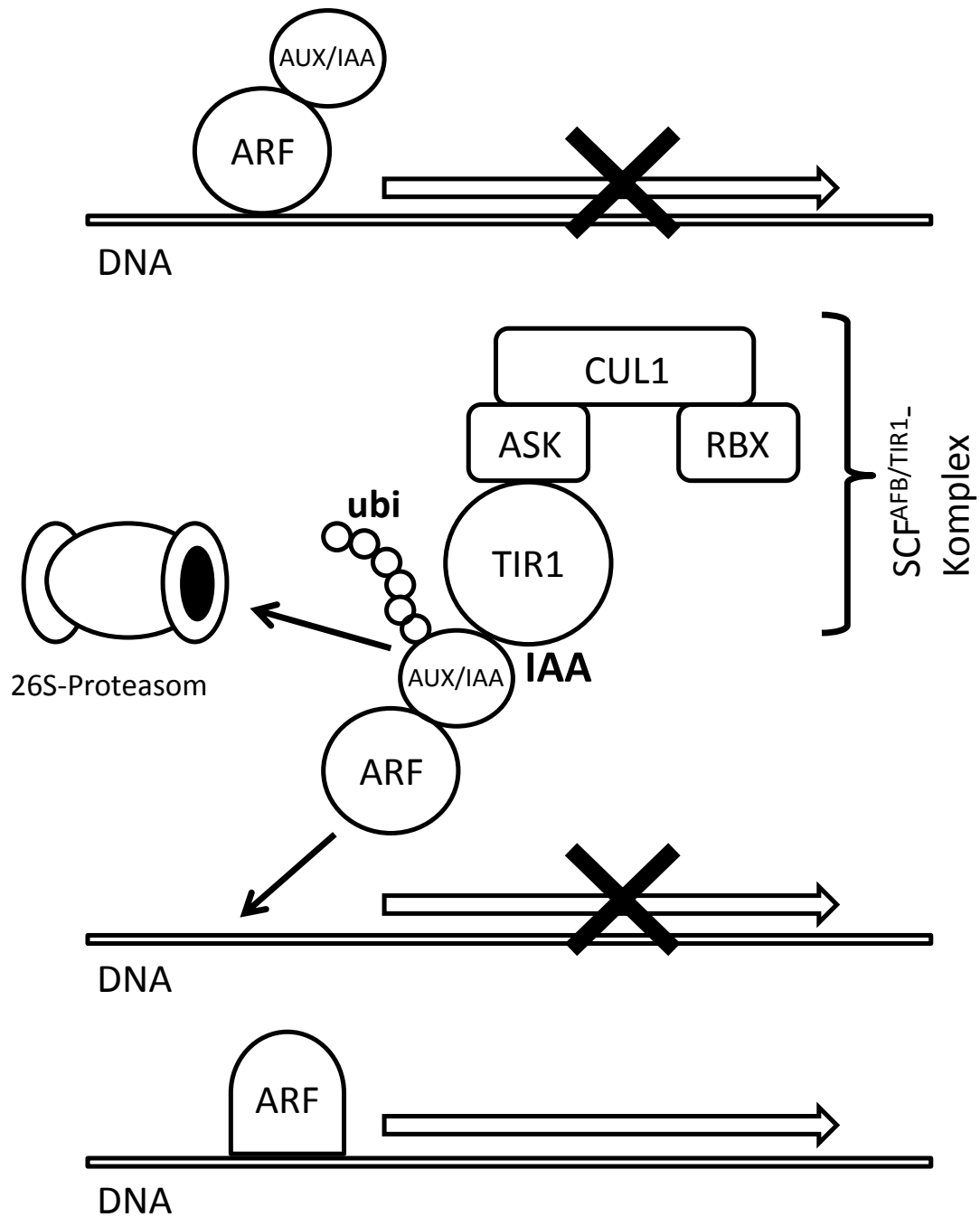


Abb 1.2: **Auxinsignaltransduktion über den SCF^{AFB/TIR1}-Komplex.** ARFs binden spezifisch an Promotorregionen von auxinregulierten Genen und induzieren oder hemmen die Transkription. AUX/IAAs binden an ARFs und inhibieren sie damit. AUX/IAAs sind wiederum Ziele für den 26S-Proteasom-vermittelten Abbau. Sie werden spezifisch von TIR1, der F-Box-Protein-Untereinheit des SCF^{AFB/TIR1}-Komplexes erkannt und durch Ubiquitin zum Abbau markiert. Die Aktivierung dieses Prozesses wird durch die Bindung von Auxin an TIR1 vermittelt. Die Darstellung wurde von Prof. Dr. Ingo Heilmann zur Verfügung gestellt

Im Genom von *A. thaliana* gibt es 29 Gene für AUX/IAA-Proteine, denen eine konservierte Degronsequenz gemeinsam ist, die spezifisch durch den SCF-Komplex erkannt wird (Tan et al., 2007). AUX/IAAs binden ihrerseits an AUXIN RESPONSE FACTORS (ARFs), von denen im Genom von *A. thaliana* 23 kodiert sind (Teale et al., 2006). ARFs sind Transkriptionsfaktoren, die die Genexpression von AUXIN RESPONSE ELEMENTS (ARE)

entweder reprimieren oder stimulieren. Ihre regulatorische Funktion wird durch Bindung an AUX/IAAs inhibiert und erst durch auxininduzierte Degradierung von AUX/IAAs durch das Proteasom ermöglicht, wie in Abbildung 1.2 dargestellt.

Da eine Vielzahl an ARFs, AUX/IAAs und neben TIR1 auch noch fünf AFB-Proteine existieren, gibt es eine Vielzahl von Kombinationsmöglichkeiten, die eine auxinvermittelte Genexpression auslösen können. Dies wird unter anderem auch dadurch begünstigt, dass AUX/IAAs sowohl Homo- als auch Heterodimere mit anderen AUX/IAAs, aber auch mit verschiedenen ARFs bilden können (Teale et al., 2006).

Eine Besonderheit, die anhand der Kristallstruktur von TIR1 entdeckt wurde, war, dass innerhalb des F-Box-Proteins ein Inositolhexakisphosphat (InsP_6) als Kofaktor gebunden ist (Tan et al., 2007). TIR1 besitzt eine ausgedehnte Leucin-rich-repeat (LRR-Domäne), die aus 18 Einzel-LRRs besteht. Diese bilden zusammen die Auxin- als auch die Substratbindetasche. Innerhalb dieser Struktur ist der InsP_6 -Kofaktor gebunden und durch mehrere, auch in anderen AFBs konservierte Aminosäuren koordiniert. Bislang ist die Funktion des InsP_6 -Kofaktors unbekannt. Es wird jedoch angenommen, dass InsP_6 auf Grund seiner Lage innerhalb von TIR1 für die strukturelle Integrität von TIR1 von Bedeutung ist (Hao und Yang, 2010).

Ein Hinweis auf die Funktionalität des Kofaktors liefern Studien, die kürzlich zur Entdeckung von Inositolpentakisphosphat (InsP_5) innerhalb von CORONATIN INSENSITIVE 1 (COI1), dem zu TIR1 homologen F-Box-Protein mit Funktion in der Signalleitung von Jasmonat führten (Mosblech et al., 2011; Sheard et al., 2010). Dort konnte unter anderem durch Yeast-two-Hybrid-Experimente gezeigt werden, dass COI1 mit seinem Interaktionspartner JAZ (jasmonate ZIM-domain) schlechter bis gar nicht interagiert, wenn Aminosäuren fehlen, die den Kofaktor koordinieren (Mosblech et al., 2011). Somit ist auch eine Funktion von InsP_6 für TIR1 und die AFBs nicht unwahrscheinlich. Die Beobachtung Inositol-haltiger Kofaktoren in TIR1 und auch COI1 erscheint besonders relevant vor dem Hintergrund früherer Befunde, dass sich Inositolpolyphosphat-Gehalte in Mais und Haferpflanzen bei gravitroper Stimulation vorübergehend ändern (Perera et al., 1999; Perera et al., 2001) und auch in *A. thaliana* entsprechende Änderungen nach Verwundung beschrieben wurden (Mosblech et al., 2008).

1.7. Phosphoinositide und Inositolpolyphosphate

Die Entdeckung Inositol-haltiger Kofaktoren der F-Box-Proteine TIR1 und COI1 sowie eine mögliche Funktion von Membranphospholipiden bei der polaren Verteilung der PIN-

Proteine rückte den Stoffwechsel der Phosphoinositide (PIs) und Inositolpolyphosphate (IPPs) in den Fokus der Untersuchungen dieser Arbeit. Als Hintergrund für die im Rahmen dieser Dissertation beschriebenen Ergebnisse soll daher in den folgenden Kapiteln der pflanzliche PI- und IPP-Stoffwechsel näher beschrieben und mögliche Verbindungen zum Auxin-Haushalt der Pflanze vorgeschlagen werden.

Das PI-Netzwerk ist sowohl in Pflanzen, als auch in Tieren und Pilzen weitgehend konserviert. PIs sind Phospholipide und zählen zur Gruppe der Phosphoglyceride. Phosphoglyceride bestehen aus einem Glycerinrückgrat, an das in der sn-1- und der sn-2-Position Fettsäuren verestert sind (Meijer und Munnik, 2003). An der sn-3-Position ist ein Phosphat verestert, an das im Falle von PI eine Inositolgruppe gebunden ist. PI kann an drei der sechs freien Hydroxylgruppen des Inositolrings phosphoryliert werden. Hierbei handelt es sich um reversible Reaktionen, die in Anzahl und Position kombinierbar sind und somit zu mehreren möglichen Derivate führen (siehe Abb. 1.3), die durch verschiedene Kinasen und Phosphatasen synthetisiert werden. Sechs dieser sieben möglichen Lipide kommen in Pflanzen vor (Heilmann, 2009; Meijer and Munnik, 2003). Im Rahmen dieser Arbeit werden besonders Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat ($\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$) und die Kinasen, welche zur Synthese dieses Phospholipids nötig sind, thematisiert. $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ ist unter anderem ein Substrat für die Phospholipase C (PLC), welche das Lipid zu Diacylglycerol (DAG) und Inositol(1,4,5)trisphosphat (InsP_3) hydrolysiert. Während DAG in der Membran verbleibt, wird InsP_3 frei und kann weiter zu InsP_5 und InsP_6 phosphoryliert werden.

PIs und IPPs nehmen in der Zelle auf verschiedene Prozesse Einfluss und sind unter anderem wichtig für den Vesikeltransport, aber auch für Signalprozesse (Heilmann, 2009). Somit spielen sie eine wichtige Rolle bei der Regulation physiologischer Prozesse im Organismus.

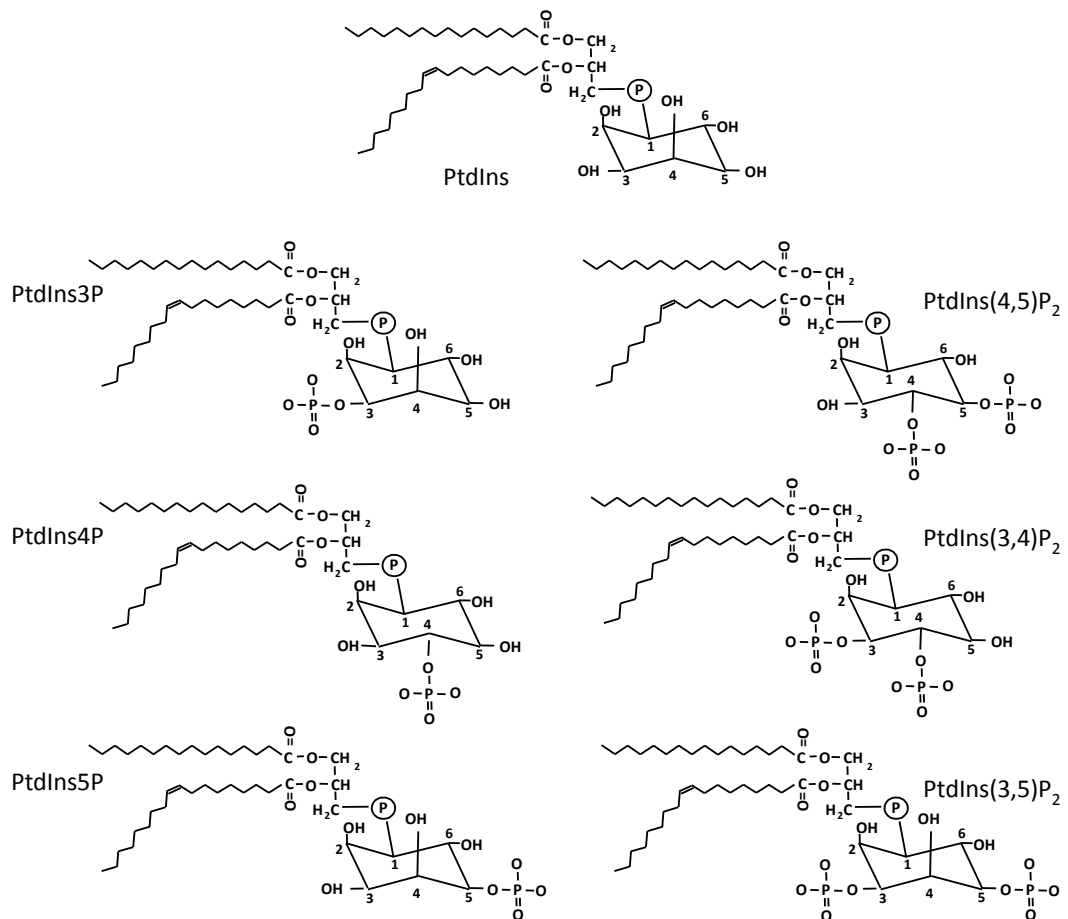


Abb.: 1.3.: **Strukturen der verschiedenen PIs ausgehend von PtdIns.** Phosphatidylinositol. PtdIns3P, Phosphatidylinositol-3-Phosphat; PtdIns4P, Phosphatidylinositol-4-Phosphat; PtdIns5P, Phosphatidylinositol-5-Phosphat; PtdIns(4,5)P₂, Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat; PtdIns(3,4)P₂, Phosphatidylinositol-3,4-bisphosphat; PtdIns(3,5)P₂, Phosphatidylinositol-3,5-bisphosphat. Die Abbildung zeigt PIs, die mit 16:0 und 18:1^{Δ9} verestert sind.

1.8. Synthese von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat in *A. thaliana*

Wie im vorigen Abschnitt erwähnt, sind viele Enzyme an der Synthese von PIs beteiligt. Der folgende Abschnitt wird sich auf Grund der thematischen Relevanz auf die Synthese von PtdIns(4,5)P₂ konzentrieren. Vorläufer aller Phosphoglyceride ist Phosphatidat (PtdOH). PtdOH kann durch die CDP-DAG-Synthase mit Hilfe von CTP aktiviert werden, wodurch CDP-Diacylglycerol (CDP-DAG) entsteht (Ohlrogge und Browse, 1995), welches dann durch eine Kondensationsreaktion katalysiert durch die PI-Synthase mit D-myoinositol zu PI umgewandelt wird (Ohlrogge und Browse, 1995). *A. thaliana* besitzt zwei PI-Synthasen, PIS1 und PIS2. Beide sind membranständig und lokalisieren am ER (Justin et al., 2002; Löffke et al., 2008). Die Synthese von Phosphatidylinositol-4-phosphat (PtdIns4P) wird durch Phosphatidylinositol-4-Kinasen (PI 4-Kinasen) katalysiert, für die es in *A. thaliana* vier Gene gibt, die ubiquitär exprimiert werden (Mueller-Roeber und Pical, 2002). Sie teilen sich ein in

die Unterfamilien α und β . Eine weitere Unterfamilie γ mit 8 Enzymen, die zu den Typ II-Kinasen gehört, zeigten bisher keine Aktivität als PI 4-Kinase (Galvao et al., 2008) in Pflanzen, obwohl sie eine hohe Ähnlichkeit zu den tierischen Kinasen aufweisen.

Die Unterfamilien α und β kodieren für jeweils zwei Enzyme, die sich durch ihre Größe unterscheiden. PIK α I und α II werden in der Pflanze ubiquitär exprimiert und zeigen keine eindeutige subzelluläre Lokalisation (Schmid et al., 2005; Stevenson-Paulik et al., 2003). Die Enzyme der β -Familie kommen peripher an trans-Golgi-Vesikeln vor und sind lösliche Cytosolproteine (Preuss et al., 2006).

Für die Phosphorylierung von PtdIns4P zu PtdIns(4,5)P₂ wurden im Genom von *A. thaliana* elf kodierende Gene gefunden. Phosphatidylinositol-4-Phosphat-5-Kinasen (PI4P 5-Kinasen) lassen sich in die Untergruppen A und B unterteilen. Zu den Typ B-Enzymen gehören die PIP5K1-PIP5K9. Sie sind länger als die Kinasen des Typ A, da sie mehrere zusätzliche N-terminale Domänen besitzen, die Funktionen bei der Bindung an die Membran haben (Meijer und Munnik, 2003) (siehe Abb. 1.4). Typ-B-Enzyme sind mit 80 bis 100 kD größer als die Typ A-Kinasen mit nur 40 bis 50 kD, welche durch PIP5K10 und PIP5K11 repräsentiert werden (Mueller-Roeber und Pical, 2002; Ischebeck und Heilmann, 2010).

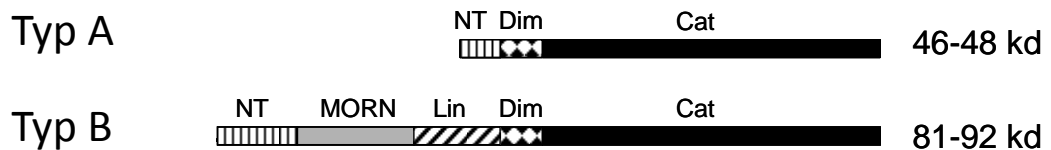


Abbildung 1.4.: **Darstellung der PI4P 5-Kinase Unterfamilien A und B.** Zu Typ B gehören die PIP5K1-PIP5K9, zu Typ A die PIP5K10 und 11. Typ B-Kinasen besitzen zusätzlich zu der katalytischen Domäne (cat), der Dimerisierungsdomäne (Dim) und dem N-Terminus (NT) noch eine MORN-Domäne und einen Linker-Bereich (Lin). Letzterer verbindet die Dimerisierungsdomäne mit der MORN-Domäne. Abbildung von Dr. Till Ischebeck.

PI4P 5-Kinasen lokalisieren in der Zelle unter anderem an der Plasmamembran, im Cytoplasma, dem Aktincytoskelett und auch dem Kern (Stevenson et al., 2000). Einige Kinasen wie die PIP5K1, 2, 7, 8 und 9 werden laut GENEVESTIGATOR ubiquitär in der ganzen Pflanze exprimiert (Zimmermann et al., 2004). Die Kinasen 5, 6, 10 und 11 kommen hauptsächlich im Pollen vor, während PIP5K 4 im Pollen und der Wurzel und PIP5K3 nur in der Wurzel vorkommen (Kusano et al., 2008; Schmid et al., 2005; Stenzel et al., 2008).

1.9. Funktionen von PtdIns4P und PtdIns(4,5)P₂ in *A. thaliana*

In Hefen und Tieren wurde gezeigt, dass Pls eine wichtige Rolle beim sekretorischen Vesikelverkehr zwischen Golgi und Plasmamembran spielen. Schaltet man in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* (*S.cerevisiae*) die PI 4-Kinase Pik1p durch Mutation aus, so wird die Sekretion vom Golgi zur Membran komplett unterbunden und es kommt zur Akkumulation abnormaler, membranöser Strukturen, die „Berkeley bodies“ genannt werden (Audhya et al., 2000; Strahl et al., 2005; Walch-Solimena und Novick, 1999). Bei Überexpression Pik1p kommt es hingegen zu Zellwanddefekten, da die Exozytose stark erhöht ist und vermehrt Enzyme der Zellwandsynthese zur Plasmamembran sezerniert werden (Schorr et al., 2001). PI 4-Kinasen der β -Unterfamilie lokalisieren in *A. thaliana* in Wurzelhaaren und in Tabakpollenschläuchen an trans-Golgi-Vesikeln (Preuss et al., 2006; Szumlanski und Nielsen, 2009). Man nimmt an, dass PI4K β -Isoformen durch das G-Protein Ras associated binding protein A4b (RabA4b) und durch das Calcium-sensitive calcineurin B-like protein 1 (AtCBL1) rekrutiert werden (Preuss et al., 2006). Auch für PtdIns(4,5)P₂ sind Funktionen im Vesikelverkehr postuliert worden. PI4P 5-Kinasen wurden in Tieren, Hefen und auch Pflanzen hauptsächlich an der Plasmamembran nachgewiesen (Ischebeck et al., 2008; Kusano et al., 2008; Lee et al., 2007; Sousa et al., 2008) und viele physiologische Funktionen von PtdIns(4,5)P₂ sind evolutionär konserviert (Ischebeck et al., 2010). Dennoch wurden Aktivitäten dieser Kinasen auch im Endomembransystem von Tieren und Pflanzen, assoziiert mit dem Aktinzytoskelett von Hefen und Pflanzen und im Zellkern von Säugetieren und Pflanzen gemessen (Davis et al., 2007; Heilmann et al., 1999; Santarius et al., 2006).

Für Hefe wird angenommen, dass PtdIns(4,5)P₂ eine Rolle bei der Fusion sekretorischer Vesikel mit der Plasmamembran spielt, da die Überexpression der hefeeigenen PI4P 5-Kinase multicopy suppressor of *stt4* (Mss4p) Mutationen in Genen für Proteine der sekretorischen Maschinerie kompensieren kann (Strahl und Thorner, 2007). Beispiele dafür sind Sec 8p, Sec10p oder auch Sec15p; alles Untereinheiten des Multiprotein Exozyst-Komplexes (Guo et al., 1999; Hsu et al., 1999; TerBush et al., 1996). Wie PI4P 5-Kinasen jedoch an die Membran rekrutiert werden, ist in Pflanzen bislang nur unzureichend untersucht (Stenzel et al., 2012). Hinweise, dass Sphingolipide dabei eine Rolle spielen könnten, kommen ebenfalls aus dem Hefesystem, für das Kobayashi et al. zeigten, dass Mss4p nach Gabe von Zellgiften, die die Synthese von Sphingolipiden hemmen, nicht mehr richtig lokalisiert (Kobayashi et al., 2005).

In Hefe und in tierischen Zellen rekrutiert PtdIns(4,5)P₂ die Exo70-Untereinheit des Exozystkomplexes an die Plasmamembran und vermittelt so unter anderem, die

Membranassoziation von CAPS-Proteine (calcium-activated protein for secretion). CAPS-Proteine sind essentiell für die Vesikel-Fusion mit der Membran (Berwin et al., 1998; Hay et al., 1995). Außerdem scheint PtdIns(4,5)P₂ den Aufbau von SNARE Komplexen zu stimulieren, welche ebenfalls wichtig für die Vesikelfusion mit der Zielmembran sind (Vicogne et al., 2006). PtdIns(4,5)P₂ spielt nicht nur eine Rolle bei der Exozytose, sondern auch bei der Endozytose. Dies wurde ebenfalls in Hefemutanten festgestellt, die eine temperatursensitive Variante von Mss4p exprimieren, da diese Zellen Defekte bei der Endozytose aufwiesen, nachdem man sie bei der restriktiven Temperatur von 37 °C inkubierte (Desrivieres et al., 2002). Auch in Tieren konnten ähnliche Mechanismen gefunden werden, während die Rolle von PtdIns(4,5)P₂ bei endozytotische Prozessen in Pflanzen noch weitestgehend unbekannt ist. Einen Beweis für das Mitwirken des Lipids bei diesem Prozess lieferten Studien von König et al. in 2008, die zeigten, dass PtdIns(4,5)P₂ während Stress-induzierter Endozytose mit Clathrin kolokalisiert (König et al., 2008).

Wesentlich besser erforscht ist der Einfluss von PtdIns(4,5)P₂ auf das Aktinzytoskelett. Dieses ist nicht nur relevant für die innere Stabilität der Zelle, sondern ist auch am Vesikelverkehr, der Zellteilung, der Wahrnehmung exogener Reize und der Signalweiterleitung beteiligt (Wasteneys und Galway, 2003). In Tieren wurde gezeigt, dass PtdIns(4,5)P₂ mit Aktin-bindenden Proteinen (ABPs) interagiert und Einfluss auf ihre Aktivität nimmt. In Anwesenheit von ATP ist es ABPs möglich, die Polymerisation von Aktin zu inhibieren oder zu unterstützen oder Verzweigungen zu induzieren. Im Genom von *A. thaliana* wurden einige Kandidaten für ABPs gefunden. Andere aus dem tierischen System bekannte ABPs wie Talin, Vitronectin oder Vinkulin hatten keine homologen Entsprechungen in Pflanzen (Wasteneys und Galway, 2003). Somit ist anzunehmen, dass Teile der Zytoskelett-Regulation, wie sie in Tieren bekannt ist, auch in Pflanzen konserviert sein könnten. In Säugern und Hefe ist bekannt, dass eine Erhöhung des PtdIns(4,5)P₂-Gehaltes zu einer Verhärtung des Aktinskeletts führt und dessen Flexibilität senkt (Ojala et al., 2001; Rozelle et al., 2000; Shibasaki et al., 1997; Yamamoto et al., 2001). Dieser Effekt wurde unter anderem auf eine Missregulation der ABPs zurückgeführt.

Eine weitere Möglichkeit, wie PtdIns(4,5)P₂ auf das Zytoskelett Einfluss nimmt, ist über einen Mechanismus, der Rho-GTPasen involviert. GTPasen sind in ihrer GTP-gebundenen Form aktiv und sind essentiell für die Polarisierung eukaryotischer Zellen und somit auch für die Morphogenese und Teilung. Sie interagieren mit weiteren Regulatoren wie GDIs (guanine nucleotide dissociation inhibitors), GAPs (GTPase activation proteins) und GEFs (guanidine exchange factors) (Faure und Dagher, 2001).

GDI destabilisieren die Interaktion der GTPasen mit der Membran und wirken deshalb als negative Regulatoren. In vitro konnte gezeigt werden, dass PtdIns(4,5)P₂ Einfluss auf die Interaktion von GDP-Rac mit seinem spezifischen GDI nimmt (Faure et al., 1999; Ugolev et al., 2008). Im pflanzlichen System akkumulieren Rop-GTPasen (Rho of plant) (eine andere Nomenklatur verwendet die Bezeichnung Rac statt Rop und ist abhängig vom jeweiligen Autor) einer pflanzenspezifischen Rho-Unterfamilie an der apikalen Plasmamembran polar wachsender Zellen wie Pollenschläuchen und Wurzelhaaren (Kost, 2008). Auch hier wird vermutet, dass GDIs negative Regulatoren sind und dass ihre Interaktion mit den GTPasen durch membranständiges PtdIns(4,5)P₂ beeinflusst werden kann (Ischebeck et al., 2011; Kost, 2008). Ischebeck et al. (2011) zeigten, dass die Überexpression pollenspezifischer PIP5PK11 zum Anschwellen der Pollenschlauchspitze von Tabakpflanzen führt und dass dieser Effekt mit der Inhibierung von GDIs durch PtdIns(4,5)P₂ zusammenhängt. Der gleiche Phänotyp resultiert aus einer Überexpression von Nt-Rac5, wenn also mehr GTPasen an der Plasmamembran vorliegen. Wie schon im tierischen System gezeigt, lässt diese Beobachtung vermuten, dass PtdIns(4,5)P₂ ein positiver Regulator der hier vorliegenden Rop-GTPasen ist, indem es Einfluss auf die Größe des Plasmamembran-assoziierten Rop-Pools nimmt. Auch ein genereller Einfluss von PtdIns(4,5)P₂ auf pflanzliche Rop-GTPasen ist nicht auszuschließen. Wie schon zuvor erwähnt, hat auch Auxin über einen noch nicht gänzlich verstandenen Mechanismus, der über ABP1 reguliert wird, Einfluss auf Rop-GTPasen (Robert et al., 2010), welches in diesem Fall die polare Lokalisierung von Auxin-Exportern regulieren (Chen et al., 2012). Dass auch PIs in diesen Prozess involviert sind, wurde kürzlich beschrieben (Mei et al., 2012).

Eine weitere beschriebene Funktion, an der PtdIns(4,5)P₂ beteiligt ist, ist die Regulation von Ionenkanälen. Der erste entdeckte, durch PtdIns(4,5)P₂ regulierte Ionenkanal war ein humaner K⁺-Kanal, der dadurch aktiviert wird, dass er an das Lipid bindet (Hilgemann und Ball, 1996). Aber auch in Pflanzen fanden sich Beispiele für Kalium-Kanäle, die durch PtdIns(4,5)P₂ reguliert werden, wie zum Beispiel in Tabak (Ma et al., 2009).

1.10. **Synthese und Funktion von IPPs**

Neben den als intakte Lipide wirksamen PIs kommen in Pflanzen eine Reihe lösliche, von PIs abgeleitete IPPs vor. Die meisten in Pflanzen vorkommenden IPPs entstehen durch Calciumabhängige Hydrolyse von PtdIns(4,5)P₂ durch eine PI-PLC (Phosphoinositid-spezifische PLC) (Mueller-Roeber und Pical, 2002). PI-PLCs differenzieren sich in die fünf Unterfamilien β , γ , δ , ϵ und ζ und zeichnen sich durch eine hochkonservierte

Domänenstruktur aus, die sich aus der PH-Domäne, der EF-Hand-Domäne, einer X- und einer Y-Domäne, welche das katalytische Zentrum bilden und einer Lipid-bindenden C2-Domäne zusammensetzt (Tasma et al., 2008). Diese Kernsequenz ist allen PI-PLCs aus Tieren und Hefen eigen und trifft am besten auf die Isoenzyme der δ -Unterfamilie zu, da die Isoenzyme der anderen Unterfamilie jeweils noch spezifische inserierte Bereiche aufweisen, wie sie bisher nur im tierischen System gefunden wurden (Mueller-Roeber und Pical, 2002). Drastische Unterschiede wurden in der jeweiligen Aktivierung von PI-PLCs der verschiedenen Familien gefunden. PI-PLCs der β -Unterfamilie werden durch G-Proteingekoppelte Rezeptoren aktiviert, während γ -Enzyme mit Rezeptor Tyrosin-Kinasen interagieren (Rebecchi und Pentylala, 2000) und ϵ -Enzyme auf heterotrimere G-Proteine und Ras angewiesen sind (Rhee et al., 1989). Pflanzliche PI-PLCs ähneln am ehesten den Vertretern der ζ -Enzyme, besitzen jedoch keine PH-Domäne, welche in tierischen PI-PLCs entscheidend für die Lokalisierung an der Membran und die Interaktion mit ihrem Substrat $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ ist (Tasma et al., 2008). Somit muss es einen anderen, bisher unbekanntem Mechanismus der Rekrutierung und Substratfindung geben. Neuere Studien belegten, dass die C2-Domäne pflanzlicher PI-PLCs für die Lokalisierung an der Membran ausreicht, diese aber zudem von der Oberflächenhydrophobizität der Plasmamembran abhängig ist, welche durch einen Calcium-Stimulus veränderbar ist (Rupwate und Rajasekharan, 2012).

Die durch die Hydrolyse von $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ entstehenden Moleküle InsP_3 und DAG haben innerhalb der Zelle diverse Funktionen, insbesondere für Signalprozesse. In Pflanzen wird DAG schnell zu PtdOH umgesetzt, was in Signalprozessen während osmotischen Stress, Trockenstress, Verwundung und der Pathogen-Antwort eine Rolle spielt (Bargmann et al., 2009; Lee et al., 2001; Munnik, 2001; Wang et al., 2000). InsP_3 ist im tierischen als auch im pflanzlichen System zumindest als Vorstufe ein Regulator der Calcium-Ausschüttung. Es konnten in Pflanzen jedoch bis heute keine Hinweise auf InsP_3 -gesteuerte Calcium-Kanäle gefunden werden, wie es sie in Tieren gibt. Vielmehr gibt es Hinweise, dass Inositolhexakisphosphat (InsP_6) eine Rolle bei der Ca^{2+} -Freisetzung spielen könnte. In Schließzellen der Spaltöffnungen von Pflanzen konnte gezeigt werden, dass Abscisinsäure zu einem Anstieg der intrazellulären InsP_6 -Gehalte führt, was nach innen gerichtete K^+ -Kanäle Calcium-abhängig hemmt (Lemtiri-Chlieh et al., 2000).

Allgemein ist mittlerweile bekannt, dass viele Signalwege von IPPs abhängig sind. Wie zuvor schon kurz erwähnt, ist InsP_5 ein Kofaktor in COI1, dem F-Box-Protein, welches wichtig für die Signaltransduktion von Jasmonsäure und damit für die Verwundungsantwort ist (Sheard et al., 2010). Mosblech et al. konnten zudem zeigen, dass die Funktion von COI1 deutlich eingeschränkt ist, wenn das COI1-Protein so mutiert ist, dass Kofaktor-bindende

Aminosäuren fehlen (Mosblech et al., 2011). Zudem belegten die Studien, dass Pflanzen mit erhöhten InsP₅-Gehalten wesentlich stärker von Fraßfeinden gemieden werden und zudem eine erhöhte wundinduzierte Genexpression zeigen.

Ähnlich zu COI1 bindet auch TIR1 seinen Kofaktor InsP₆. Hier ist die Funktion des IPPs jedoch noch nicht geklärt (Tan et al., 2007). Die Studien an COI1 legen nahe, dass auch InsP₆ relevant für die Funktion der auxinvermittelten Signaltransduktion ist. Einen ersten Hinweis, dass es einen Zusammenhang zwischen Auxinsignalwegen und der Synthese von IPPs gibt, lieferten Studien, die zeigten, dass gravitrope Stimulation zu einem starken Anstieg von InsP₃ in den sich krümmenden Geweben von Maispflanzen führte (Perera et al., 1999). Da es bisher jedoch keinen Hinweis auf eine Funktion von InsP₃ als möglichen Interaktionspartner für Signalprozesse gibt, gehen neuere Studien davon aus, dass ein Anstieg in InsP₃ eher der Synthese höherer IPPs wie InsP₆ dient, als das es selbst eine Funktion einnimmt (Meijer und Munnik, 2003).

Die Synthese von InsP₆ ist über verschiedene Wege möglich (siehe Abb. 1.5).

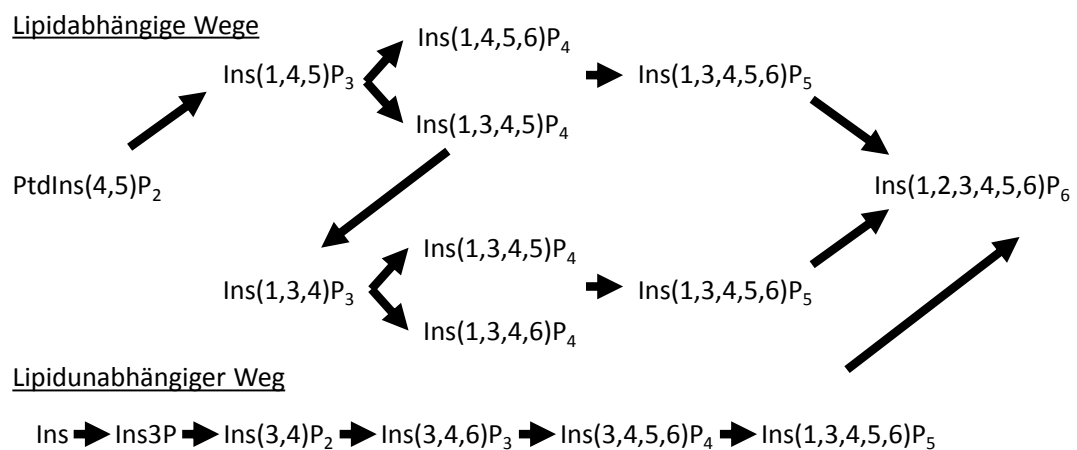


Abb. 1.5.: **Wege der Synthese von InsP₆**. Die lipidabhängige Synthese von InsP₆ geht von PtdIns(4,5)P₂ aus, was durch die PI-PLC zu InsP₃ hydrolysiert wird. Bisher wurden nicht alle Enzyme, die die Synthese der verschiedenen IPPs katalysieren in Pflanzen gefunden. Der lipidunabhängige Weg geht von *myo*-Inositol, was durch kontinuierliche Phosphorylierung zu InsP₆ phosphoryliert wird. Das Modell wurde vereinfacht nach Stevenson-Paulik et al., 2005.

Zwei davon sind lipidabhängig, während der dritte unabhängig ist und von *myo*-Inositol über eine stufenweise Phosphorylierung zu InsP₆ führt (Stevenson-Paulik et al., 2005). Die lipidabhängigen Wege führen über PtdIns(4,5)P₂, welches durch die Hydrolyse durch die PLC zu InsP₃ umgesetzt wird, was dann durch die Aktivität zweier Inositolpolyphosphat-Kinasen IPK1 und IPK2 in mehreren Schritten zu InsP₆ phosphoryliert werden kann. In der lipidabhängigen Synthese wird der letzte Phosphorylierungsschritt durch die IPK1 realisiert, während lipidunabhängig alternativ auch die IPK2 für die Phosphorylierung von InsP₅ in Frage kommt.

1.11. Pflanzenlinien mit Störungen in der Synthese von PIs und IPPs

Im Rahmen dieser Arbeit wurden drei Pflanzenlinien verwendet, die an verschiedenen Stellen in der Synthese von PIs oder IPPs manipuliert sind. Die *pip5k1 pip5k2*-Doppelmutante wurde durch die T-DNA-Insertion in den Genen für die PIP5-Kinasen 1 und 2 so manipuliert, dass die Enzyme nicht mehr exprimiert werden und es zu einer deutlichen Reduktion der PtdIns(4,5)P₂-Gehalte in diesen Pflanzen kommt (siehe Abschnitt 3.1.1.). Sowohl PIP5K1 als auch PIP5K2 werden in *A. thaliana* ubiquitär exprimiert und ihr Fehlen führt zu einem starken Phänotyp, der sich durch Zwergwuchs und Infertilität auszeichnet (siehe Abschnitt 3.1.1.)

In einer anderen Pflanzenlinie wird eine menschliche Typ I-Inositolpolyphosphat-5-Phosphatase (InsP 5-ptase) exprimiert, die spezifisch InsP₃ hydrolysiert und es so dem Stoffwechsel entzieht. Dadurch kommt es zu einer Reduzierung der PI-Gehalte, die für die Synthese des InsP₃ bereitgestellt werden, bei gleichzeitig ansteigender Kinaseaktivität der Enzyme zur Synthese der Lipide (König et al., 2007; Perera et al., 2006; Perera et al., 2002). Beide bisher beschriebenen Pflanzenlinien dienen als Modelle für Organismen mit reduziertem PI-Gehalt.

Die dritte Pflanzenlinie, die im Rahmen des Projektes untersucht wurde, trägt eine T-DNA-Insertion im Gen für die Inositolpolyphosphatkinase 1 (*ipk1-1*), welche innerhalb der lipidabhängigen InsP₆-Synthese InsP₅ zu InsP₆ phosphoryliert. Durch diese Mutation zeigen die Pflanzen stark reduzierte Gehalte an InsP₆, bei gleichzeitiger Akkumulierung von InsP₄ und InsP₅ (Stevenson-Paulik et al., 2005).

1.12. Zwei Hypothesen für das Zusammenspiel von PIs und Auxin

Für die vorliegende Arbeit wurden zwei Arbeitshypothesen aufgestellt, die verschiedene Stufen des PI-Metabolismus mit den Signalwegen von Auxin in Verbindung bringen.

Wie zuvor schon beschrieben ist ein wichtiges regulatorisches Lipid, was unter anderem eine Rolle für den Vesikeltransport, die Vesikelrekrutierung, die Stabilität des Aktinzytoskeletts, die Steuerung von Ionenkanälen und das polare Wachstum spielt. Somit ist PtdIns(4,5)P₂ maßgeblich daran beteiligt Vesikel bestimmter Zusammensetzung und Inhalts an die Membran zu bringen. Zu dieser Fracht gehören unter anderem integrale Membranproteine wie PINs. PIN-Proteine zeigen eine stark polare Verteilung und sind durch tranzytotischen Vesikeltransport in einem dynamischen Fluss zwischen der Plasmamembran und dem Endomembransystem. Eine Hypothese ist, dass PIs Einfluss auf die Auxin-Homöostase nehmen, da sie maßgeblich am Transport von Auxineffluxproteinen

beteiligt sind. Um diese Hypothese *in vivo* zu testen, wurden Pflanzen mit reduzierten Gehalten an PIs, wie die *pip5k1 pip5k2*-Doppelmutanten, aber auch die InsP 5-ptase-exprimierenden Pflanzen auf auxinabhängige Prozesse untersucht.

Die zweite Hypothese dieser Arbeit beschäftigt sich mit dem Einfluss von IPPs auf die Signaltransduktion von Auxin. Seit Tan et al. 2007 die Struktur des F-Box-Proteins TIR1 lösten und InsP₆ als Kofaktor innerhalb der Struktur fanden, war es von besonderem Interesse die Funktion dieses IPPs zu ergründen. Um dies zu untersuchen wurden *ipk1-1*-Mutanten verwendet, die reduzierte Gehalte an InsP₆ aufweisen (Stevenson-Paulik et al., 2005) und auf ihre Genexpression nach Gravistimulation, aber auch auf andere Auxin-regulierte Prozesse hin untersucht. Ziel war es herauszufinden, ob die verringerte Produktion von InsP₆ die Signaltransduktion, die zur Transkription auxininduzierter Gene führt, negativ beeinflusst. Zusätzlich wurden in diesem Ansatz auch die *InsP 5-ptase*-Pflanzen untersucht, da sie neben einer Reduktion an PIs auch einen verminderten Gehalt an IPPs zeigen, der auf die ständige Hydrolyse von IPPs zurückzuführen ist.

2. Material und Methoden

2.1. Chemikalien

2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (2,4-D)	Duchefa Biochemie, Haarlem, Niederlande
Agar	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Agarose	Duchefa Biochemie, Haarlem, Niederlande
Brefeldin A	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Deutschland
Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Chloroform	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Cycloheximid	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Deutschland
Desoxynukleotidtriphosphate (dNTPs)	MBI Fermentas, St. Leon Rot, Deutschland
Diethyldicarbonat (DEPC)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
DNA Größenmarker Generuler 1kb/ 50bp Ladder	MBI Fermentas, St. Leon Rot, Deutschland
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumhexacyanoferrat(II)-Trihydrat	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumhexacyanoferrat(III)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Indol-3-Essigsäure (IAA)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Deutschland
³ H-IAA (26 Ci, mmol)	Amersham, München, Deutschland
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	Roth, Karlsruhe, Deutschland
MES	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Deutschland
Murashige und Skoog MS-Medium mit Vitaminen	Duchefa Biochemie, Haarlem, Niederlande
2-(1-Naphthyl)essigsäure (NAA)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Deutschland
Natriumdihydrogenphosphat	KMFoptichem, Lohmar, Deutschland
Natriumhypochlorid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Phenol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Phenol/Cholorform/Isoamylalkohol (25:24:1)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
RNAlater	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Deutschland
Triton X	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D- glucuronsäure (X-Gluc)	AppliChem, Darmstadt, Deutschland

2.2. Geräte und Materialien

Geräte:

Centrifuge 5810R	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Centrifuge 5415D	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Centrifuge 5417D	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
6890 Series GC System	Agilent, Waldbronn, Deutschland
Mastercycler gradient	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Mastercycler personal	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Ultrospec 1100 pro	Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland
Gel detection system IDA	Raytest, Straubenhardt, Deutschland
ABI PRISM [®] 3100 Genetic Analyser	Applied Biosystems, Foster, CA, USA
Mini-PROTEAN [®] 3 Elektrophoreseapparatur	Biorad, Hercules, CA, USA
Fluoreszenz- und Hellfeld-Mikroskop BX51	Olympus, Hamburg, Deutschland
F41-028HQ Filterset für gelbes GFP	Olympus, Hamburg, Deutschland
Color View II Camera	Olympus, Hamburg, Deutschland
Centrifuge 5424	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Centrifuge 54170R	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
TProfessional Thermocycler	Biometra, Göttingen, Deutschland
Fluoreszenz und Hellfeld- Mikroskop AXIO IMAGER M1	Carl Zeiss, Jena, Deutschland
46HE Filterset für YFP	Carl Zeiss, Jena, Deutschland
Fluoreszenz und Hellfeld-Mikroskop	Carl Zeiss, Jena, Deutschland
Axiovert200M	
Hitachi HV-DBO Kamera	Hitachi GmbH, Frankfurt, Deutschland
LSM 510Meta	Carl Zeiss, Jena, Deutschland
Bund Dunkelkammer, Roentgen	Lohse Textilbau GmbH, Henstedt- Ulzburg, Deutschland
hp scanjet 3500c	Hewlett-Packard GmbH, Böblingen, Deutschland
TissueLyserII von Retsch	Qiagen, Hilden, Deutschland
Ultrospec 3000	Pharmacia Biotech jetzt GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, Deutschland
Rotor-Gene 3000	Qiagen, Hilden, Deutschland
INTAS Gel IX Imager	INTAS, Göttingen, Deutschland

2.3. Enzyme und Reaktionsansätze („Kits“)

DNaseI	MBI Fermentas, St. Leon Rot, Deutschland
RevertAid H Minus M-MuLV Reverse Transkriptase	MBI Fermentas, St. Leon Rot, Deutschland
TaKaRa ExTaq	Lonza, Ratingen, Deutschland
Hot Taq-DNA-Polymerase	Peqlab, Erlangen, Deutschland
Rotor-Gene SYBR Green PCR Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland

2.4. Software und Programme

Photoshop	Adobe Systems, München, Deutschland
ImageJ	(http://rsb.info.nih.gov/ij/)
Rotor Gene 6	Qiagen, Hilden, Deutschland
DAVID	http://david.abcc.ncifcrf.gov/home.js
BAR HeatMapper Plus	http://bar.utoronto.ca/ntools/cgi-bin/ntools_heatmapper_plus.cgi
LSM 510 software v 4.0	Carl Zeiss Inc., Jena, Germany
Axiovision Rel. 4.8	Carl Zeiss Inc., Jena, Germany

2.5. Verwendete Oligonukleotide

HSIns forw.	5'-ATGGCGGGGAAGGCGGCCG-3'
HSIns rev.	5'-TCACTGCACGACACAACACTTG-3'
AtIPK forw.	5'-ATAGTTCCAACAAATTTAAGTTTAAG-3'
AtIPK rev.	5'-GATTACAAGGTATGATCCATTTTAAC-3'
AtPIN1 forw.	5'-ATGATTACGGCGGCGGACTTC-3'
AtPIN1 rev.	5'-TCATAGACCCAAGAGAATGTAGTA-3'
AtPIN2 forw.	5'-ATGATCACCGGCAAAGACATGT-3'
AtPIN2 rev.	5'-TTAAAGCCCCAAAAGAACGTAGTA-3'
AtPIN3 forw.	5'-ATGATCTCATGGCAGCCTCT-3'
AtPIN3 rev.	5'-TTATAACCCGAGTAGAATGTAGTA-3'
AtPIN4 forw.	5'-ATGATTACGTGGCAGCCTTGTA-3'

AtPIN4 rev.	5'-TCAAAGGCCAAGAAGAATATAGTAG-3'
AtPIN7 forw.	5'-ATGATCACATGGCACGACCTCT-3'
AtPIN7 rev.	5'-TTAACGGAAAAAAGAAACAGAGTAAA-3'
SALK_146728	
PIP1 forw.	5'-ACTAAAGGGCAATAATCCTTCCACC-3'
SALK_146728	
PIP1 rev.	5'-GCAAATTCTCATGGCCAAGTGA-3'
SALK_012487	
PIP2 forw.	5'-CAGGTTTGATACAATGCACACCAT-3'
SALK_012487	
PIP2 rev.	5'-TGGGAGTCTGATGGAGAAGCTG-3'
LBa1 SALK forw.	5'-TGGTTCACGTAGTGGGCCATCG-3'

2.6. Pflanzenlinien

Folgende tabellarisch aufgelistete Pflanzenlinien wurden für alle im Folgenden beschriebenen Experimente verwendet:

Name	Art	Transgen	
Wildtyp	<i>Arabidopsis thaliana</i> (L.) Heynh. Ökotyp Columbia-0	-	
<i>ipk1-1</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i> (L.) Heynh. Ökotyp Columbia-0	T-DNA Insertion in der Inositolpolyphosphatkinase IPK1 (Stevenson-Paulik et al, 2005)	Dr. John York, Duke University, Durham, NC, USA
<i>InsP 5-ptase</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i> (L.) Heynh. Ökotyp Columbia-0	<i>HsInsP 5-ptase</i> , exprimiert die menschliche Typ I InsP 5-ptase, Linie 2-8 (Perera et al, 2006)	Dr. Imara Perera, North Carolina State University, Raleigh, NC, USA
PIN1,2,3,4,7 fusioniert mit GFP	<i>Arabidopsis thaliana</i> (L.) Heynh. Ökotyp Columbia-0	exprimiert die genannten Auxinexporter als GFP-Fusionen	Prof. Dr. Jiří Friml, VIB Department of Plant Systems Biology, Gent, Belgien
DR5::GFP DR5::GUS	<i>Arabidopsis thaliana</i> (L.) Heynh. Ökotyp Columbia-0	exprimiert Auxin-abhängig GFP oder GUS	Prof. Dr. Jiří Friml, VIB Department of Plant Systems Biology, Gent, Belgien
<i>pip5k1 pip5k2</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i> (L.) Heynh. Ökotyp Columbia-0	T-DNA Insertionen in den Phosphatidylinositol-4-phosphat 5-Kinasen 1 und 2 (Kreuzung)	Prof. Dr. Ingo Heilmann, Biochemie, Martin-Luther-Universität Halle, Deutschland

2.7. Pflanzenmedien

MS-Medium (Murashige & Skoog Medium (Duchefa Biochemie, Haarlem, Niederlande)):

0,22	% (w/v)	MS-Medium
1	% (w/v)	Saccharose
0,05	% (w/w)	MES
0,6-1	% (w/w)	Agar (Menge variierte je nach Versuchsbedingung)

Aufgefüllt wurde mit ddH₂O. Der pH-Wert wurde mit 1 M KOH-Lösung auf 5,7-5,9 eingestellt und anschließend bei 120 °C für 20 min autoklaviert (Autoklav, H+P Labortechnik, Oberschleißheim, Deutschland).

2.8. Wachstumsbedingung und Kultivierung von Pflanzen

Die Samen für die jeweiligen Versuche auf MS-Medium wurden zunächst in einer 6 %-igen Natriumhypochloridlösung versetzt mit 0,2 % (w/v) Triton X für ca. 15 min oberflächensterilisiert. Nach anschließender Stratifizierung über Nacht wurden die Samen auf vertikal orientierten MS-Anzuchtspetrischalen unter Langtagbedingungen (7000 Lux, 16 h Licht (21 °C)/ 8 h Dunkel (18 °C)) oder im Dunkeln für mehrere Tage (je nach Versuchsbedingung variierend) angezogen. Für Kreuzungen der Einzellinien und die Vermehrung von Samen wurden die Pflanzen auf Erde ausgebracht (Pikiersubstrat 1 der Firma Klasmann, Gärtnerei Kammlott, Erfurt, Deutschland oder Frühstorfer Erde Typ: T25 Str. 1 (Fein), Industrie Erdwerk Archut, Lauterbach-Wallenrod, Deutschland) und zunächst für ca. eine Woche unter einer durchsichtigen Plastikhaube im Kurztag angezogen (7000 Lux, 8 h Licht/16 h Dunkel, A1000, Ser 1.5, Conviron Germany GmbH, Berlin, Deutschland) angezogen. Nach weiteren fünf Wochen im Kurztag wurden die Pflanzen in den Langtag bis zur Blüte bzw. bis zum Abreifen in ein Gewächshaus (Langtag bei etwa 20 °C) transferiert.

2.9. Kreuzungen verschiedener Pflanzenlinien

Um genetische Eigenschaften in stabilen Hintergründen zu kombinieren, wurden verschiedene Pflanzenlinien gekreuzt. Folgende Kreuzungen wurden im Rahmen des Projektes erzeugt:

Spenderlinie		Empfängerlinie	Anmerkung
PIN1:GFP	unter eigenem Promotor	<i>ipk1-1</i> <i>InsP 5-ptase</i> <i>pip5k1 pip5k2</i> (DR5::GUS exprimierende Linien wurden nur mit der <i>pip5k1 pip5k2</i> -Doppelmutante gekreuzt)	Die Kreuzungen mit der <i>pip5k1 pip5k2</i> -Doppelmutante wurden von Dr. Till Ischebeck erzeugt. Die Selektion der stabilen Generation für die Experimente: diese Arbeit
PIN2:GFP			
PIN3:GFP			
PIN4:GFP			
PIN7:GFP			
DR5::GFP			
DR5::GUS			

Die Kreuzungen erfolgten unidirektional mit den Pollen der PIN:GFP/DR5::GFP- bzw. DR5::GUS-exprimierenden Pflanzen. Für die Kreuzung wurden wie in Abschnitt 2.7 beschrieben zur Blüte gebrachte Pflanzen verwendet. Bei der Auswahl der Empfängerblüte wurde darauf zu geachtet, dass Antheren noch nicht entwickelt waren und es damit zu keiner Selbstung der Pflanze kam. Die noch ungeöffnete Empfängerblüte wurde anschließend unter einem Stereomikroskop fixiert und von Sepalen, Petalen und Stamina befreit, so dass nur noch das Pistil zurückblieb. Von der Spenderpflanze wurde eine geöffnete Blüte mit entwickelten Antheren ausgewählt. Diese wurde durch leichtes Drücken mit einer Pinzette geöffnet so dass die Antheren hervortraten. Die Pollen wurden dann durch leichtes Reiben der Antheren der Spenderpflanze an dem Pistil der Empfängerpflanze übertragen. Anschließend wurde die Restblüte der Empfängerpflanze für drei bis fünf Tage locker in Plastikfolie eingeschlagen, um die Feuchtigkeit zu halten. Um die daraus entstehende Schote später besser identifizieren zu können, wurden benachbarte Blüten entfernt.

2.10. DNA-Isolation aus Pflanzenmaterial

Für Genotypisierungen wurde aus geerntetem Blattmaterial genomische DNA isoliert. Dazu wurde ein Blatt in einem 2 ml-Plastikreagiergefäß, welches mit drei Glasperlen (Roth, Karlsruhe, Deutschland) versetzt war unter Stickstoffkühlung mittels einer Kugelmühle

(TissueLyserII Retsch, Qiagen, Hilden, Deutschland) aufgeschlossen. Das gefrorene Material wurde anschließend mit CTAB-Extraktionslösung (2 % (w/v) CTAB (Cetyltrimethylammoniumbromid), 100 mM Tris-HCl, pH 8.0, 20 mM EDTA, 1,4 M NaCl) versetzt und für 20 min bei 65 °C inkubiert. Nach kurzem Abkühlen wurde der Probe in gleichem Volumen Chloroform (CHCl₃)/Isoamylalkohol Lösung (24:1, v/v) zugefügt und anschließend für 3 min bei 7500 g zentrifugiert. 400 µl der oberen Phase wurden anschließend in ein neues 1,5 ml Reagiergefäß überführt und die DNA durch Zusetzen von 40 µl einer CTAB-NaCl Lösung (10 % (w/v) CTAB/ 0,7 % (w/v) NaCl) und von 400 µl Isopropanol gefällt. Nach ca. 2-4-minütiger Inkubation wurden die Proben für 10 min bei 20000 g sedimentiert. Nach Abnehmen des Überstandes wurde die gewonnene DNA nach einmaligem Waschen in 75 % (v/v) Ethanol in 40-50 µl ddH₂O aufgenommen.

2.11. Bestimmung der gravitropen Krümmung von Wurzeln und Hypokotylen von *A. thaliana*

Für Krümmungsexperimente wurden sechs Tage alte Keimlinge auf MS-Medium in vertikalen Petrischalen angezogen. Der Versuch wurde sowohl im Dunkeln als auch mit im Langtag gezogen Pflanzen durchgeführt. Als Drehwinkel wurde 135° nach (Fukaki et al., 1996) gewählt. Nach erfolgter Reorientierung wurden Pflanzen in dieser Position fixiert und die ganze MS-Platte nach verschiedenen Zeitpunkten eingescannt (hp scanjet 3500c). Für den Dunkelversuch wurden die Zeitpunkte 0, 24, 48, 72 h gewählt, für die im Licht durchgeführten Experimente 0, 4, 7, 24 h. Wurzellänge und Krümmungen der Wurzeln und Hypokotylen wurden anhand der digitalen Bilder mit dem frei erhältlichen Programm ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) ausgewertet.

2.12. Bestimmung bei der gravitropen Krümmungsreaktion veränderter Transkripte

Für die Messung schwerkraftabhängiger Transkripte wurden Pflanzen für fünf Tage unter Langtagbedingungen angezogen und bis zur Ernte am nächsten Tag in eine Dunkelkammer (Kälteanlage YORK Refrigeration, YORK Industriekälte GmbH & Co. KG, Mannheim, Deutschland oder Bund Dunkelkammer, Roentgen, Lohse Textilbau GmbH, Henstedt-Ulzburg, Deutschland) überführt. Die gravitrope Stimulation erfolgte für die Proben für das Transkript-Array für 20 min gegen einen Null-Minutenwert und für die *real-time* PCR für

20 min und zusätzlich für 40 min gegen den Nullwert. Die gravitrope Stimulation erfolgte wie oben beschrieben durch Rotation gegen den Uhrzeigersinn um 135°.

2.12.1. Ernte gravitrop stimulierter Wurzelspitzen

Für die globale Transkriptanalyse mittels eines Transkript-Arrays wurden 300 bis 400 Wurzelspitzen mit einer Länge von circa 0,75 cm geerntet. Dafür wurden die Anzuchtspetrischalen mit 10-15 ml RNAlater (Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Deutschland) Lösung geflutet und die Keimlinge auf einen Objektträger überführt, auf dem vorher 500 µl RNAlater aufgetragen wurde. Dort wurden die Wurzelspitzen abgeschnitten und anschließend in einem 2 ml-Reaktionsgefäß in flüssigem Stickstoff eingefroren.

2.12.2. RNA-Isolation und Reinigung

Die Wurzelproben wurden zunächst mithilfe von Metallkugeln unter Stickstoffkühlung in einer Kugelmühle aufgeschlossen. Die RNA wurde aus dem so aufgeschlossenen Material anschließend mit der TRIZOL-Methode (Chomczynski und Mackey, 1995) isoliert. Dafür wurde die Probe zunächst in 1 ml Trizol (38 % (v/v) Roti-Phenol, 0,8 M Guanidiniumthiocyanat, 0,4 M Ammoniumthiocyanat, 133,6 mM Natriumacetat pH 5,0, 5 % (v/v) Glycerin) für 5 min aufgetaut und kurz kräftig geschüttelt. Die bestehenden Zelltrümmer wurden durch eine 10 minütige Zentrifugation bei 20000 *g* bei 4 °C sedimentiert. Der Überstand wurde in ein frisches 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Die Proben wurden anschließend mit 200 µl CHCl₃ versetzt, für etwa 20 s geschüttelt und bei Raumtemperatur für 2-3 min inkubiert. Nach einer 15 minütigen Zentrifugation bei 20000 *g* und 4 °C wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und zur RNA-Fällung nacheinander mit einem halben Volumen Isopropanol und einem halben Volumen „high salt precipitation buffer“ (0,8 M Natriumcitrat, 1,2 M NaCl) versetzt. Durch vorsichtiges Invertieren wurde der Ansatz gemischt und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation bei 20000 *g* und 4 °C wurde der Überstand gründlich entfernt und das Sediment zweimal mit 75 % Ethanol gewaschen. Nach kurzem Trocknen wurde das Sediment, welches die RNA enthält in 20 µl DEPC-behandeltem ddH₂O gelöst.

2.12.3. DNase-Behandlung von isolierter RNA

Um mögliche Kontaminationen durch genomische DNA zu minimieren, wurde die RNA nach der Isolierung mit DNase behandelt. Dafür wurde folgender Ansatz hergestellt.

19-20	µl	RNA-Ansatz
1	µl	DNaseI (MBI Fermentas, St. Leon Roth, Deutschland)
5	µl	Puffer
1	µl	RiboLock
ad 50 µl ddH ₂ O		

Die Behandlung wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt und durch Zugabe von EDTA abgestoppt.

2.12.4. Fällung von RNA für das Transkript-Array

Für die RNA-Fällung für das Transkript-Array wurde das Protokoll des Transcriptom Analysis Labors (TAL) in Göttingen verwendet. Nach der DNase-Behandlung musste die RNA erneut gefällt werden, um Reste von EDTA zu entfernen. Der Ansatz wurde dafür auf 200 µl mit DEPC behandeltem ddH₂O aufgefüllt und mit 200 µl eines Phenol/CHCl₃/Isoamylalkohol-Gemischs (25:24:1, v/v/v) versetzt und anschließend gemischt. Durch anschließende Zentrifugation für mehrere Minuten bei 20000 g wurden die Phasen sauber getrennt und die Oberphase, welche die RNA enthält in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurde der Probe die Menge 1/10 des Gesamtvolumens Natriumacetat (3 M, pH 4,8) und eine dem Gesamtvolumen entsprechende Menge Isopropanol zugefügt. Nach gründlichem Mischen wurden die Proben für eine halbe Stunde bei -20 °C inkubiert und anschließend für 30 min bei 20000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde gründlich entfernt und der Niederschlag zweimal mit 75 %igen (v/v) Ethanol gewaschen. Anschließend wurde der Niederschlag in 50 µl RNase-freien ddH₂O aufgenommen. Die Qualität der RNA wurde mittels Gelelektrophorese überprüft.

2.12.5. Fällung von RNA für die quantitative RT-PCR

Der DNase-behandelte Ansatz wurde zunächst wie im vorherigen Absatz beschrieben auf 200 µl gebracht und mit 200 µl Phenol versetzt. Nach einer Zentrifugation bei 20000 g für 10 min wurde die obere Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 400 µl

CHCl₃:Isoamylalkohol (24:1, v/v) versetzt. Nach einer weiteren Zentrifugation für 10 min wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Für die anschließende Fällung der RNA wurden der Probe 2 µl Glycogen, 100 µl Ammoniumacetat (7,5 M) und 750 µl Ethanol (96 %, v/v) zugegeben. Der Ansatz wurde für etwa 15 min bei -80 °C gekühlt und anschließend 20 min bei 20000 g zentrifugiert. Das Sediment wurde in 75 %igen (v/v) Ethanol gewaschen, anschließend getrocknet und in 20 µl DEPC behandelten H₂O aufgenommen. Die Qualität der RNA wurde durch auch hier durch Gelelektrophorese bestimmt und die Konzentration mittels eines Photometers (Ultrospec 3000 Pharmacia Biotech jetzt GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, Deutschland) ermittelt.

2.12.6. Elektrophoretische Trennung von Nukleinsäuregemischen

Die RNA-Qualität wurde über elektrophoretische Trennung auf einem 1 % (v/v)-igen Agarose-Gel in TAE-Puffer (40 mM TRIS, pH 7,0, 20 mM Essigsäure, 1 mM EDTA 1 % (w/v) Agarose) überprüft. Dafür wurden 2 µl der Probe mit 1 µl Probenpuffer (0,4 % (w/v) Orange G, 0,03 % (w/v) Bromphenolblau, 0,03 % (w/v) Xylencyanol PP, 60 % (w/v) Glycerol) versetzt. Nach dem Lauf wurde das Gel ca. 5-10 min in einem Ethidiumbromid-dH₂O-Bad (Ethidiumbromidkonzentration 0,1 % (v/v)) inkubiert und unter UV-Licht photographiert (INTAS Gel IX Imager, Göttingen, Deutschland). In einer weiteren Spur auf dem Gel wurde ein DNA-Marker (GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder (Fermentas, St.Leon-Rot, Deutschland) aufgetragen um die Höhe der ribosomalen RNA-Banden abzugleichen, welche in etwa auf der Höhe der Banden von 1200 und 1800 bp Größe laufen.

50x TAE Puffer:

2	M	TRIS
0,05	M	EDTA (pH 8,0)
1	M	Essigsäure

2.12.7. Transkript-Array-Analysen

Die Transkriptanalyse wurde durch Mitarbeiter des Transcriptome Analysis Labors (TAL) in Göttingen mit präparierter RNA durchgeführt. Für die Transkriptanalyse wurden Agilent Arabidopsis 4x44K Array Chipsätze verwendet. Die erhaltenen Rohdaten wurden gemeinsam mit Dr. Mareike Heilmann (Martin-Luther-Universität Halle) ausgewertet. Dazu wurden die Daten mit dem frei verfügbaren Programm Heatmapper Plus

(http://bar.utoronto.ca/ntools/cgi-bin/ntools_heatmapper_plus.cgi) graphisch ausgewertet. Für weitere Analysen identifizierter Gengruppen wurde The Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID) v6.7 (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/home.jsp>) verwendet.

2.12.8. Bestimmung spezifischer Transkriptgehalte durch quantitative *real-time* RT-PCR

Von den in der Gesamttranskriptanalyse gefundenen Genen wurden ausgewählte Kandidaten mittels quantitativer *real-time* RT-PCR (qPCR) verifiziert. Dafür wurden Wurzelspitzen unter vergleichbaren Bedingungen wie für die Gesamttranskriptanalyse im Dunkeln geerntet (siehe Abschnitt 2.10.1). Als Dunkelkammer stand ein transportables Röntgenzelt der Bundeswehr (Bund Dunkelkammer, Roentgen, Lohse Textilbau GmbH, Henstedt-Ulzburg, Deutschland) zur Verfügung. Für die qPCR wurde ein zusätzlicher Zeitpunkt nach Gravistimulation von 40 min ausgewählt.

Nach der Ernte der Wurzelspitzen wurde die RNA Isolation wie in Abschnitt 2.10.2 durchgeführt. Nach DNase-Behandlung und erneuter Fällung der RNA wurde die RNA-Konzentration photometrisch bestimmt. Für die anschließende cDNA Synthese (2.10.2.1) wurden die Konzentrationen aller Proben mit DEPC behandelten ddH₂O auf 250 ng pro Ansatz eingestellt.

Die qPCR wurde mit einem Rotor-Gene 3000 Gerät (Qiagen, Hilden, Deutschland) durchgeführt und mit der dazugehörigen Software Rotor-Gene 6 (Qiagen, Hilden, Deutschland) ausgewertet.

Ein qPCR-Ansatz setzte sich wie folgt zusammen:

1	μl	cDNA einer 1:10 Verdünnung
7,5	μl	SYBRGreen Mix (Qiagen)
1,5	μl	QuantiTect-Primer Mix für das zu untersuchende Gen (Qiagen)
ad 15 μl ddH ₂ O		

Für jeden Lauf wurden zu jeder Probe Kontrollen mit einem Primer für Aktin8 (ebenfalls ein QuantiTect Primer von Qiagen) durchgeführt. Zusätzlich wurden Negativkontrollen ohne cDNA durchgeführt um auszuschließen, dass die Primer aneinander banden und damit zu falsch positiven Ergebnissen führten.

Das folgende Programm wurde für die qPCR verwendet:

1. 95 °C 10 min
2. 95 °C 10 s
3. 60 °C 10 s
4. 72 °C 15 s

Die Schritte 2-4 wurden 40-mal wiederholt.

Die Berechnung der relativen Expression wurde nach der $2^{-\Delta CT}$ -Methode (Livak und Schmittgen, 2001) durchgeführt.

2.13. Subzelluläre Verteilung von PIN-Proteinen nach Gabe von Brefeldin A und Auxin

Um die Verteilung und den intrazellulären Transport von PIN-Proteinen zu verfolgen, wurden Behandlungen mit Cycloheximid (CHX), Brefeldin A und verschiedenen Auxinen durchgeführt. Für den Versuch wurden sechs Tage-alte Keimlinge verwendet, die zunächst im Langtag angezogen wurden. Eine halbe Stunde vor dem eigentlichen Experiment wurden die Pflanzen auf MS-Medium mit 50 μ M CHX vorinkubiert um die Neusynthese von PIN-Proteinen zu stoppen. Anschließend wurde ein Mix aus CHX (50 μ M), BFA (25 μ M) und gegebenenfalls zusätzlich Auxin (10 μ M) (es wurden sowohl NAA als auch IAA getestet) in MS-Flüssigmedium angesetzt. Für die anschließende Mikroskopie wurden die Pflanzen in diesem Mix für verschiedene Zeiträume (0, 30, 60, 90, 120 Minuten) inkubiert und anschließend mikroskopiert. Aufnahmen wurden sowohl mit einem Epifluoreszenzmikroskop, als auch mit einem konfokalen Mikroskop aufgenommen. Die konfokalen Bilder wurden zusätzlich dazu genutzt die Zahl der BFA-Körper pro Zelle zu ermitteln.

2.14. Mikroskopie

Für die Mikroskopie von Wurzelspitzen wurden folgende Mikroskope verwendet: AXIO IMAGER M1, Axiovert 200M sowie das konfokale LSM 510Meta. Eine Vorselektion fluoreszierender Keimlinge wurde mit einem SteREO Discovery V8 durchgeführt. Die DR5::GUS-exprimierenden Pflanzen wurden mit Hilfe des Axiovert200M und der dazugehörigen Farbkamera bei 10- und 20-facher Vergrößerung untersucht.

Die vorliegenden PIN-Proteine, die auf ihre Lokalisation mikroskopisch untersucht wurden, waren an ein Green Fluoreszent Protein gekoppelt, das erstmalig 1961 aus der Qualle *Aequorea victoria* isoliert wurde (Shimomura et al., 1962). GFP zeichnet sich durch ein sich selbst autokatalytisch bildendes Fluorophor aus (Ormo et al., 1996), was den Vorteil hat, dass es für die Faltung keine katalytische Enzymaktivität von außen braucht. Somit ist es möglich das funktionstüchtige Protein beliebig in anderen Organismen zu exprimieren. Eine Weiterentwicklung des GFP zu eGFP (enhanced) durch die Mutagenese einiger Aminosäuren führte zu einer Verstärkung der Fluoreszenz und zu einer erhöhten Stabilität des Proteins (Janke et al., 2004).

Die Mikroskopie der PIN-Verteilung in den verschiedenen Pflanzenlinien erfolgte zum größten Teil mit dem LSM 510Meta bei 40-facher Vergrößerung, aber auch mit dem AXIO IMAGER M1 bei 20-facher Vergrößerung. Bei der Mikroskopie mit dem LSM 510 Meta wurde GFP bei einer Wellenlänge von 488 nm durch einen Ar⁺-Laser angeregt und mittels eines Hauptfarbteiler HTF 405/488/514/633 und eines 505-530nm Bandpassfilters nachgewiesen. Bei der Mikroskopie mit dem AXIO IMAGER M1 wurde ein Axio 46HE Filterset für YFP verwendet. Die Bilder wurden mit den dazugehörigen Software-Programmen für das Zeiss LSM510 (Zeiss LSM Image Browser version 4.0, Carl Zeiss, Jena, Deutschland) und für das AXIO IMAGER M1, SteREO Discovery V8 und das Axiovert 200M mit Axiovision Rel. 4.8 (Carl Zeiss, Jena, Deutschland) aufgenommen bzw. ausgewertet.

2.15. Verteilung von DR5::GFP in verschiedenen *A. thaliana* Linien

Um die subzelluläre Verteilung von Auxin nach Gravistimulation verfolgen zu können, wurden das Auxin-Reporterkonstrukt DR5::GFP verwendet (Prof. Dr. Jiří Friml, VIB Department of Plant Systems Biology, Gent, Belgien). Das Prinzip der Visualisierung der Auxin-Umverteilung beruht dabei auf der spezifischen Induktion des DR5-Promotors durch das Hormon. Für die Visualisierung der Auxinverteilung in den Mutanten, wurden die DR5::GFP-Reporterlinien mit den in Abschnitt 2.9 aufgezählten Pflanzenlinien gekreuzt. Keimlinge wurden über einen Zeitraum von 90 min gravitrop im Dunkeln stimuliert (135°). Als Kontrolle dienten DR5::GFP-exprimierende Wildtyppflanzen. Der Verlauf der Auxin-Verteilung wurde nach den Zeitpunkte 0, 30, 60 und 90 min mit einem konfokalen Mikroskop verfolgt.

2.16. Darstellung der Auxinverteilung über DR5::GUS

Da es nicht möglich war, den Auxinfluss in *pip5k1 pip5k2*-Doppelmutanten mit dem DR5::GFP-Reporterkonstrukt zu verfolgen, wurden heterozygote Mutanten dieser Linie mit Linien gekreuzt, die ein DR5::GUS-Reporterkonstrukt tragen und anschließend auf homozygote Doppelmutanten selektiert. Für das Experiment wurden die Mutanten zunächst auf horizontalen MS-Platten für vier Tage im Langtag angezogen. Die Doppelmutanten wurden aus den so gezogenen Keimlingen selektiert und für weitere zwei Tage auf vertikale Platten transferiert. Mit den Wildtypkontrollen wurde ebenso verfahren. Anschließend wurden die Keimlinge beider Linien für 4 h auf Platten mit 100 nM IAA, NAA, 2,4-D oder Platten ohne Medienzusätze umgelegt. Danach wurden sie in die GUS-Färbelösung (2 mM X-Gluc (20 mg in 200 µl DMSO vorgelöst), 100 mM Natriumhydrogenphosphat (pH 7,0), 10 mM EDTA (pH 7,0), 0,5 mM Kaliumhexacyanoferrat(II)-Trihydrat, 0,5 mM Kaliumhexacyanoferrat(III), 2 % (v/v) Triton-X) transferiert. Die Färbereaktion beruht darauf, dass die β -Glucuronidase unter dem auxinsensitiven Promotor DR5 exprimiert wird. Dieses Enzym hydrolysiert X-Gluc zu Glucuronsäure und 5-Brom-4-chlor-indoxyl. Letzteres wird durch Oxidation zu dem blauen Farbstoff 5,5'-Dibrom-4,4'-dichlor-indigo umgesetzt. Diese Reaktion erfolgte zum einen für 50 min (im Wildtyp kam es bei auxinbehandelten Keimlingen bei längerer Inkubation zu einer starken Überfärbung) und in einem zweiten Ansatz für 20 h über Nacht. Anschließend wurden die Keimlinge bis zur Mikroskopie in 70 % (v/v)-ige Ethanollösung überführt.

2.17. Auxintransporttest

Der Transport von Auxin innerhalb eines Keimlings vom Spross bis in die Wurzelspitze wurde in einem Auxintransporttest (Rashotte et al., 2000) mittels radioaktiv markierten Auxin (^3H -IAA) (Amersham, München, Deutschland) untersucht. Dafür wurden die Keimlinge zunächst für sieben Tage in vertikaler Orientierung angezogen. Anschließend wurden jeweils acht Keimlinge einer Linie auf eine neue Anzuchtplatte transferiert, so dass die Spross-Wurzel Übergänge in einer geraden Linie ausgerichtet waren. Das radioaktiv markierte Auxin (100 nM) wurde mit nicht-markiertem Auxin (10 µM) in 1 % (w/v) Agar gemischt und in einer kleinen Form erstarren lassen. Aus diesem mit Auxin angereicherten Agarblock wurden mit einer Pasteurpipette kleine Fragmente ausgestochen und auf den Spross-Wurzel-Übergang gelegt. Anschließend wurden die Platten für 18 h im Dunkeln inkubiert. Die Messung des Auxin-Transportes erfolgte in einem 1 cm langen Fragment der Wurzelspitze mittels eines Szintillationszählers. Dafür wurden die Wurzelsegmente zuvor

mit einem Skalpell abgeschnitten und in den Szintillationsgefäßen in 2,5 ml Szintillationsflüssigkeit aufgenommen und für 2 min gemessen.

3. Ergebnisse

In früheren Arbeiten von Perera et al. wurde, wie bereits in der Einleitung beschrieben, gezeigt, dass die Kontrolle auxinvermittelter Prozesse, wie z.B. die gravitrope Krümmung von Pflanzenorganen auch die Beteiligung von Pls und IPPs erfordert (Perera et al., 2006). Außerdem ist bekannt, dass IPPs in mehreren Hormonsignalwegen entscheidende Kofaktoren darstellen. Das Inositolpentakisphosphat ist z.B. ein wichtiger Kofaktor mit Funktion im Jasmonatrezeptor COI1 (Mosblech et al., 2011), welcher starke strukturelle Ähnlichkeit zum Auxinrezeptor TIR1 aufweist, der ein Inositolhexakisphosphat enthält. Die Funktion von InsP_6 in TIR1 ist bislang unbekannt. In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob Pls und verschiedene IPPs eine relevante Funktion für auxinvermittelte Prozesse und Signalweiterleitungen einnehmen. Aus diesem Grund wurden zwei Arbeitshypothesen entwickelt, die bereits in der Einleitung in Abschnitt 1.12. erläutert wurden.

3.1. Der Einfluss von $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ auf den polaren Auxintransport

Wie in Abschnitt 1.12 bereits erklärt, besagt Hypothese I, dass Pls, im Besonderen $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ einen Einfluss auf die Integration und die Lokalisation von auxintransportierenden Proteinen haben könnte. Zur gezielten Untersuchung dieser Annahme wurden verschiedene Pflanzenlinien auf auxinvermittelte Prozesse analysiert, die im Syntheseweg von Pls gestört sind.

3.1.1. Charakterisierung der *pip5k1 pip5k2*-Doppelmutante

In der *pip5k1 pip5k2*-Mutante ist die Expression zweier ubiquitär exprimierter PI4P 5-Kinasen (PIP5K1 und PIP5K2) vermindert, was signifikant reduzierte Gehalte an PtdIns(4,5)P₂ zur Folge hat, auch schon in den Einzelmutanten (siehe Abb. 3.1.1).

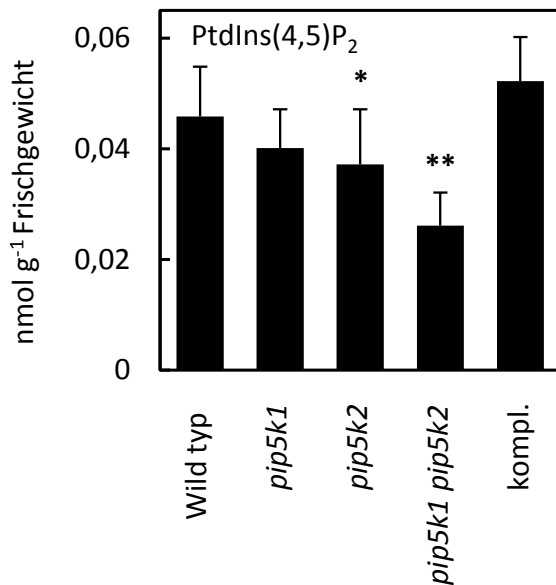


Abb. 3.1.1.: PtdIns(4,5)P₂-Gehalte der Einzel- und Doppelmutanten der PI4P5-Kinasen 1 und 2. Gehalte an PtdIns(4,5)P₂ in den Einzelmutanten der PIP5K1 und PIP5K2, als auch der Doppelmutante. Bei den komplementierten Pflanzen handelt es sich um Doppelmutanten, die mit der PIP5K1 komplementiert wurden. Daten von Jennifer Lerche. Daten stellen Mittelwerte \pm Standardfehler von vier Experimenten dar. * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$ (Student's t-Test).

Wie in Abbildung 3.1.2 B zu sehen, ist die Expression, die durch eine T-DNA-Insertion in den Genen der Kinasen unterbunden wird (siehe Abb. 3.1.2.A), innerhalb der Einzel- und Doppelmutanten auf nahezu Null gesunken im Gegensatz zum Wildtyp.

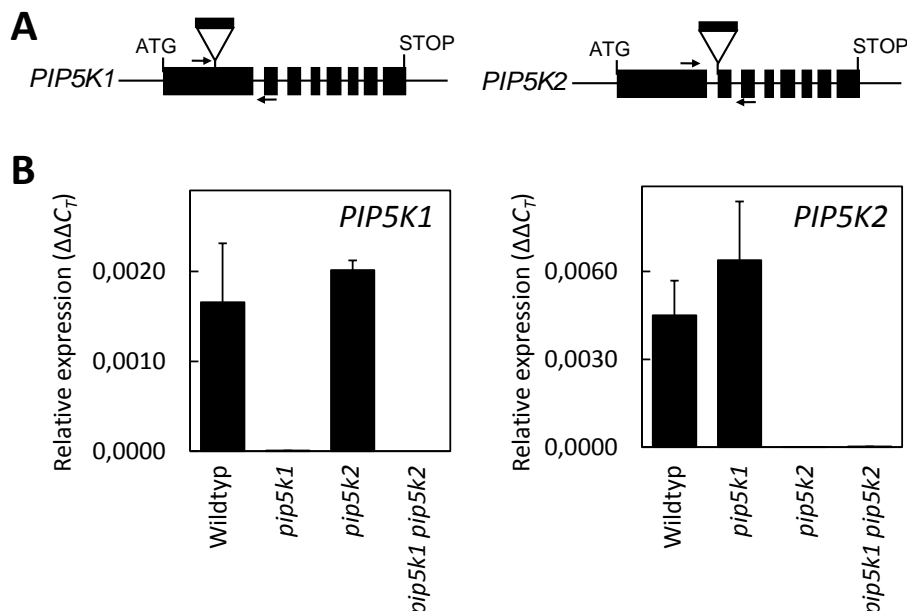


Abbildung 3.1.2.: Genetische Charakterisierung der *pip5k1 pip5k2*-Doppelmutante und der jeweiligen Einzelmutanten. A: Positionen der T-DNA-Insertion in den Genen für die PIP5K1 und PIP5K2. B: Relative Expression für PIP5K1 und PIP5K2 im Wildtyp, *pip5k1*-Mutante, *pip5k2*-Mutante und der *pip5k1 pip5k2*-Doppelmutante. Daten von Dr. Till Ischebeck. Daten stellen Mittelwerte \pm Standardfehler von drei Experimenten dar.

PIP5K1 als auch PIP5K2 sind relevant für das normale Wachstum, was an dem stark ausgeprägten Phänotyp der Doppelmutante deutlich wird. Die Pflanzen sind im Gegensatz zum Wildtyp wesentlich kleiner, haben rötliche, harte Blätter, stark verkürzte Wurzeln und bilden keine funktionstüchtigen Antheren aus (siehe Abb. 3.1.3.). Auffällig ist zudem, dass sie nach sehr langer Wuchszeit von zehn Monaten kaum Seneszenz zeigen und auch ihre Apikaldominanz verloren haben. Beide Prozesse werden unter anderem von Auxin reguliert.



Abb 3.1.3.: **Phänotypischer Überblick der *pip5k1 pip5k2*-Doppelmutante.** Die *pip5k1 pip5k2*-Doppelmutante zeigte einen deutlichen Wachstumsphänotyp. A: Pflanzen wurden im Langtag für fünf Wochen auf Erde angezogen. Links ist eine Wildtyppflanze, rechts die *pip5k1 pip5k2*-Doppelmutante dargestellt. B: *pip5k1 pip5k2*-Doppelmutanten wurden für zehn Monate im Langtag angezogen. C: Keimlinge wurden für zehn Tage auf MS-Medium im Dauerlicht auf vertikalen Platten angezogen. Links die Wildtypkontrolle, rechts die Doppelmutante. Abbildungen B und C von Dr. Till Ischebeck.

Die *pip5k1 pip5k2*-Doppelmutante wurden von Dr. Till Ischebeck erzeugt und die meisten der bisher dargestellten Daten wurden von ihm erhoben. Die *pip5k1 pip5k2*-Doppelmutante zeigt deutliche Auxin-Phänotypen, wie beispielsweise fehlende Apikaldominanz (siehe Abb. 3.1.3.B). Für das Verständnis der im Folgenden beschriebenen Experimente wurden seine Ergebnisse in diese Arbeit aufgenommen.

3.1.2. Auxintransportmessung mit radioaktiv markiertem IAA

Die *pip5k1 pip5k2*-Doppelmutante weist, wie im vorherigen Abschnitt geschildert, gravierende Störungen in auxinvermittelten Prozessen auf. Aus diesem Grund wurde in dem im Folgenden beschriebenen Experiment der Transport von Auxin in die Wurzelspitze mittels radioaktiv markiertem IAA untersucht. Dieses Experiment wurde in Kooperation mit Dr. Christian Löffke (Institut für Angewandte Genetik und Zellbiologie (IAGZ)) durchgeführt. Dabei wurde ^3H -IAA auf die Übergangszone vom Spross zur Wurzel aufgetragen und 18 h später die Menge an radioaktiv markiertem Auxin in einem 1 cm großen Stück der Wurzelspitze gemessen. Dieses Experiment wurde sowohl für die *pip5k1 pip5k2*-Doppelmutante als auch vergleichend für den Wildtyp durchgeführt. Da sich die Pflanzen vom Wuchs her stark unterschieden, wurden ältere Pflanzen (zwei Wochen) beider Linien gewählt, da die Mutante nach der normalerweise gewählten Zeit von sechs Tagen noch keine Wurzel von 1 cm Länge besitzt. Trotz der relativ kurzen Wurzel der Doppelmutante ließen sich signifikante Unterschiede im Transportverhalten zwischen den Linien feststellen, da im Vergleich zum Wildtyp wesentlich weniger Auxin in der Wurzelspitze ankam (Abb. 3.2.). Die relative Konzentration des markierten Auxins war in der *pip5k1 pip5k2*-Doppelmutante im Vergleich zum Wildtyp um etwa ein Viertel reduziert.

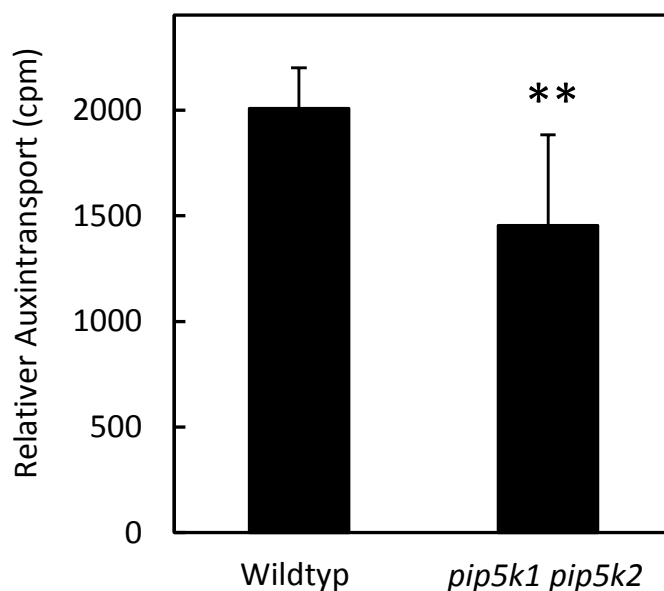


Abb. 3.2.: **Auxintransportmessung mit radioaktiv markiertem IAA.** Für die Auxintransportmessung wurden Wildtyppflanzen und Doppelmutanten für zwei Wochen in vertikaler Orientierung angezogen und dann über mit Nacht mit radioaktiv markiertem Auxin behandelt. 18 h später wurde 1 cm der Wurzelspitze abgeschnitten und die Menge des dorthin transportierten ^3H -IAA mittels eines Szintillationszählers gemessen. Daten stellen Mittelwerte \pm Standardfehler von acht Einzelpflanzen je Linie eines Experimentes dar. Das Experiment wurde zweimal mit vergleichbaren Ergebnissen durchgeführt. ** = $p < 0,01$ (Student's t-test).

3.1.3. Verminderte gravitrope Krümmung der *pip5k1 pip5k2*-Doppelmutante

Die zur Verfügung gestellte *pip5k1 pip5k2*-Doppelmutante wurde auf die Ausprägung auxinabhängiger Prozesse untersucht. Ein erstes Experiment zur Untersuchung des Einflusses von PtdInsP(4,5)P₂ auf auxinabhängige Wachstumsprozesse der Pflanze war die Verfolgung der gravitropen Krümmungsreaktion. Dafür wurden Wildtyppflanzen und Doppelmutanten unter gleichen Bedingungen angezogen. Da sowohl die Krümmung der Wurzel als auch die des Hypokotyls interessant waren, wurde das Experiment im Dunkeln durchgeführt. Nach der Drehung der Anzuchtsplatten um 135° wurden die Krümmungswinkel nach jedem weiteren Tag gemessen. Dargestellt sind im Folgenden jedoch nur die Krümmungen nach 24 h, da hier der Effekt am stärksten war. Wie in Abbildung 3.3.A gezeigt, erreichen die Organe des Wildtyps wesentlich höhere Krümmungswinkel als die der Doppelmutante (Abb. 3.3.B). Beim Wildtyp erreichten die meisten Hypokotyle innerhalb dieses Experiments einen Krümmungswinkel zwischen 90° und 120° (Abb. 3.3.C). Die meisten Wurzeln erreichten maximale Krümmungswinkel zwischen 120° und 150° (Abb. 3.3.C). Die Doppelmutante zeigte nach einem Tag eine deutlich geringere Krümmung ihrer Organe (Abb. 3.3.D). Die Hypokotyle erreichten maximale Krümmungswinkel zwischen 60° und 90°, der Großteil der Wurzeln lediglich zwischen 30° und 60°. Das von PIP5K1 und PIP5K2 erzeugte PtdInsP(4,5)P₂ scheint also für die Krümmungsreaktion von *A. thaliana* relevant zu sein.

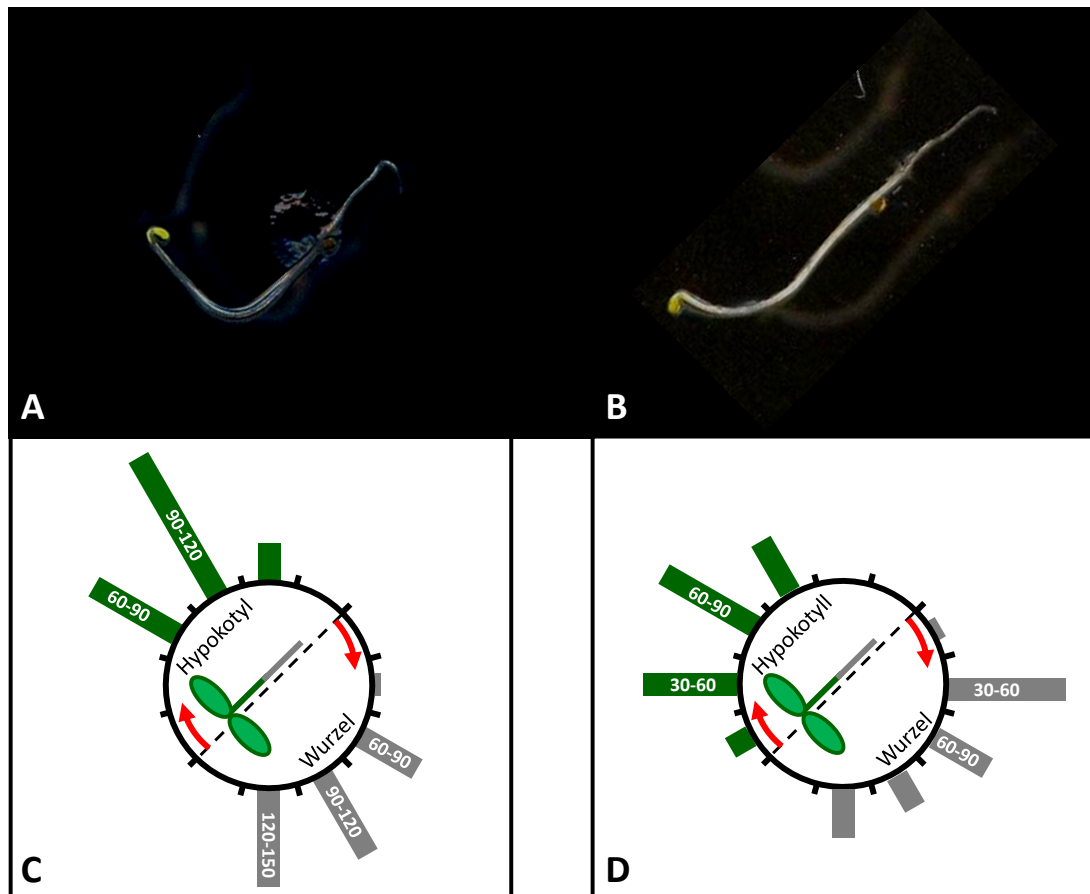


Abb. 3.3.: **Verminderte gravitrope Krümmung der *pip5k1 pip5k2*-Doppelmutante.** Keimlinge des Wildtyps (A) und der Doppelmutante (B) wurden auf ihre Krümmungseigenschaften nach 24 h gravitroper Stimulation untersucht. A und B zeigen die Keimlinge nach 24 h Drehung um 135°. C und D zeigen eine graphische Auswertung des Krümmungsexperiments für Wildtyp (C) und *pip5k1 pip5k2* (D). Grüne Balken repräsentieren die gemessenen Hypokotyle, graue Balken die gemessenen Wurzeln. Die Auswertung für die Mutante ist repräsentativ für zwei Experimente, die für den Wildtyp für sechs Experimente. Pro Experiment wurden 50-60 Wildtyppflanzen und 25-30 *pip5k1 pip5k2*-Pflanzen gemessen.

3.1.4. **Veränderte Lokalisation von PIN-Auxin-Efflux-Proteinen in der *pip5k1 pip5k2*-Doppelmutante**

Die Unterschiede im Auxintransport und der gravitropen Krümmung im Wildtyp und der *pip5k1 pip5k2*-Doppelmutante weisen auf Defekte der Auxinverteilung hin. Wie in der Einleitung beschrieben, wird Auxin durch Auxin-Efflux-Proteine im Gewebe verteilt. Im Rahmen des Projektes wurden die *pip5k1 pip5k2*-Doppelmutante mit Pflanzen gekreuzt, die PIN1:GFP, PIN2:GFP, PIN3:GFP, PIN4:GFP und PIN7:GFP exprimieren. Näher betrachtet wurden jedoch nur Kreuzungen mit PIN1:GFP und PIN2:GFP.

Die Verteilung von PIN1:GFP innerhalb der Zellen war in den *pip5k1 pip5k2*-Pflanzen teilweise verändert im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 3.4.A und E) und zeigte in manchen Zelle neben der Lokalisierung an der basalen Membran auch eine Verteilung an der apikalen Membran (Abb. 3.4.B und F). Die Verteilung von PIN1 innerhalb des

Zentralszylinders war im Vergleich zum Wildtyp deutlich unregelmäßig. Besonders in den Randbereichen am Übergang zum Kortextgewebe zeigten nicht alle Zellen ein deutliches Fluoreszenzsignal des exprimierten PIN1:GFP-Konstrukts. Außerdem wurde durch die Fluoreszenz des PIN1:GFP deutlich, dass der Aufbau des Zentralzylindergewebes allgemein nicht dem des Wildtyps ähnelte und die Zellen oft deformiert erschienen. Bei der Lokalisierung von PIN2:GFP fielen Unterschiede im Vergleich mit der Wildtypkontrolle (Abb. 3.4.C) auf. PIN2:GFP lokalisierte im Kortextgewebe und der Epidermis der Wildtypkontrolle. Intrazellulär lokalisierte PIN2:GFP im Kortex basal und in der Epidermis apikal an der Plasmamembran (Abb. 3.4.A). Im Gegensatz dazu lokalisierte PIN2:GFP in einigen Zellen der *pip5k1 pip5k2*-Doppelmutante auch an anderen Seiten der Plasmamembran zum Beispiel in der Epidermis auch basal oder an den Seiten statt nur apikal wie im Wildtyp (Abb. 3.4.G und H). Zudem zeigt die Detailansicht von PIN2:GFP in manchen Fällen keine klare Lokalisation, sondern teilweise punktförmige bis diffuse Strukturen, die sich an der Plasmamembran sammelten. Ähnliches war auch bei PIN1:GFP (Abb. 3.4. F) zu beobachten. Die Daten weisen darauf hin, dass PtdIns(4,5)P₂ bei der polaren Verteilung von PIN1 und PIN2 eine Rolle spielt.

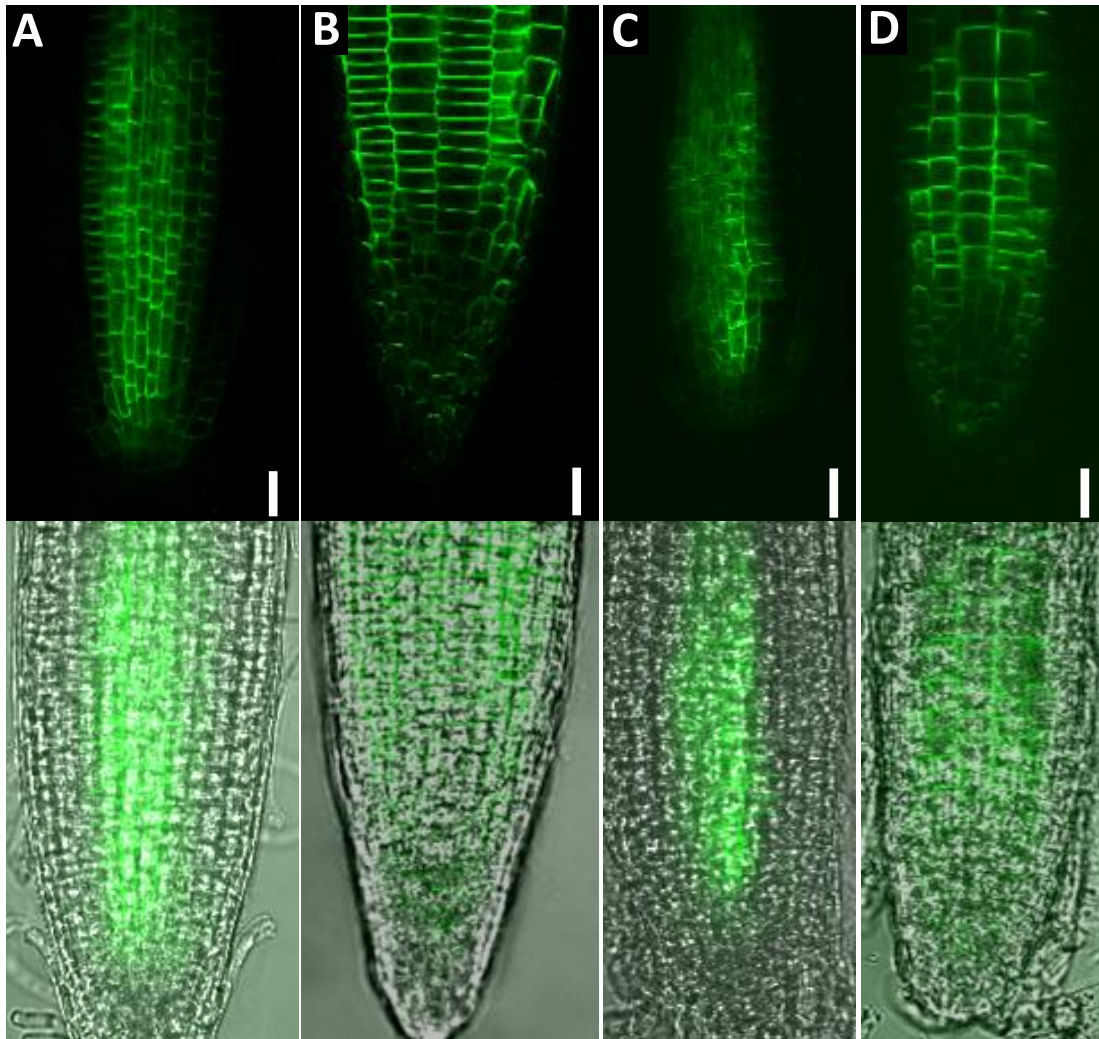


Abb. 3.4.: **PIN-Lokalisation im Wildtyp und der *pip5k1 pip5k2*-Doppelmutante.** Lokalisation der Auxin-Exporter PIN1 (A) und PIN2 (B) in sechs Tage alten Keimlingen im Wildtyp und der *pip5k1 pip5k2*-Doppelmutante (C und D). Die Lokalisation wurde mittels fluoreszenzmarkierter PIN1:GFP- und PIN2:GFP-Reporter dargestellt. PIN1:GFP zeigt Zentralzylinderlokalisierung, PIN2:GFP zeigt Kortex- und Epidermislokalisierung. Die Expression von PIN1:GFP in *pip5k1 pip5k2*-Doppelmutanten weist auf einen unregelmäßigen, deformierten Aufbau des Zentralzylinders hin. Maßstab entspricht 20 μm .

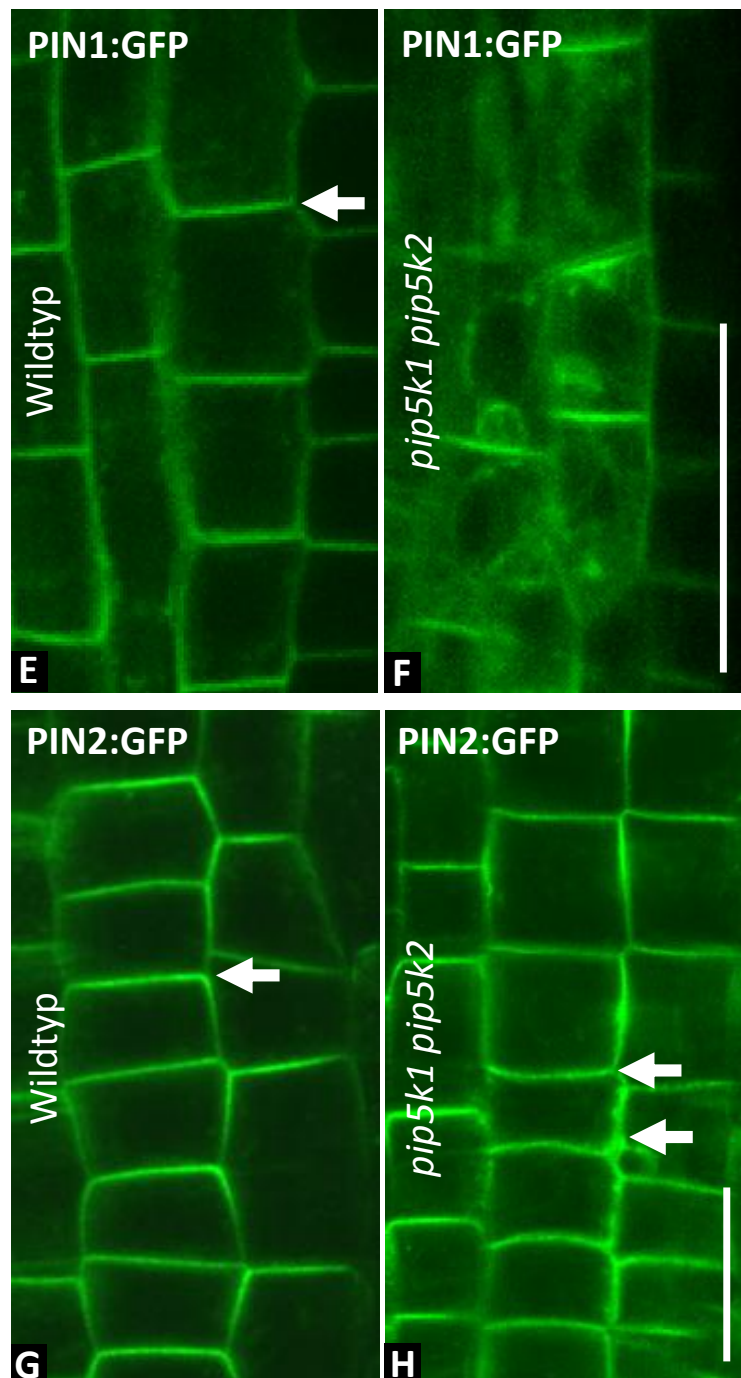


Abb 3.4.: Zelluläre Lokalisation von PIN1 und PIN2 im Wildtyp und der *pip5k1 pip5k2*-Doppelmutante. E und F zeigen Detailansichten der intrazellulären PIN1:GFP-Lokalisation in sechs Tage alten Keimlingen des Wildtyps und der *pip5k1 pip5k2*-Doppelmutante, G und H für PIN2:GFP in Epidermiszellen. PIN1:GFP lokalisiert im Vergleich zum Wildtyp diffuser in den Zellen der *pip5k1 pip5k2*-Doppelmutante (F) und nicht nur an der basalen Plasmamembran. PIN2:GFP zeigt in der Doppelmutante (H) ebenfalls veränderte Lokalisation im Vergleich mit dem Wildtyp (G) und liegt in den abgebildeten Zellen nicht nur apikal, sondern auch basal oder an den Seiten der Plasmamembran vor. Zudem bilden sich punktförmige PIN2:GFP-haltige Strukturen nahe der Membran aus. Der Maßstabsbalken entspricht 20 μm . Bilder sind repräsentativ für zwei Experimente.

3.1.5. Endozytisches „Cycling“ der PIN-Transporter

Für die Neuverteilung von Auxin nach Gravistimulation in das Kortexgewebe und die Epidermis ist hauptsächlich PIN2 als Exporter zuständig. Es ist auch bekannt, dass der Gehalt an PIN2 an der Unterseite der Wurzel nach Drehung zunimmt und an der Oberseite schwächer wird (Abas et al., 2006). Dieser Prozess beruht zum einen auf einer zellulären Umverteilung und Polarisierung von PIN2, als auch dessen Neusynthese. PIN-Proteine müssen innerhalb der Zelle also flexibel transportierbar sein und sind daher ständig Exo- und Endozytose-Prozessen unterworfen. Wie in der Einleitung bereits beschrieben, wird beispielsweise PIN2 ständig zwischen der Plasmamembran und dem Endomembransystem hin- und hertransportiert. Dabei lässt sich zwischen dem Transport an die apikale und die basale Plasmamembran unterscheiden, weil beide Wege unterschiedlich reguliert werden (Kleine-Vehn et al., 2008). Dabei stellte sich heraus, dass der Transportweg, welcher PIN2 an die basale Membran lokalisiert, für den Transportinhibitor Brefeldin A empfindlich ist, da dieser das ARF-GEF GNOM inhibiert (Kleine-Vehn et al., 2008). Durch diese Inhibierung ist es nach Internalisierung von PIN2 nicht mehr möglich, den Transporter von den Endosomen zurück zur Plasmamembran zu bringen. Es kommt zu einer Akkumulierung in sogenannten BFA-Körpern.

Die Lokalisation von PIN2:GFP wurde in Kortexzellen des Wildtyps und der *pip5k1 pip5k2*-Doppelmutante ohne BFA-Behandlung (Abb. 3.5.A und B) und nach 60 min BFA Behandlung (Abb. 3.5.C und D) verfolgt. Im Wildtyp kam es nach der BFA-Behandlung zu einer deutlichen Akkumulation von PIN2 in BFA-Körpern (Abb. 3.5.C). In der Doppelmutante war das Vorkommen der BFA-Körper nach der gleichen Zeit wesentlich weniger stark ausgeprägt, was dafür spricht, dass der Auxin-Transporter PIN2 in der Doppelmutante im Vergleich zum Wildtyp weniger beweglich zwischen den Membranen fluktuieren kann oder dass PIN2 durch seine weniger polare Lokalisation innerhalb einer Zelle der Doppelmutante weniger anfällig für die inhibierende Wirkung von BFA ist.

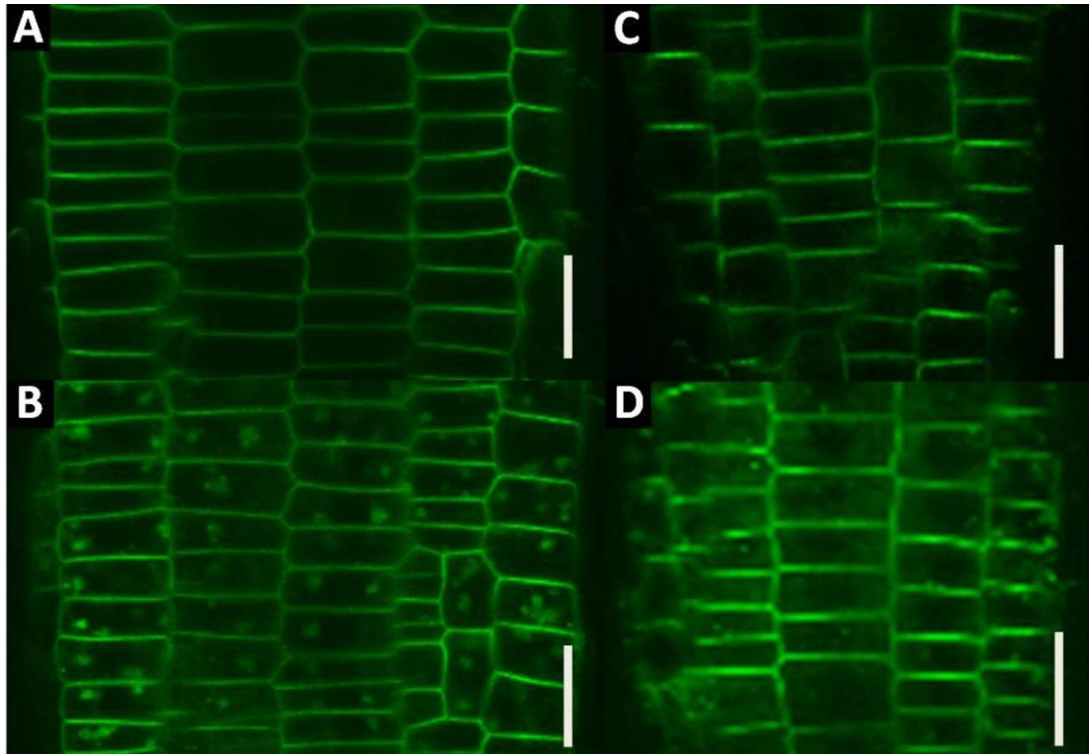


Abb 3.5.: **BFA-Körperbildung im Wildtyp und der *pip5k1 pip5k2*-Doppelmutante.** Wildtyp und *pip5k1 pip5k2*-Doppelmutante wurden für 1 h mit Brefeldin A inkubiert um die Internalisierung von GFP-markierten PIN2-Proteinen in BFA-Körpern zu untersuchen. A: Wildtyp ohne BFA, B: *pip5k1 pip5k2*-Doppelmutante ohne BFA, C: Wildtyp nach 1 h BFA-Behandlung, D: *pip5k1 pip5k2*-Doppelmutante nach 1 h BFA-Behandlung. Das Experiment wurde drei Mal mit vergleichbaren Ergebnissen durchgeführt. Der Maßstabsbalken entspricht 20 μm .

Die Daten weisen darauf hin, dass $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ eine wichtige Funktion bei der endozytotischen Internalisierung und somit bei der polaren Verteilung von PIN2 hat.

3.1.6. Ermittlung der Auxin-Verteilung mittels GUS-Färbung in der *pip5k1 pip5k2*-Doppelmutante

Der in der *pip5k1 pip5k2*-Doppelmutante veränderte Auxintransport und die gestörte polare PIN-Verteilung wiesen darauf hin, dass Auxin im Vergleich zum Wildtyp anders im Gewebe verteilt wird. Um die Verteilung von Auxin in Wurzeln von Wildtyp und *pip5k1 pip5k2*-Doppelmutanten zu visualisieren, wurden DR5::GUS-Reporter eingebracht und die entstandenen Reporterlinien auf GUS-Verteilung getestet. Die GUS-Färbung beruht auf der Expression des Enzyms β -Glucuronidase, welches ein farbloses Substrat zu einem blauen Farbstoff oxidiert. Wird das Enzym unter dem durch Auxin induzierten DR5-Promoter exprimiert, färben sich jene Gewebe blau, in denen Auxin vorliegt. Die GUS-Färbung wurde zum einen mit unbehandelten Pflanzen durchgeführt und zum anderen mit Pflanzen, die zuvor auf Medium mit den schon beschriebenen Auxinen vorinkubiert wurden. Als Auxine wurden 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (2,4-D), Indol-3-Essigsäure (IAA)

und 2-(1-Naphthyl)essigsäure (NAA) verwendet. In diesem Zusammenhang ist relevant, dass IAA und 2,4-D in der Pflanze auf den aktiven Transport in die Zelle durch Importer (z.B. AUX1) angewiesen sind, während NAA frei durch die Membran diffundieren kann (Marchant et al., 1999). Somit sollte NAA schneller an seinen Wirkort innerhalb des Gewebes kommen als die beiden anderen Auxine. In Abbildung 3.6. A sind die Ergebnisse des Experimentes für die Wildtypkeimlinge dargestellt. Die Kontrollpflanzen ohne Auxingabe zeigten eine deutliche Blaufärbung in der Wurzelspitze. Dort war das meiste Auxin und es kam zu einer hohen Transkriptionsrate des β -Glucuronidase-Gens und somit zur höchsten Umsetzung des X-Glucs. Hierfür mussten die Wurzeln für 20 h in der X-Gluc-Lösung inkubieren. Da die Auxinvergleichsproben des Wildtyps nur für 50 min gefärbt wurden, wurde auch dazu eine Kontrolle ohne Auxin angefertigt. Diese zeigte nach der kurzen Zeit jedoch noch keine Blaufärbung und ist nicht abgebildet.

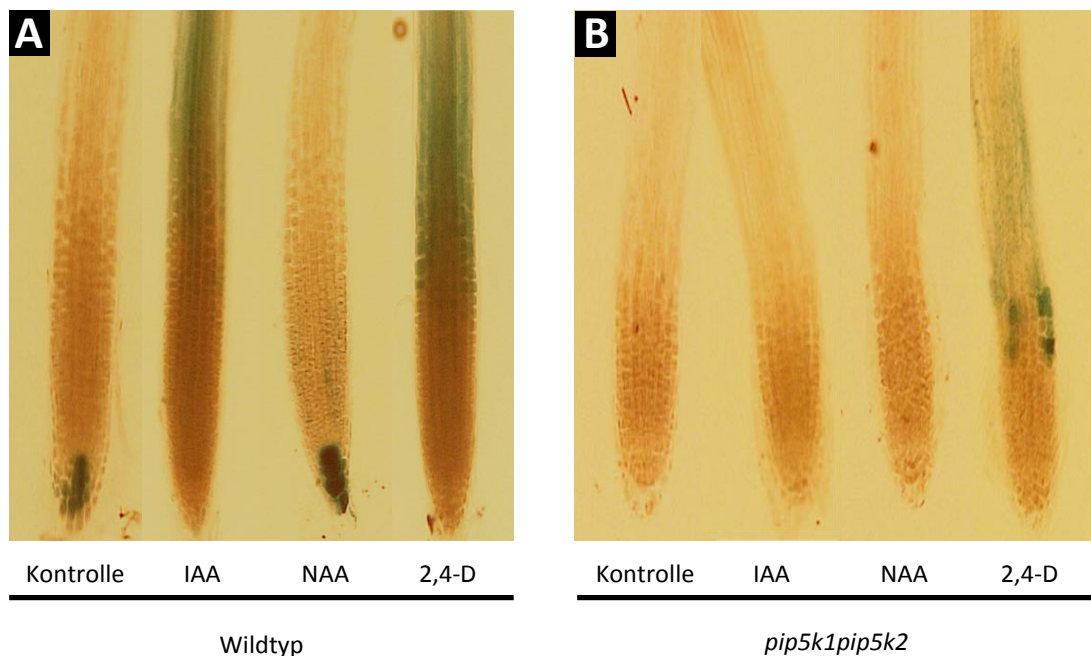


Abb. 3.6.: **Nachweis der Auxinverteilung in Wurzelspitzen des Wildtyps und der *pip5k1 pip5k2*-Doppelmutante.** GUS-Färbung von Wildtyppflanzen und *pip5k1 pip5k2*-Doppelmutanten für verschiedene Zeiten nach Inkubationen mit und ohne exogene Auxine. A zeigt Pflanzen des Wildtyps. Die Kontrolle wurde für 20 h in der GUS-Färbelösung inkubiert. Die mit Auxin behandelten Keimlinge wurden zunächst für 4 h auf MS-Medium mit den verschiedenen Auxinen umgesetzt, die Kontrolle wurde für die gleiche Zeit auf eine Platte ohne Medienzusätze gelegt. Die auxinbehandelten Proben wurden anschließend nur für 50 min in der Färbelösung belassen, da es sonst zu starker Überfärbung kam. B zeigt die Pflanzen der *pip5k1 pip5k2*-Doppelmutante. Die Kontrolle wurde ebenfalls für 20 h in der Färbelösung belassen. Für die Keimlinge, die zuvor ebenfalls 4 h auf Auxin-haltigen Medium lagen sind ebenfalls die Ergebnisse nach 20 h Inkubation in der X-Gluc-Färbelösung gezeigt. Das Experiment wurde zweimal mit vergleichbaren Ergebnissen durchgeführt.

Die für 4 h mit exogenen Auxinen behandelten Wildtypkeimlinge zeigten die in Abbildung 3.6.A dargestellten Färbemuster. Die Pflanzen wurden nur für 50 min in der X-Gluc-Lösung inkubiert, da es bei längeren Zeiten zu einer starken Überfärbung der Wurzel kam und man

Einzelgewebe kaum bis gar nicht mehr differenzieren konnte. Die Länge der Färbung wurde anhand der NAA-Probe so gewählt, bis diese ungefähr die Farbintensität der Wildtypkontrollpflanzen nach 20 h Färbung annahm. Wie schon erwähnt sind sowohl IAA als auch 2,4-D auf den aktiven Transport in die jeweiligen Zielzellen angewiesen und somit auch wieder auf den aktiven Export. Die Transportgeschwindigkeit und der Wirkort für diese beiden Auxine sind also von den Auxin-Importern und -Exportern abhängig. Das ist auch deutlich in Abbildung 3.6.A für IAA und 2,4-D zu erkennen. Beide Auxine werden langsam von oben nach unten Richtung Wurzelspitze transportiert, da sie auf die pflanzeninternen Transportrouten angewiesen sind. Im Gegensatz dazu kann NAA frei durch die Membranen diffundieren und führte wie das endogene Auxin zu einer Blaufärbung in der Wurzelspitze.

Die GUS-Färbereaktion in den *pip5k1 pip5k2*-Kontrollkeimlingen ohne Auxin führte auch nach 20 h zu keiner Blaufärbung in der Spitze der Wurzel (Abb. 3.6.B). Inkubation auf den verschiedenen Auxinen für 4 h zeigte nach 20 h in der X-Gluc-Lösung keine Färbung, obwohl es beim Wildtyp nach entsprechender Inkubation schon zu einer starken Überfärbung der Gesamtwurzel kam. Einzig 2,4-D führte zu einer Färbung von Einzelzellen der *pip5k1 pip5k2*-Doppelmutante innerhalb der Wurzel, nicht jedoch IAA, welches wie 2,4-D auf die Transportwege innerhalb der Pflanze angewiesen ist. Vergleicht man diese beiden Hormone im Wildtyp (Abb. 3.6.A), zeigte sich auch dort, dass 2,4-D eine stärkere, weiter in die Wurzelspitze reichende Blaufärbung auslöste, was dafür sprechen könnte, dass es effektiver transportiert wird als das natürliche IAA. Die mit NAA behandelten Doppelmutanten zeigten keine Blaufärbung. Eine Diffusion des Auxinanalogs frei durch die Membran scheint in der *pip5k1 pip5k2*-Doppelmutante also eventuell nur eingeschränkt möglich zu sein. Die Daten weisen darauf hin, dass der Auxin-Transport in der *pip5k1 pip5k2*-Doppelmutante gestört ist. Diese Beobachtung ist mit den bisher beschriebenen Ergebnissen konsistent und weist auf eine zentrale Funktion von PtdIns(4,5)P₂ bei der Regulation der Auxin-Verteilung in *A. thaliana* hin.

3.1.7. Wachstum der *pip5k1 pip5k2*-Doppelmutante auf verschiedenen Auxinen

Die bisherigen Ergebnisse wiesen darauf hin, dass die Auxin-Verteilung in der *pip5k1 pip5k2*-Doppelmutante verändert ist, da möglicherweise PIN-Proteine in ihrer polaren Verteilung gestört sind. Um zu untersuchen, ob der schwerwiegende Phänotyp der *pip5k1 pip5k2*-Doppelmutante auf die veränderte Auxin-Verteilung zurückzuführen ist, wurde der Einfluss verschiedener, exogen applizierter Auxine auf den Wuchs der

pip5k1 pip5k2-Doppelmutante getestet. Neben der natürlich vorkommenden Indol-3-Essigsäure (IAA), wurden auch die synthetischen Auxinanaloga 2-(1-Naphthyl)essigsäure (NAA) und 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (2,4-D). Da die Doppelmutante eine verringerte Sensitivität gegenüber gravitroper Stimulation und einen verminderten Auxintransport aufweist, sollte durch dieses Experiment getestet werden, ob exogenes Auxin einen Einfluss auf den Phänotyp der Pflanze hat. In Wildtyppflanzen ist bekannt, dass die Gabe von Auxin das Wurzelwachstum auch schon in geringen Konzentrationen inhibiert, da die Synthese von Ethylen induziert wird, welches letztendlich reduziertes Wachstum hervorruft (Hansen and Grossmann, 2000). Es wurde eine 50 nM-Konzentration jedes Auxins getestet. Dafür wurden die Pflanzen zunächst für sechs Tage angezogen und dann auf Platten mit auxinhaltigem Medium umgesetzt.

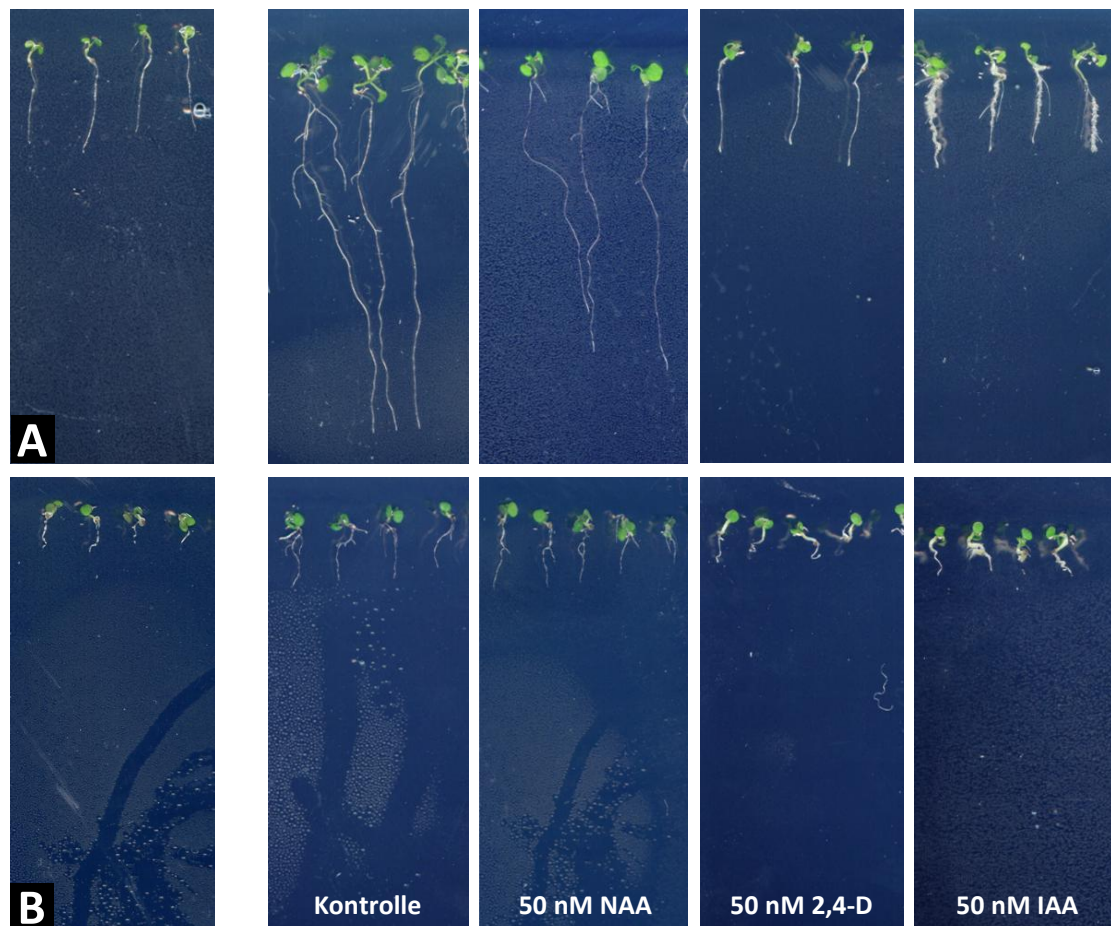


Abb. 3.7.: **Wachstum der *pip5k1 pip5k2*-Doppelmutante auf verschiedenen Auxinen.** Reihe A zeigt Wildtyppflanzen in folgender Reihenfolge: Keimlinge nach sechs Tagen auf MS-Medium im Langtag gezogen; Kontroll-Keimlinge nach weiteren sechs Tagen nach Umsetzen auf MS-Medium; Keimlinge nach sechs Tagen nach Umsetzen auf 50 nM NAA; Keimlinge nach sechs Tagen nach Umsetzen auf 50 nM 2,4-D und Keimlinge nach sechs Tagen nach Umsetzen auf MS-Medium mit 50 nM IAA. Reihe B zeigt das Parallel-Experiment mit den *pip5k1 pip5k2*-Doppelmutanten.

Wie in Abbildung 3.7.A zu sehen, wuchsen die Wurzeln der Wildtyppflanzen nach dem Umsetzen auf Kontrollmedium noch einmal um mehr als die doppelte Länge. Zudem

bildeten sich in den oberen Bereichen Seitenwurzeln. Nach der gleichen Zeit auf MS-Platten mit 50 nM NAA war das Wurzelwachstum leicht reduziert und die Ausbildung der Seitenwurzeln war auch geringer. Der wachstumsreduzierende Effekt auf die Wurzel, welcher von Auxinen ausgelöst wird, war bei NAA am schwächsten ausgeprägt. Die gleiche Konzentration an 2,4-D führte im Gegensatz zu NAA schon kurz nach dem Umsetzen der Keimlinge zu einem nahezu kompletten Stopp des Wurzelwachstums (siehe Abb. 3.7.). IAA reduzierte das Wurzelwachstum in ähnlicher Weise wie 2,4-D und führte zusätzlich zu einem vermehrten Wachstum von Wurzelhaaren (Abb. 3.7.A letztes Bild).

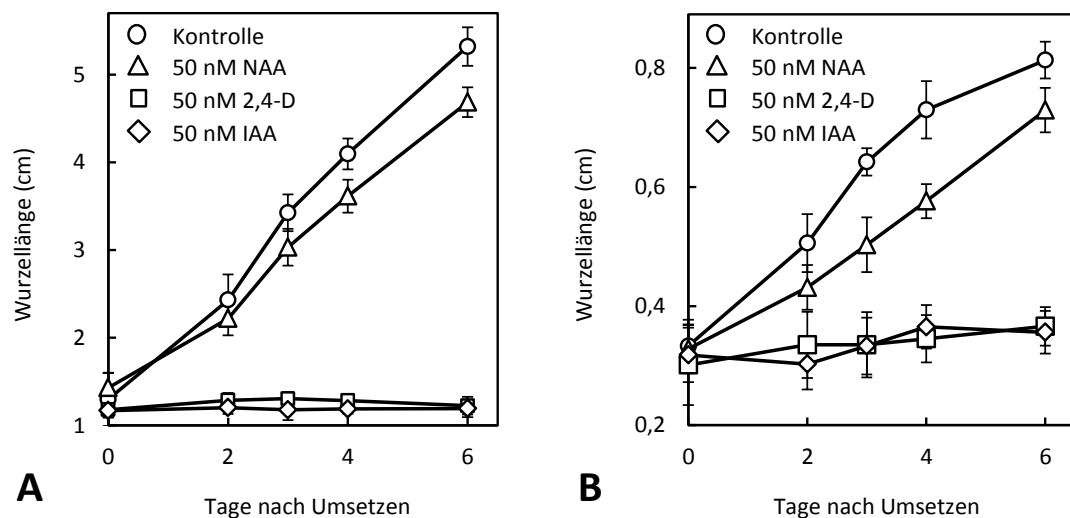


Abb. 3.8.: **Verlängerung der Wurzel der *pip5k1 pip5k2*-Doppelmutante auf verschiedenen Auxinen.** Graphische Auftragung des Wurzelwachstums von Wildtyp (A) und *pip5k1 pip5k2*-Doppelmutante (B) über mehrere Tage nach Umsetzen auf Medium mit Auxinen oder auf Kontrollplatten ohne Hormonzusatz. Sowohl der Wildtyp als auch die *pip5k1 pip5k2*-Doppelmutante zeigten nach Auxinbehandlung verringertes Wurzelwachstum. Daten stellen Mittelwerte \pm Standardfehler eines Experiments mit je zehn Keimlingen pro Konzentration und Linie dar.

Die Wurzeln der Doppelmutanten waren nach sechs Tagen Wachstum mit knapp 0,3 cm im Durchschnitt deutlich kürzer als die der Wildtypkontrollen und wuchsen in den zusätzlichen sechs Tagen nur um etwa weitere 0,4 cm (Abb. 3.8.B). Während sich die Wurzellänge beim Wildtyp um das 4-5-fache verlängerte (Abb. 3.8.A), kam es also bei der Mutante nur zu etwas mehr als einer Verdopplung der Wurzellänge. Der Zusatz von NAA wirkte sich auch bei der *pip5k1 pip5k2*-Doppelmutante am wenigsten auf das Wurzelwachstum aus (Abb. 3.7.B und Abb. 3.8.B). 2,4-D und IAA hingegen führten auch hier nahezu zu einem Stopp des Wurzelwachstums. Im Falle von IAA kam es von Tag 2 zu Tag 4 zu einer geringen Verlängerung der Wurzel und auch zu leicht erhöhtem Wurzelhaarwachstum (Abb. 3.8.B, Abb. 3.7.B). Zudem schien IAA das gravitrope Wachstum der Wurzel zu stören, da sowohl die Kontrollpflanzen der Doppelmutante und die mit NAA behandelten Wurzeln wieder nach unten wuchsen (außer bei 2,4-D, da es zu keiner Verlängerung der Wurzel innerhalb der sechs Tage kam), die Wurzeln der mit IAA behandelten Doppelmutante jedoch nicht.

Die Änderungen der Wurzellänge auf verschiedenen Auxinen (Abb. 3.8.) wiesen darauf hin, dass trotz verschiedener Wurzelelongation von Wildtyp und Doppelmutanten die verschiedenen applizierten Auxine sehr ähnlichen Einfluss auf das Wurzelwachstum hatten. Die Daten zeigen außerdem deutlich, dass exogen appliziertes Auxin das Wurzelwachstum der Doppelmutante nicht verändern kann. Der Phänotyp der *pip5k1 pip5k2*-Doppelmutante ist also wahrscheinlich nicht ausschließlich durch veränderte Auxinverteilung erklärbar. Das Experiment wurde zusätzlich mit 20 nM IAA durchgeführt (Ergebnisse siehe Anhang Abb. A.2.). Auch diese Daten zeigen, dass das Wurzelwachstum durch die Gabe des Auxins reduziert ist. Diese Reduzierung ist in den Wildtypkontrollen jedoch stärker verglichen mit der *pip5k1 pip5k2*-Doppelmutante.

3.2. Verminderte Sensitivität für Auxin in Pflanzen mit reduzierten Gehalten an InsP₆

Wie einleitend schon erwähnt, befasst sich Hypothese II mit der Relevanz von IPPs als Kofaktoren für das Auxin-Rezeptor-F-Box-Protein TIR1. Der Rezeptor TIR1, welcher neben fünf weiteren AUXIN SIGNALING F-BOX (AFB)-Proteins die auxinvermittelte Genexpression steuert, besitzt ein InsP₆ unbekannter Funktion als Kofaktor. Durch die im Folgenden beschriebenen Experimente sollte getestet werden, ob InsP₆ eine Funktion in der TIR1-vermittelten auxinabhängigen Genexpression hat. Für die Untersuchung dieser Prozesse wurde eine *A. thaliana*-Mutante ausgewählt, welche eine T-DNA-Insertion im Gen für die Inositolpolyphosphat-2-Kinase 1 (IPK1) trägt, die InsP₅ zu InsP₆ phosphoryliert. Die Gehalte an InsP₆ in den *ipk1-1*-Mutanten sind stark reduziert.

3.2.1. Verminderte gravitrope Krümmung der *ipk1-1*-Pflanzen

In einem ersten Experiment sollten die Krümmungseigenschaften der *ipk1-1*-Mutante mit denen des Wildtyps verglichen werden, um zu testen, ob das Fehlen von InsP₆ eine veränderte Antwort auf Auxin bedingt. Dazu wurden die Pflanzen wie schon für die *pip5k1 pip5k2*-Doppelmutanten beschrieben für sechs Tage im Dunkeln angezogen und für mehrere Tage um 135° gedreht. Das Fortschreiten der Krümmung wurde durch tägliches „Einscannen“ der vertikalen Anzuchtplatten dokumentiert. Die Krümmung nach 24 h wurde ausgewertet und graphisch aufgetragen (Abb. 3.9.).

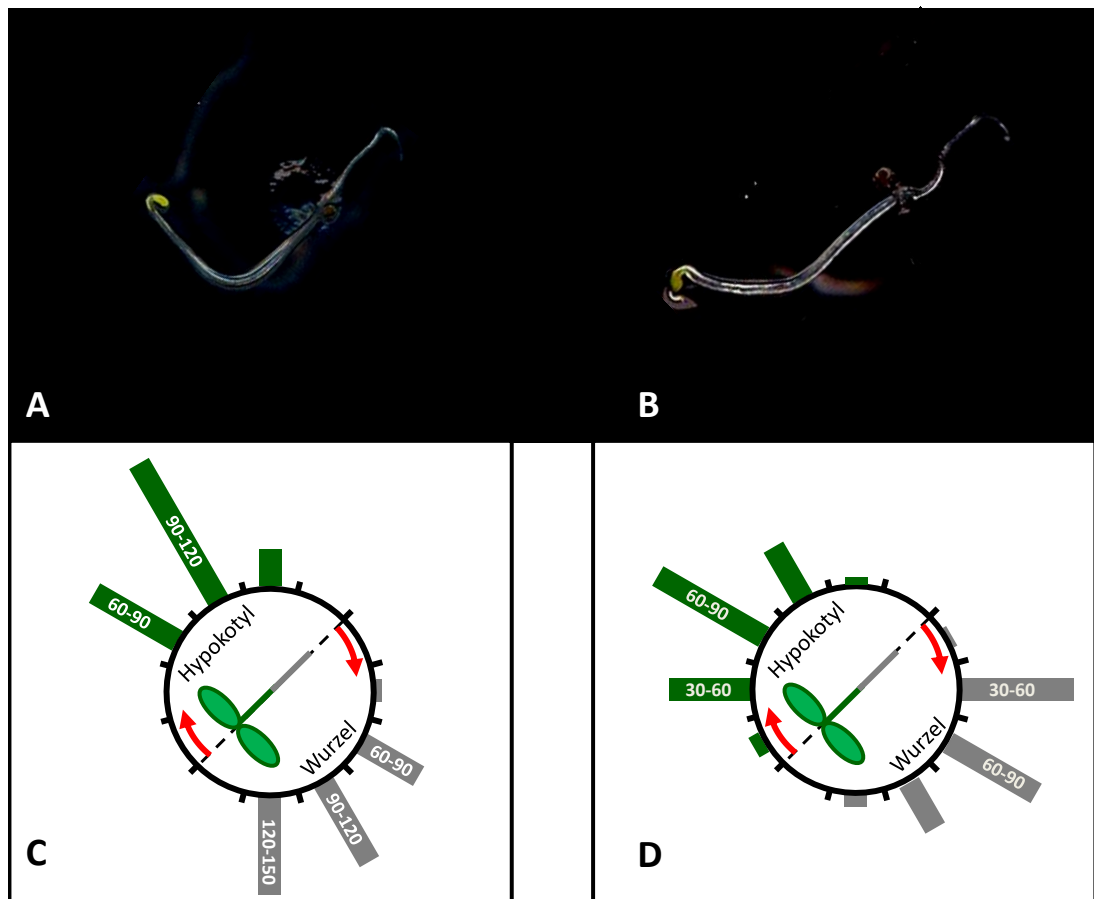


Abb. 3.9.: **Verminderte gravitrope Krümmung der *ipk1-1*-Pflanzen.** Keimlinge des Wildtyps (A) und der *ipk1-1*-Mutante (B) wurden auf ihre Krümmungseigenschaften nach 24 h gravitroper Stimulation untersucht. A und B zeigen die Keimlinge nach 24 h Drehung um 135°. C und D zeigen eine graphische Auswertung des Krümmungsexperiments für Wildtyp (C) und *ipk1-1* (D). Grüne Balken repräsentieren die gemessenen Hypokotyle, graue Balken die gemessenen Wurzeln. Die Auswertung für die Mutante ist repräsentativ für zwei Experimente, die für den Wildtyp für sechs Experimente. Pro Experiment wurden 50-60 Pflanzen beider Linien gemessen. Das Experiment wurde auch mit im Langtag gezogenen Pflanzen wiederholt und dort die Krümmung der Wurzel verfolgt (siehe Daten im Anhang Abb A.1.). Auch diese Pflanzen zeigen eine reduzierte Krümmung nach Gravistimulation.

Wie in Abbildung 3.9.A und B zu erkennen, zeigten die *ipk1-1*-Mutanten eine geringere Krümmung von Hypokotylen und Wurzeln als Wildtypkontrollen. Dies zeigten auch die nachfolgenden statistischen Auswertungen (Abb. 3.9.C und D). Obwohl die *ipk1-1*-Mutanten keinen so drastischen Phänotyp zeigten, wie die *pip5k1 pip5k2*-Doppelmutanten, sind ihre Krümmungseigenschaften nach 24 h in ähnlicher Weise reduziert. Die meisten Wurzeln der *ipk1-1*-Pflanzen zeigten Krümmungen zwischen 30-60°, während der Wildtyp nach 24 h nahezu den endgültigen Krümmungswinkel zwischen 120° und 150° erreicht hatte. Die Hypokotyle der *ipk1-1*-Pflanzen krümmten sich etwas besser im Vergleich zu der *pip5k1 pip5k2*-Doppelmutanten (Abb. 3.9.B), lagen aber dennoch nur bei Krümmungswinkeln zwischen 60°-90° (Abb. 3.9.D), während der Wildtyp meist Krümmungswinkel zwischen 90°-120° erreichte (Abb. 3.9.C).

3.2.2. Auxintransportmessung mit radioaktiv markiertem IAA

Da auch bei den *ipk1-1*-Mutanten die gravitrope Krümmungsreaktion abgeschwächt war, wurde der Auxintransport mittels radioaktiven IAA bestimmt. Die Ergebnisse des Experiments für die *ipk1-1*-Pflanzen sind in Abbildung 3.10. dargestellt. Die *ipk1-1*-Pflanzen zeigten einen signifikant verminderten Auxintransport innerhalb der Wurzel. Nach 18 h Inkubationszeit mit ^3H -IAA gelangte etwa $\frac{1}{4}$ weniger davon in der Wurzelspitze der Mutante im Vergleich zum Wildtyp. Diese Ergebnisse könnten ein Hinweis auf die Ursache für die in Abschnitt 3.2.1 beschriebene reduzierte gravitrope Krümmung nach Gravistimulation sein.

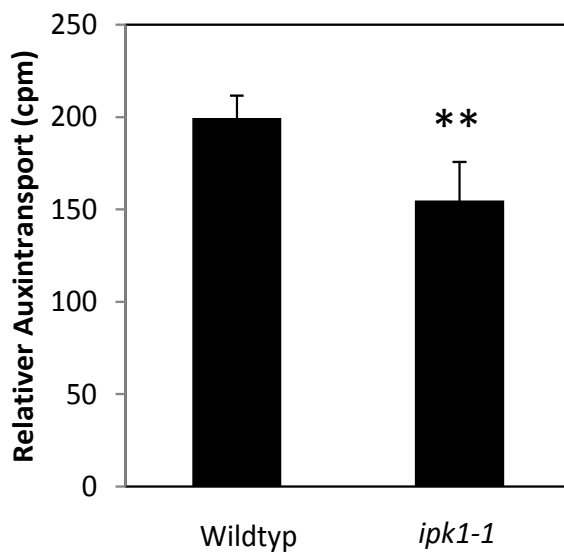


Abb. 3.10.: **Auxintransportmessung mit radioaktiv markiertem IAA.** Für die Auxintransportmessung wurden Wildtyppflanzen und *ipk1-1*-Mutanten für sechs Tage in vertikaler Orientierung angezogen und dann über Nacht mit radioaktiv markiertem Auxin behandelt. 18 h später wurde 1 cm der Wurzelspitze abgeschnitten und die Menge des dorthin transportierten ^3H -IAA mittels eines Szintillationszählers gemessen. Daten stellen Mittelwerte \pm Standardfehler von acht Einzelpflanzen je Linie eines Experimentes dar. Das Experiment wurde zweimal mit vergleichbaren Ergebnissen durchgeführt. ** = $p < 0,01$ (Student's t-test).

3.2.3. Lokalisierung verschiedener Auxintransporter in *ipk1-1*-Pflanzen

Auf Grund der reduzierten Krümmungsreaktion nach gravitroper Stimulation und des reduzierten Auxintransports wurde zunächst die Lokalisierung verschiedener Auxintransporter (PINs) in der Wurzel mikroskopisch analysiert. Dafür wurden die *ipk1-1*-Mutanten mit Pflanzen gekreuzt, die fluoreszenzmarkierte Fusionen der Auxinexporter PIN1, 2, 3, 4 und 7 exprimieren. Für einen direkten Vergleich wurde die Lokalisierungen im Wildtyp beobachtet (siehe Abb. 3.11.A-E).

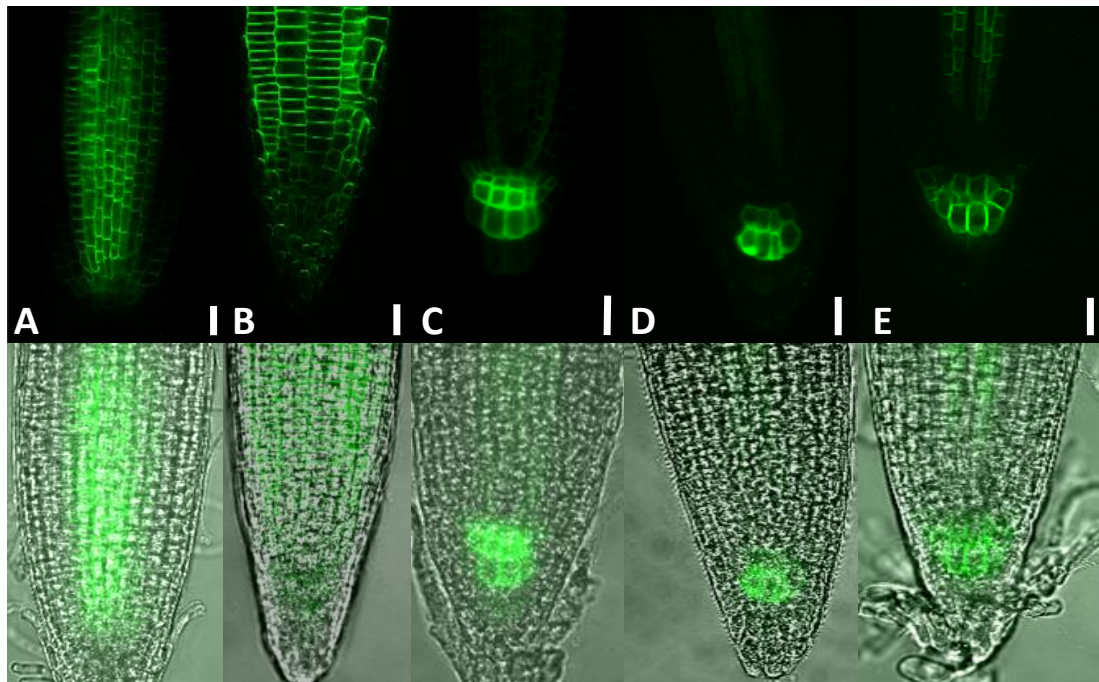


Abb. 3.11.: **Lokalisation von PIN:GFP-Proteinen in Wurzelspitzen des Wildtyps.** A zeigt die Lokalisation für PIN1:GFP in der Wurzelspitze, B für PIN2:GFP, C für PIN3:GFP, D für PIN4:GFP und E für PIN7:GFP. Der Maßstabsbalken entspricht 20 μm . Die Lokalisation der PIN-Transporter wurde in 5-10 Einzelpflanzen für jede Linie untersucht.

PIN1:GFP lokalisierte im Zentralzylinder der Wurzel an der basalen Seite der Einzelzellen (Abb. 3.11.A). Zu einem geringen Anteil lokalisierte PIN1:GFP auch in direkt benachbarten Kortezellen (Abb. 3.11.1 links). Somit erfolgt ein gerichteter Transport vom Spross Richtung Wurzelspitze. PIN2 lokalisierte hauptsächlich an der basalen Plasmamembran von Kortezellen und an der apikalen Membran der Epidermis (Abb. 3.11.B und 3.11.1.rechts).

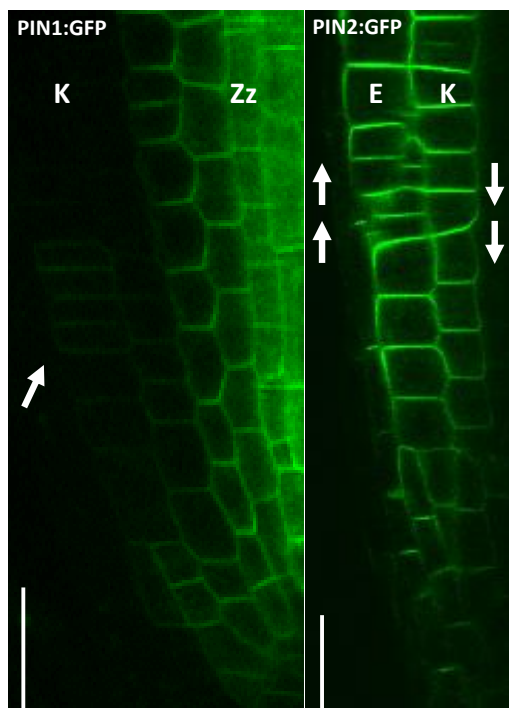


Abb. 3.11.1.: **Detailansicht der Lokalisation von PIN1:GFP und PIN2:GFP.** PIN1:GFP (links) lokalisierte nicht nur im Zentralzylinder (Zz), sondern teilweise auch im Kortexgewebe (K). Pfeil markiert Zellen. PIN2:GFP (rechts) zeigt in Epidermiszellen (E) apikale Plasmamembranlokalisierung und in Kortezellen (K) basale Plasmamembranlokalisierung. Pfeile zeigen Auxintransportrichtung an. Der Maßstabsbalken entspricht 20 μm . Verteilungsmuster entspricht der in der Literatur beschriebenen Lokalisation. n=5.

PIN3:GFP war am stärksten in den Kolumellazellen vertreten und zeigte keine Präferenz für eine bestimmte Seite der Plasmamembran. Außerdem schien PIN3:GFP im Zentralzylinder im vaskulären Gewebe vorzukommen (Abb. 3.11.C). In den Kolumellazellen nimmt PIN3 eine Verteilerfunktion ein, indem es das von PIN1 in die Wurzelspitze transportierte Auxin zu den Seiten in den Kortex verteilt. PIN4:GFP lokalisierte in den Kolumellastammzellen unterhalb des ruhenden Zentrums und zog sich leicht im Zentralzylinder in das Vaskulargewebe der Elongationszone (Abb. 3.11.D). PIN7:GFP kam hauptsächlich im provaskulären Gewebe, in den Kolumellazellen und auch in geringerer Menge im vaskulären Gewebe des Zentralzylinders in der Elongationszone der Wurzel vor (Abb. 3.11.E).

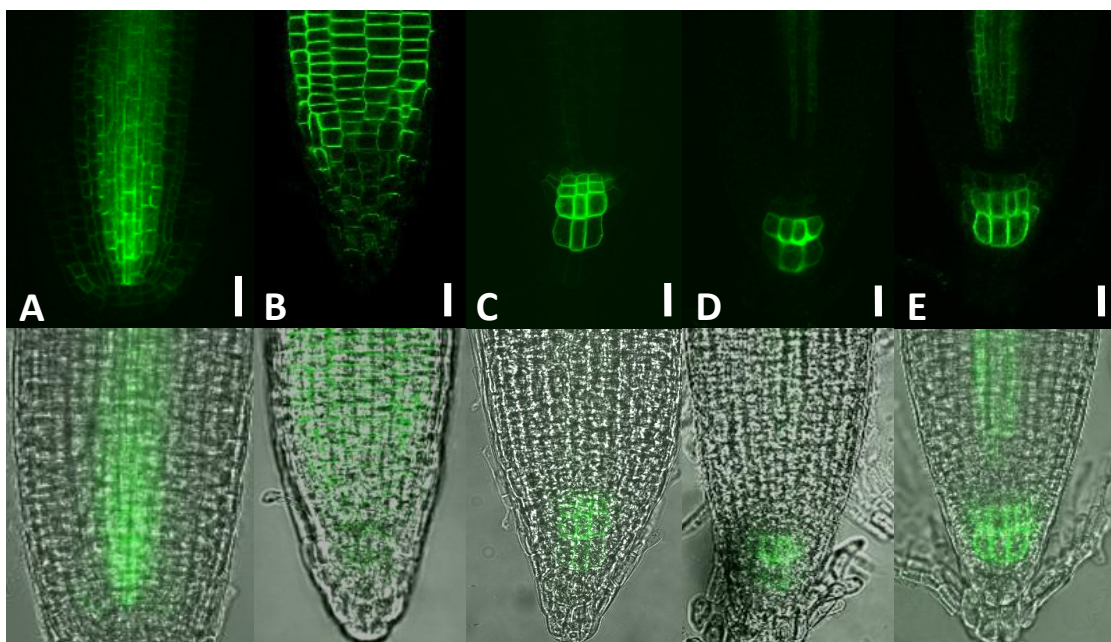


Abb. 3.12.: Lokalisation von PIN:GFP-Proteinen in Wurzelspitzen der *ipk1-1*-Mutanten. A zeigt die Lokalisation für PIN1:GFP in der Wurzelspitze, B für PIN2:GFP, C für PIN3:GFP, D für PIN4:GFP und E für PIN7:GFP. Der Maßstabsbalken entspricht 20 μ m. Die Lokalisation der PIN-Transporter wurde in 5-10 Einzelpflanzen für jede Linie untersucht.

Die Lokalisation der PIN-Proteine wurde mittels konfokaler Mikroskopie auch in den *ipk1-1*-Mutanten untersucht (Abb. 3.12.A-E), welche unter gleichen Bedingungen wie die Kontrollpflanzen angezogen wurden. Obwohl die *ipk1-1*-Pflanzen eine deutlich verminderte Reaktion auf Gravistimulation zeigten, war hinsichtlich der Lokalisation der verschiedenen PIN-Transporter kein Unterschied zum Wildtyp zu beobachten. PIN1:GFP lokalisierte im Zentralzylinder und zeigte auch auf zellulärer Ebene keine Fehllokalisierung (Abb. 3.12.A). PIN2:GFP zeigte die reguläre Lokalisation in Kortex- und Epidermiszellen (Abb. 3.12.B). PIN3, 4 und 7 verteilten sich wie im Wildtyp definiert in Zellen der Wurzelspitze und des vaskulären Gewebes der Elongationszone des unteren Wurzelbereichs (Abb. 3.12.D-E). Die

verminderte Krümmungsreaktion der *ipk1-1*-Pflanzen scheint also nicht auf eine Fehllokalisierung der plasmamembranständigen Auxinexporter zurückzuführen zu sein.

3.2.4. Unveränderte endozytische Internalisierung von PIN2-Proteinen in *ipk1-1*-Mutanten

Neben der polaren Verteilung der PIN-Proteine an der Plasmamembran wurde für PIN2:GFP die Internalisierung in BFA-Körper getestet. PIN2 wurde für diese Experimente ausgewählt, weil dieses Protein gerade für die asymmetrische Verteilung von Auxin bei der gravitropen Krümmung wichtig ist. Wildtyppflanzen und *ipk1-1*-Mutanten, die das PIN2:GFP-Konstrukt exprimieren, wurden mit BFA und mit BFA und zusätzlich Auxin behandelt. Die Pflanzen wurden vor und während jedes Experimentes mit CHX inkubiert, um die Neusynthese von PINs zu unterbinden, da diese ebenfalls in BFA-Körper gelangen und somit die Beobachtung der zwischen Membran und Endosomen wandernden PIN2-Proteine verfälschen würde. Wie in Abbildung 3.13.1.A dargestellt, führt die alleinige Gabe von BFA im Wildtyp zu einer Akkumulation von PIN2:GFP in BFA-Körpern.

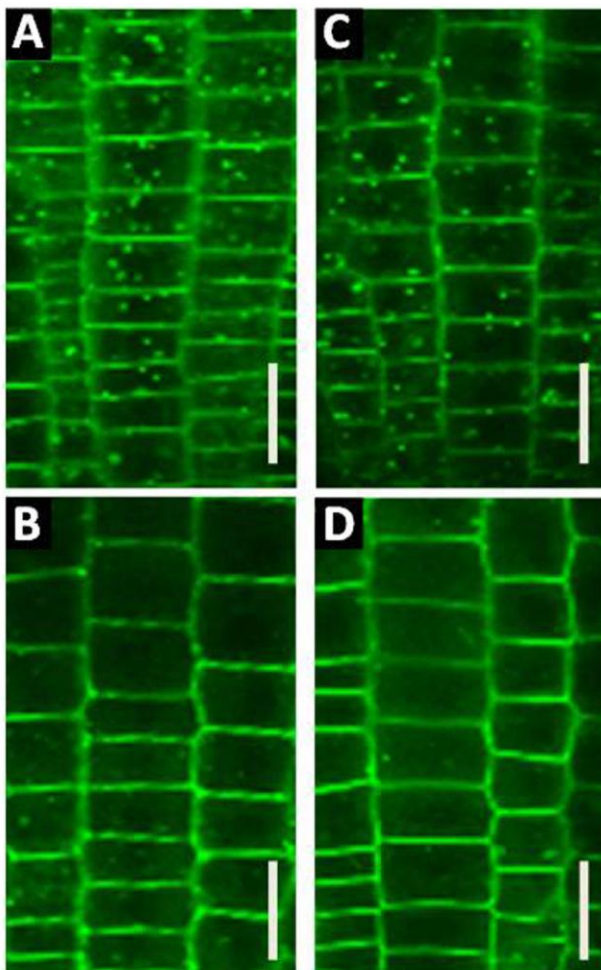


Abb. 3.13.1.: **BFA-Körperbildung im Wildtyp und der *ipk1-1*-Mutante.** Wildtyp- und *ipk1-1*-Pflanzen wurden zunächst für 1 h mit Brefeldin A inkubiert um die Internalisierung von PIN2:GFP in BFA-Körper zu untersuchen (A für Wildtyp, C für *ipk1-1*). In einem Parallelexperiment wurden Pflanzen zusätzlich zu Brefeldin A mit IAA behandelt. Dies verhindert im Normalfall über Bindung an ABP1 die Endozytose von PIN2 und somit die Akkumulation in BFA-Körper (B für Wildtyp, D für *ipk1-1*-Mutante). Der Maßstabsbalken entspricht 20 μm . Das Experiment wurde 15-mal durchgeführt.

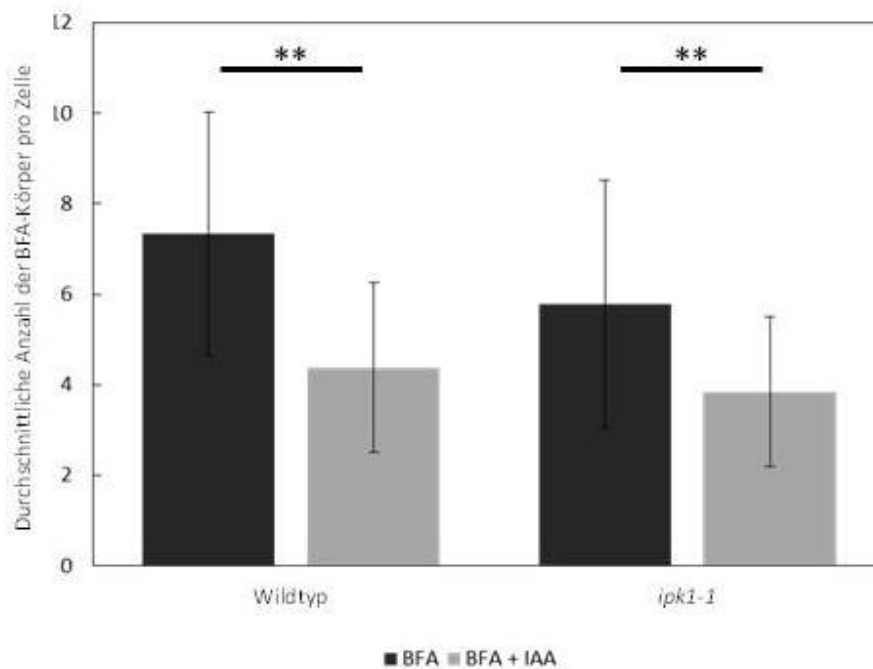


Abb. 3.13.2.: **Reduktion der BFA-Körper-Zahl nach Auxinbehandlung ist in den *ipk1-1*-Mutanten vergleichbar mit dem Wildtyp.** Die Graphik zeigt eine Auswertung der Zahl an BFA-Körpern pro Zelle. Ausgezählt wurden pro Experiment etwa 25-30 Einzelzellen pro Wurzel von jeweils drei Keimlingen. Die Auszählung wurde für zwei unabhängige Experimente mit vergleichbaren Ergebnissen durchgeführt. Mittelwerte \pm Standardfehler repräsentieren Ergebnisse eines Experiments. ** = $p < 0,01$ (Student's t-test).

Für diese Bilder wurden die Keimlinge für etwa 1 h in der BFA-Lösung belassen. Der gleiche Vorgang ließ sich auch in den *ipk1-1*-Mutanten beobachten (Abb. 3.13.1.B). Auch hier kam es zu einer starken Akkumulation von PIN2:GFP in BFA-Körpern, deren Anzahl jedoch geringer war als im Wildtyp (siehe Abb. 3.13.2). Parallel zu diesem Experiment wurden Keimlinge beider Linien in einer Lösung inkubiert, die neben BFA auch 10 μ M IAA enthielt. Exogenes Auxin verhindert ABP1-abhängig die Clathrin-Rekrutierung an die Plasmamembran und somit die Internalisierung von PIN2:GFP (Robert et al., 2010). Bei Gabe von BFA und IAA sollte es daher zu keiner Akkumulation von PIN2:GFP in BFA-Körpern kommen. Auch diese Keimlinge wurden zuvor in CHX inkubiert.

Wie in Abbildung 3.13.1.C zu sehen ist, führte die zusätzliche Gabe von Auxin zu einer deutlichen Reduktion der PIN2:GFP enthaltenden BFA-Körper (siehe auch Abb. 3.13.2). Die Keimlinge innerhalb dieses Experiments wiesen eine um etwa die Hälfte reduzierte Akkumulation von PIN2:GFP in BFA-Körpern auf. In dem parallelen Experiment mit den *ipk1-1*-Mutanten kam es ebenfalls zu einer Inhibierung der PIN2-Endozytose und zu einer vergleichbaren Anzahl an ausgezählten BFA-Körpern wie im Wildtyp. BFA führte in beiden Fällen zu einer Internalisierung von PIN2 in BFA-Körpern. In beiden Linien war es möglich, diesem Prozess durch die zusätzliche Gabe von Auxin entgegenzuwirken. Außerdem

wurden Pflanzen teilweise zusätzlich zu CHX auch mit Auxin vorbehandelt, da man sehr oft nach Gabe eines BFA/Auxin-Gemisches ebenfalls eine hohe Anzahl an BFA-Körpern erhielt, welche darauf beruhen könnte, dass bei gleichzeitiger Gabe BFA zu einer schnelleren Reaktion führt als Auxin. Dennoch ließ sich eine Bildung von BFA-Körpern trotz Vorinkubation mit Auxin auch hier nicht gänzlich unterbinden (Ergebnisse nicht gezeigt). Aus diesem Grund wurde der Versuch dann weiterhin mit einer gleichzeitigen Gabe von BFA und Auxin durchgeführt. Die Ergebnisse für die Reduktion der BFA-Körper konnten von Keimling zu Keimling auch innerhalb eines Experiments schwanken. Aus diesem Grund wurde das Experiment 15-mal wiederholt.

3.2.5. Asymmetrische Verteilung von Auxin während der Gravistimulation

Die *ipk1-1*-Mutanten zeigten sowohl eine reduzierte Krümmungsreaktion nach gravitroper Stimulation, als auch leicht reduzierten Auxintransport. Dennoch lokalisierten alle bekannten membranständigen PIN-Auxinexporter sowohl in den richtigen Geweben, als auch intrazellulär an der richtigen Membranseite. Da die Auxintransportmessung mit radioaktiven IAA (siehe Abb. 3.10.) sehr fehlerbehaftet ist, sollte ein weiteres Experiment zeigen, wie sich Auxin nach gravitroper Stimulation von *ipk1-1*-Mutanten innerhalb eines definierten Zeitraums asymmetrisch innerhalb der Wurzelspitze verteilt. Die Umverteilung von Auxin nach Änderung des Gravitationswinkels dient dazu, die Wurzel wieder in eine vertikale Orientierung zu bringen. Dafür wird der Auxinfluss an die durch die Drehung entstandene neue Unterseite der Wurzel umgeleitet. Die durch Gravistimulation induzierte Umverteilung von Auxin wurde in Wildtypkontrollen und *ipk1-1*-Pflanzen durch eingekreuzte DR5::GFP-Reporter verfolgt (Abb. 3.14.).

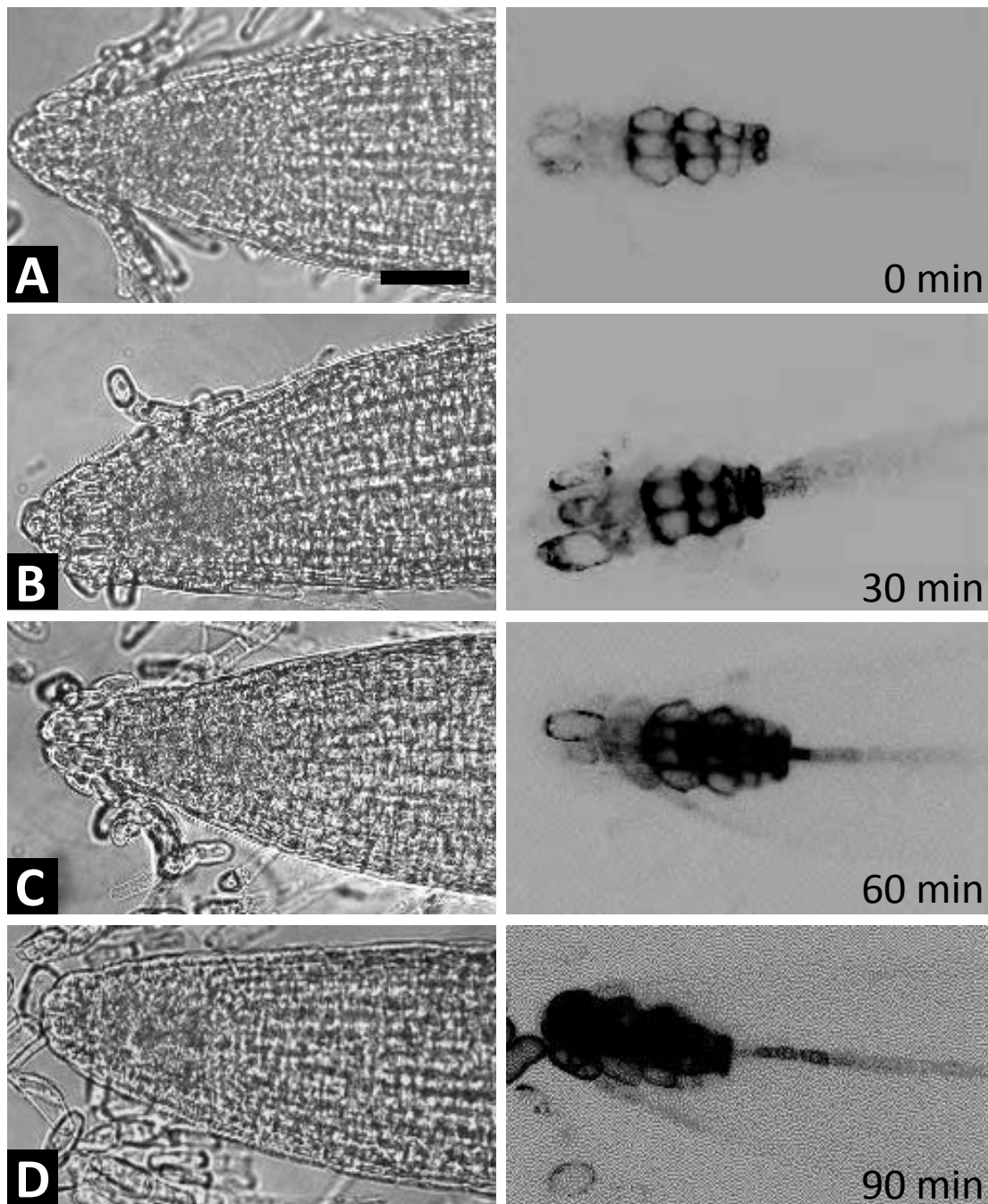


Abb. 3.14.: **Asymmetrische Verteilung von Auxin nach verschiedenen Zeiten der Gravistimulation im Wildtyp.** Die DR5::GFP exprimierenden Keimlinge wurden für sechs Tage auf vertikalen MS-Platten angezogen und anschließend um Dunkeln um 135° gedreht und anschließend mit einem konfokalen Mikroskop untersucht. A zeigt Kontrollpflanzen ohne Gravistimulation, B 30 min, C 60 min und D 90 min nach Drehung. Für jeden Zeitpunkt wurden 5-10 Pflanzen ausgewertet. Der Maßstabsbalken entspricht 20 μm . Der Kontrast wurde verstärkt, damit die Auxinverteilung besser sichtbar wird. Außerdem wurde das Bild schwarz-weiß gefärbt und die Farben invertiert, um die schwache Fluoreszenz des GFPs besser sichtbar zu machen.

Abbildung 3.14.A-D zeigt zunächst die durch den DR5::GFP-Reporter visualisierte asymmetrische Auxinverteilung für den Wildtyp. Bild A stellt dabei die Kontrolle ohne Gravistimulation (t_0) dar. Weitere getestete Zeitpunkte waren 30, 60 und 90 min nach Drehung der Keimlinge. Nach den ersten 30 min (Abb. 3.14.B) war im Wildtyp noch keine

Umverteilung des Auxins innerhalb der Wurzelspitze zu erkennen. Erste DR5-Induktion nahe der Spitze war deutlich ab 60 min zu erkennen (Abb. 3.14.C). Nach 90 min war die Umverteilung von Auxin noch immer deutlich zu erkennen (Abb. 3.13.D). Außerdem zeigten die Keimlinge schon mit dem bloßen Auge eine leichte Krümmung der Wurzelspitze.

Das gleiche Experiment wurde mit den *ipk1-1*-Mutanten durchgeführt, um zu testen ob der Prozess der Auxinumverteilung im gleichen Maße stattfindet oder zeitlich anders verläuft als im Wildtyp (Abb. 3.15.A-D). Auch hier war zu erkennen, dass es nach 30 min Gravistimulation noch zu keiner sichtbaren Umverteilung von Auxin kam (Abb. 3.15.B). Erst nach 60 min kam es zu einem leichten Anstieg der Fluoreszenz der Zellen an der Wurzelspitzenunterseite (Abb. 3.15.C). Diese nahm im Laufe der Zeit nach einer weiteren halben Stunde noch zu (Abb. 3.15.D). Zwischen Wildtyp und *ipk1-1*-Pflanzen gab es also keine zeitlichen Unterschiede im Verlauf der asymmetrischen Umverteilung von Auxin nach. Die stark verringerte gravitrope Krümmung war anhand der Daten der gezeigten Experimente nicht auf veränderte Verteilung von PIN-Proteinen oder Auxin zurückzuführen.

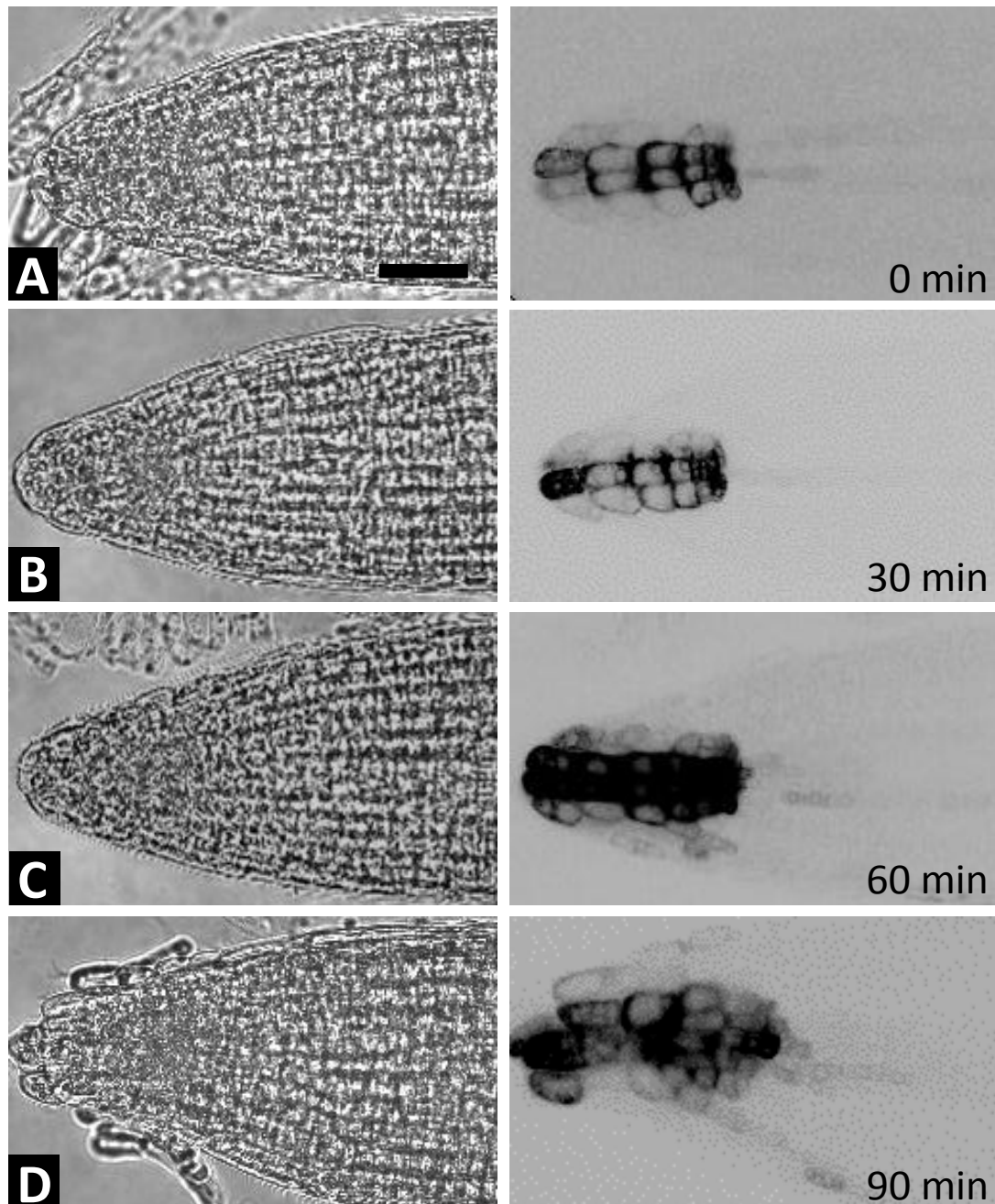


Abb. 3.15.: **Asymmetrische Verteilung von Auxin nach verschiedenen Zeiten der Gravistimulation in der *ipk1-1*-Mutante.** Die DR5::GFP exprimierenden Keimlinge wurden für sechs Tage auf vertikalen MS-Platten angezogen und anschließend um Dunkeln um 135° gedreht und anschließend mit einem konfokalen Mikroskop untersucht. A zeigt Kontrollpflanzen ohne Gravistimulation, B 30 min, C 60 min und D 90 min nach Drehung. Für jeden Zeitpunkt wurden 5-10 Pflanzen ausgewertet. Der Maßstabsbalken entspricht 20 μm . Der Kontrast wurde verstärkt, damit die Auxinverteilung besser sichtbar wird. Außerdem wurde das Bild schwarz-weiß gefärbt und die Farben invertiert, um die schwache Fluoreszenz des GFPs besser sichtbar zu machen.

3.2.6. Änderung der Genexpression nach Gravistimulation

Die *ipk1-1*-Mutanten zeigten eine verminderte Krümmungsreaktion nach Gravistimulation, jedoch keine Veränderung in der Verteilung der PIN-Transporter oder der asymmetrischen Umverteilung von Auxin nach Reorientierung der Wurzel. Daher ist davon auszugehen, dass

nicht die Verteilung, sondern die Wahrnehmung von Auxin gestört ist. Die intrazelluläre Wahrnehmung von Auxin erfolgt im Zellkern über das F-Box-Protein TIR1/AFB, welches als Untereinheit des SCF^{TIR1/AFB}-Komplexes die auxinabhängige Genexpression steuert. TIR1 besitzt ein InsP₆ als Kofaktor unbekannter Funktion. Durch ein Transkript-Array-Experiment sollte getestet werden, ob Pflanzen, die in der Synthese von InsP₆ gestört sind, andere Genexpressionsmuster zeigen als Wildtyppflanzen mit normalem InsP₆-Gehalt. Dafür wurden Keimlinge im Dunkeln für 20 min gravistimuliert und anschließend ihre Wurzelspitzen geerntet. Der frühe Zeitpunkt wurde gewählt, da die Betrachtung früh regulierter Gene, die vor der eigentlichen Krümmungsreaktion exprimiert werden, im Vordergrund stehen sollte. Für das Transkript-Array wurden drei biologische Replikate jeder Probe angefertigt, die dann auf Chips mit 43603 (Agilent 4x44K) DNA-Sonden aufgebracht wurden. Das Array-Experiment von Wildtyp- und *ipk1-1*-Pflanzen ergab Änderungen der Transkriptgehalte bei einer begrenzten Zahl von Genen. Für die Auswertung der Rohdaten wurden zunächst Gene herausgefiltert, die in mindestens zwei der drei biologischen Replikate des Wildtyps einen Anstieg des Verhältnisses der nicht induzierten (NI) (0 min Gravistimulation) und der induzierten (I) (20 min Gravistimulation) Werte von >2 ($I/NI > 2$) zeigten. Diesen wurden anschließend die gleichen Gene der *ipk1-1*-Linie gegenübergestellt. Ähnlich wurde mit herunterregulierten Genen verfahren. Hierbei war die Bedingung, dass in zwei von drei biologischen Replikaten des Wildtyps Gene die Bedingung $WT(I/NI < 0,5)$ erfüllten. Für die graphische Auftragung wurde von den Werten der Logarithmus zur Basis 2 gebildet. Für die so ermittelten hochregulierten Gene ($WT(I/NI > 2)$) ergaben sich 1047 Kandidaten, die in der Abbildung 3.16 dargestellt sind. Für die Bedingung $WT(I/NI < 0,5)$ wurden 555 Kandidaten gefunden (Abb. 3.18). Die Änderung innerhalb dieser beiden Gruppen von hoch- und runterregulierten Genen für den Wildtyp wurde als Transkriptionsänderung über Hintergrundniveau erachtet. Insgesamt machten beide Gruppen zusammen ungefähr 3,7 % des Gesamt-Arrays aus. Diese niedrige Proportion veränderter Gene hängt wahrscheinlich mit dem frühen Zeitpunkt der Probennahme zusammen. Die Gene, die im Wildtyp nach Gravistimulation über den Faktor 2 hochreguliert waren wurden den gleichen Genen der *ipk1-1*-Pflanzen gegenübergestellt (Abb 3.16). Wie zu erkennen, ist die Regulation der Gene innerhalb dieser Gruppe in beiden Linien sehr unterschiedlich, da nur wenige Gene, die im Wildtyp deutlich hochreguliert, wurden nach Gravistimulation in den *ipk1-1*-Pflanzen ebenfalls eine Expressionserhöhung zeigten. Auch für den Wildtyp zeigten sich Schwankungen innerhalb der drei Proben. So war bei Replikat 3 oftmals ein anderes Induktionsmuster zu beobachten als bei Genen der biologischen Replikate 1 oder 2 (Abb 3.16.: Spalte 3).

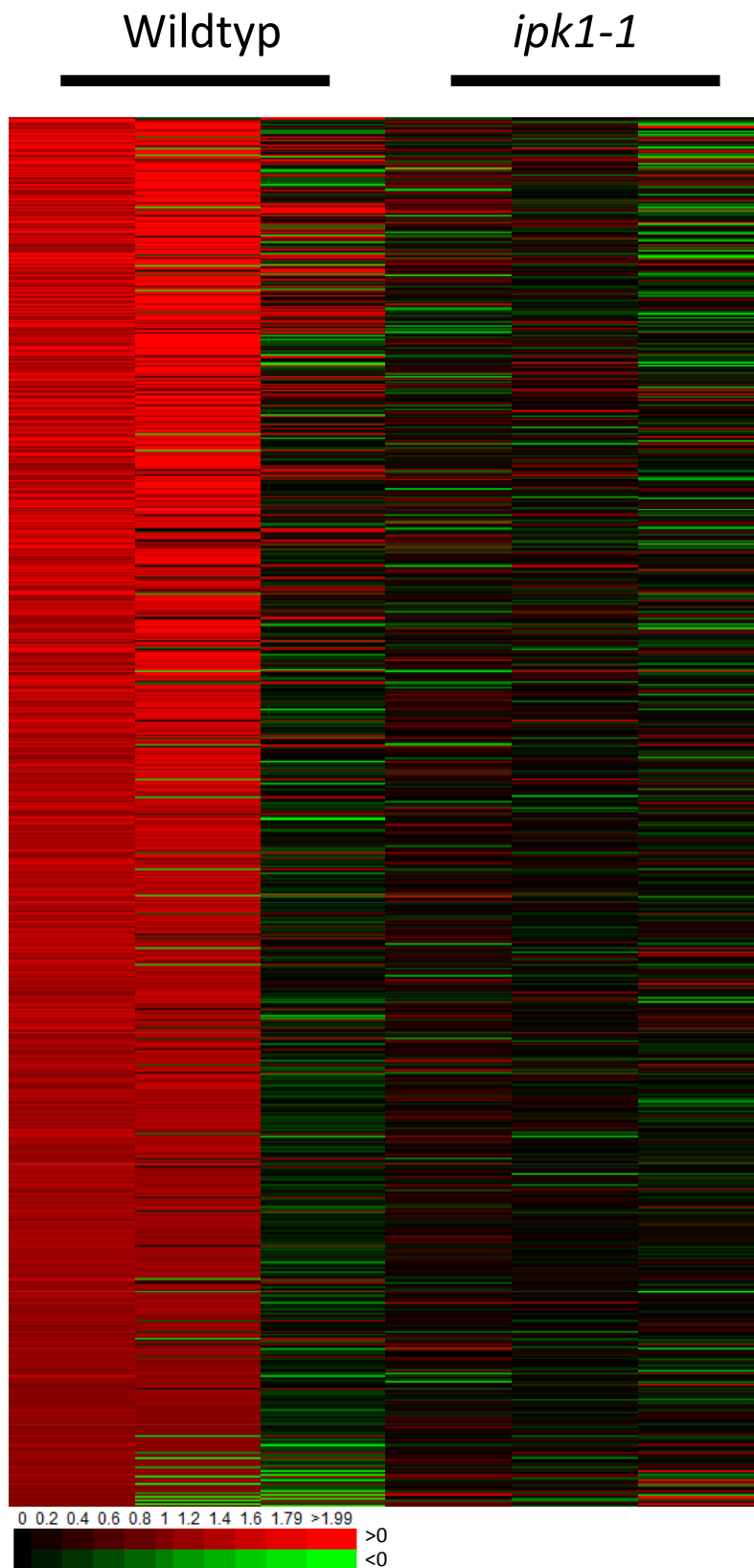


Abb. 3.16.: **Unterschiedliche Muster der Genexpression von Wildtyppflanzen und *ipk1-1*-Mutanten nach Gravistimulation.** Graphische Darstellung der Gene, die in Wildtyppflanzen nach 20 min Gravistimulation $|NI| > 2$ erreichten. Die *heatmap* repräsentiert 1047 Kandidaten des Gesamt-Arrays. Aufgetragen sind drei biologischen Replikate des Wildtyps gegen die der *ipk1-1*-Pflanzen. Jede Spalte entspricht einem biologischen Replikat der Linien (1-3 für Wildtyp, 4-6 für *ipk1-1*-Mutante). Die Abbildung wurde mit dem Programm Heatmapper Plus (http://bar.utoronto.ca/ntools/cgi-bin/ntools/heatmapper_plus.cgi) erstellt.

Aus diesem Grund wurde Replik 3 bei weiteren Analysen nicht mitbetrachtet. Die in Abb. 3.16. dargestellten Gene wurden anschließend anhand ihrer Identifikationsnummern (Atg-Nummern) annotiert und geordnet. Dazu wurde das im Internet nutzbare Programm DAVID (The Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery v6.7 (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/home.jsp>)) verwendet, das anhand der Atg-Nummern der Gene funktionale Gruppen bildet und darstellt, wie viele Gene mit ähnlicher Funktion in der Kandidatenliste vorkommen. So konnten in der in Abbildung 3.16. dargestellten Kandidatenliste einige in Auxinabhängigkeit hochregulierte Gene gefunden werden, wie z.B. IAA1 (At4g14560) oder IAA4 (At5g43700). Beide gehören zu den AUX/IAA-Repressorproteinen, die im Zuge der Ubiquitinierung durch den SCF^{TIR1/AFB}-Komplex auxinabhängig abgebaut werden, damit genexpressionsregulierende ARFs frei werden (siehe Einleitung 1.6.). Daneben fanden sich eine Reihe weiterer auxinabhängiger, bisher nicht näher charakterisierter Gene (auxin responsive proteins) oder auch Gene für verschiedene SMALL AUXIN UPREGULATED (SAUR)-Proteine (Abb 3.17.).

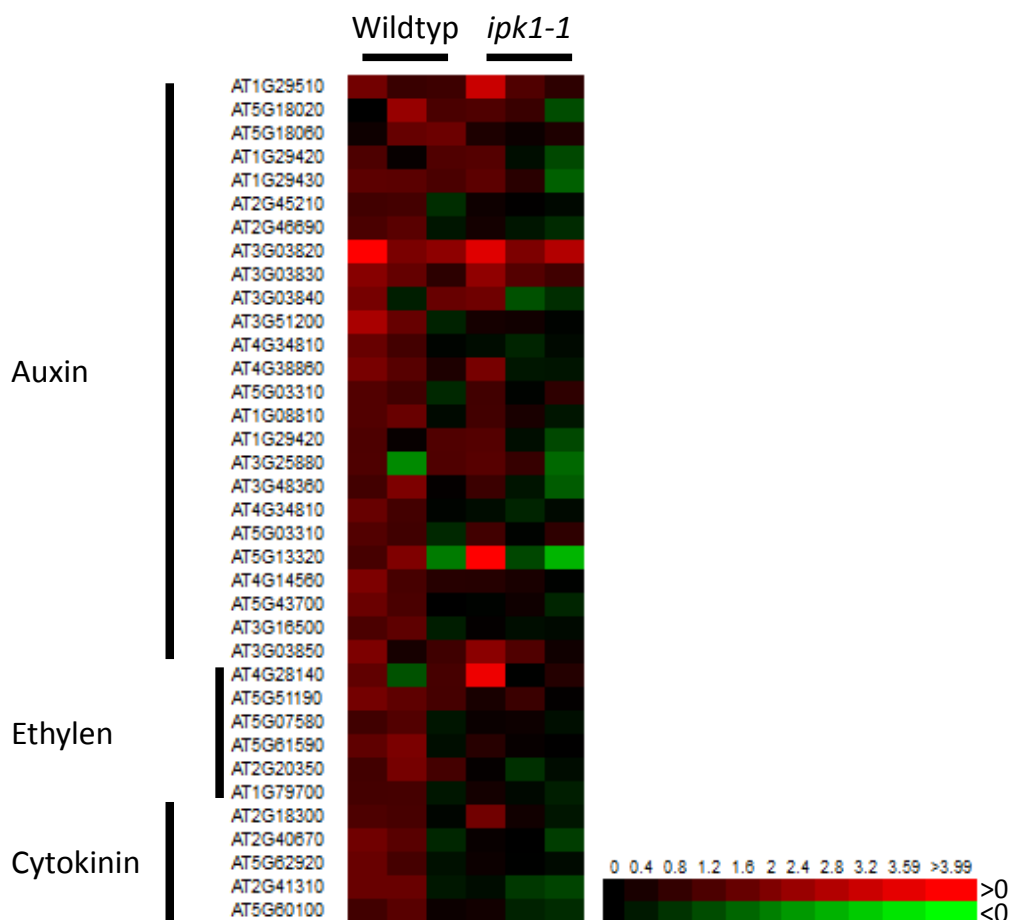


Abb. 3.17.: **Graphische Darstellung einer Auswahl Phytohormon-abhängiger Gene.** Gene waren im Wildtyp nach der Bedingung $|NI| > 2$ hochreguliert. In der *heatmap* sind drei biologische Replikate des Wildtyps gegen die der *ipk1-1*-Pflanzen aufgetragen. Jede Spalte entspricht einem biologischen Replikate der Linien. Die Abbildung wurde mit dem Programm Heatmapper Plus (http://bar.utoronto.ca/ntools/cgi-bin/ntools_heatmapper_plus.cgi) erstellt.

Zudem fanden sich auch Proteine, deren Expression durch andere Phytohormone, wie Cytokinin oder Ethylen reguliert werden in der Kandidatenliste. Diese Gene sind in Abb. 3.17. dargestellt. Da der Fokus der Arbeit auf auxinregulierten Genen in Abhängigkeit von TIR1 lag, wurden nur diese Gene in nachfolgenden Analysen betrachtet. Aus den in Abbildung 3.17. auxinregulierten Genen wurden interessante Kandidaten für ein qPCR-Experiment ausgewählt, um die Ergebnisse experimentell zu verifizieren (siehe nächster Abschnitt).

Neben den im Wildtyp hochregulierten Genen, wurden auch die herunterregulierten Kandidaten betrachtet und auf funktionale Gruppierungen untersucht. Abbildung 3.18 zeigt zunächst eine Gesamtübersicht der 555 für den Wildtyp gefundenen Kandidaten. Für eine einfachere Darstellungsweise, wurde von den Expressionswerten (I/N) zunächst der Kehrwert gebildet und die Farbskala für die *heatmap* umgedreht. Außerdem wurde von allen Werten der Logarithmus zur Basis 2 gebildet. Die Gene, die im Wildtyp deutlich herunterreguliert waren, waren in der *ipk1-1*-Mutante nur bedingt herunterreguliert oder teilweise sogar hochreguliert. Sowohl im Wildtyp als auch in den *ipk1-1*-Mutanten zeigte Replik 3 Abweichungen zu den jeweiligen biologischen Replikaten 1 und 2. Replik 3 des Wildtyps zeigte für manche Gene eine Erhöhung der Expression nach Gravistimulation, während Replik 1 und 2 eine Verringerung der Expression zeigten.

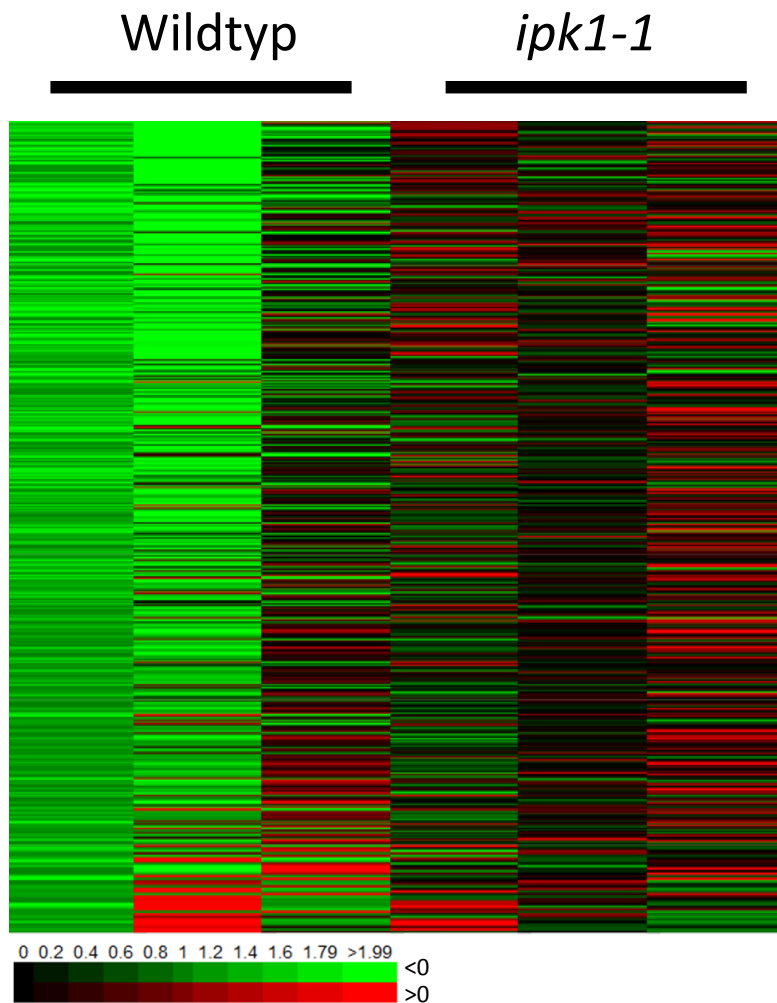


Abb.: 3.18.: **Unterschiedliche Muster der Genexpression von Wildtyppflanzen und *ipk1-1*-Mutanten nach Gravistimulation.** Graphische Darstellung der Gene, die in Wildtyppflanzen nach 20 min Gravistimulation $I/NI < 0,5$ erreichten. Die *heatmap* repräsentiert 555 Kandidaten des Gesamt-Arrays. Aufgetragen sind drei biologischen Replikate des Wildtyps gegen die der *ipk1-1*-Pflanzen. Jede Spalte entspricht einem biologischen Replikat der Linien. Die Abbildung wurde mit dem Programm Heatmapper Plus (http://bar.utoronto.ca/ntools/cgi-bin/ntools_heatmapper_plus.cgi) erstellt.

Durch die Analyse mit DAVID ergab sich eine Reihe an Kandidaten, die der Zellwandmodifikation zugeschrieben sind wie Expansin-A15 (At2g03090) oder Extensin-2 (At3g54590) und -3 (At1g21310) oder Callose Synthase 10 (At2g36850) und eine Reihe bisher nicht näher charakterisierter Kandidaten. Alle drei Expansine zeigten in der *ipk1-1*-Mutante eine erhöhte Expression nach Gravistimulation im Gegensatz zum Wildtyp (siehe Abb. 3.19.). Zudem fanden sich auch eine Reihe F-Box-Proteine, wie SKIP22 (At1g23780) oder SKIP30 (At3g63220), beides Interaktionspartner von SKP1A/ASK1 des SCF-Komplexes. Außerdem fanden sich noch verschiedene Laccasen, die auf Grund ihrer *in vitro* Aktivität der Ligninbiosynthese zugeschrieben werden. Pflanzen mit einer Mutation in AtLac15 (At5g48100) zeigen in Samen bis zu 30 % weniger Lignin im Vergleich zu Wildtypsamen. Außerdem ist das Wurzelwachstum verändert (Liang et al., 2006). Ein weiteres Gen, das im Wildtyp, aber auch in den *ipk1-1*-Mutanten eine verminderte Expression nach

Gravistimulation zeigte, ist SUPPRESSOR OF AUXIN RESISTANCE1 (SAR1) (At1g33410). SAR1 ist ein Nukleoporin, was unter anderem am nukleo-zytoplasmatischen Transport von AUX/IAA17 beteiligt ist (Parry et al., 2006). Eine Auflistung unter anderem dieser Gene ist in Abbildung 3.19. zu sehen.

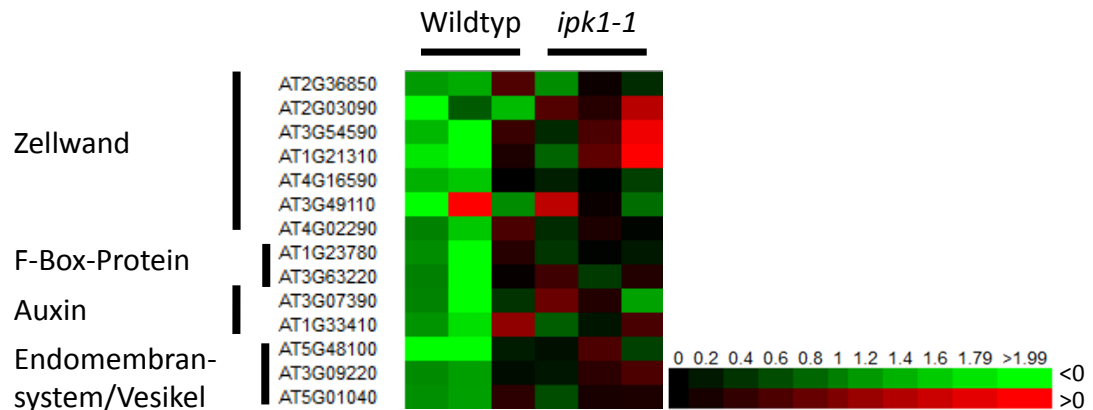


Abb. 3.19.: Auswahl einer Reihe von Genen, die im Wildtyp eine Verringerung der Genexpression zeigten. Genen des Wildtyps zeigten eine Verringerung der Expression nach der Bedingung $I/NI < 0,5$. In der *heatmap* sind drei biologische Replikate des Wildtyps gegen die der *ipk1-1*-Pflanzen aufgetragen. Jede Spalte entspricht einem biologischen Replikate der Linien. Die Abbildung wurde mit dem Programm Heatmapper Plus (http://bar.utoronto.ca/ntools/cgi-bin/ntools/heatmapper_plus.cgi) erstellt.

Die durch das Transkript-Array erhaltenen Daten zeigten ein anderes Genexpressionsmuster nach Gravistimulation für *ipk1-1*-Mutanten verglichen mit dem Wildtyp. Neben vielen auxinabhängigen Genen fanden sich auch Kandidaten, die anderen Phytohormonen wie Ethylen zuzuordnen waren. Außerdem fanden sich Expressionsunterschiede zwischen den Linien für Gene, die den Aufbau und die Flexibilität der Zellwand steuern.

Insgesamt änderte sich die Expression des Wildtyps nach Gravistimulation nur bei einem Bruchteil der Gesamtheit der Gene. Dies war allerdings auch zu erwarten, da der gesetzte Stimulus von 20 min bewusst kurz gewählt wurde, um nur die Expressionsänderungen früh regulierter Gene lange vor der eigentlichen Krümmung der Wurzel zu beobachten.

3.2.7. Verifizierung im Transkript-Array gefundener Transkriptgehalte ausgewählter Kandidatengene mittels qPCR

Für die Auswahl potentieller Kandidaten für qPCR-Analysen dienten die im vorigen Kapitel beschriebenen *heatmaps*. In erster Linie wurden Gene ausgewählt, die im Wildtyp nach 20 minütiger Gravistimulation einen Anstieg zeigten, der in den *ipk1-1*-Mutanten ausblieb, aber auch Gene, deren Expression in der Mutante, nicht aber im Wildtyp anstieg. Für die Verifizierung der graviinduzierten Transkripte wurden neue Stimulationsexperimente in

Duplikaten durchgeführt, die neben Zeitpunkten t0 und t20 noch einen weiteren, t40, enthielten. Als zu testende Kandidatengene wurden IAA1 (At4g14560), IAA4 (At5g43700), SMALL AUXIN UPREGULATED 68 (SAUR68) (At1g29510), At5g18060 (nicht näher charakterisiertes auxin responsive element) und At5g48750 (nicht näher charakterisiertes auxin responsive element) ausgewählt. Letztgenanntes Gen zeigte in den *ipk1-1*-Pflanzen eine wesentlich höhere Expression nach Gravistimulation verglichen mit dem Wildtyp und wurde aus diesem Grund ebenfalls untersucht. Abbildung 3.20. zeigt die in der qPCR erhaltenen Ergebnisse. Für das Experiment wurden die Ergebnisse zweier biologischer Replikate gemittelt. Wie in Abbildung 3.20 dargestellt, zeigten alle untersuchten Gene von Wildtyppflanzen im Vergleich mit *ipk1-1*-Mutanten unterschiedliche Expressionsmuster. Im Transkript-Array war im Wildtyp IAA1 nach Gravistimulation stärker exprimiert als in den *ipk1-1*-Pflanzen, auch wenn der Unterschied gering war (siehe Abb. 3.17.). Ein ähnliches Muster ließ sich auch bei den qPCR-Analysen beobachten (Abb. 3.20.). Beide Linien zeigten einen Anstieg in der Expression, welcher jedoch im Wildtyp sowohl nach 20 als auch nach 40 min stärker war. Für die Expression von SAUR68 war im Transkript-Array nach 20 min Gravistimulation ein leichter Anstieg zu verzeichnen, der in den *ipk1-1*-Pflanzen schwächer ausfiel. Dasselbe Muster war auch bei der qPCR zu beobachten (Abb. 3.20.). At5g18060 zeigte im Array einen deutlichen Anstieg der Expression nach Gravistimulation im Vergleich zu den *ipk1-1*-Mutanten, wo das Gen in einem Replikat sogar leicht runterreguliert zu sein schien (Abb. 3.17.). Ein ähnliches Muster konnte auch mittels qPCR beobachtet werden, wo die Expression im Wildtyp jedoch erst nach 40 min deutlich anstieg und in den *ipk1-1*-Pflanzen absank (Abb. 3.20.). Die Funktion des Gens ist unbekannt. At5g48750, welches wegen seiner starken Induktion in den *ipk1-1*-Pflanzen im Array ausgewählt wurde (Daten nicht graphisch dargestellt), zeigte auch im qPCR-Experiment einen hohen Anstieg der Expression nach Gravistimulation, während die Expression im Wildtyp sogar abnahm (Abb. 3.20.). Auch hier ist die Funktion des Genprodukts unbekannt. Für IAA4 konnte im Array ein Anstieg der Expression im Wildtyp beobachtet werden, während in den *ipk1-1*-Mutanten kaum eine Änderung auftrat (Abb. 3.17.). Dieses Muster ließ sich durch die qPCR-Analyse nicht bestätigen. Hier zeigte die *ipk1-1*-Mutante eine stärkere Expression nach Gravistimulation im Vergleich mit dem Wildtyp (Abb. 3.20.).

Die qPCR lieferte noch einmal wichtige Daten, die die Ergebnisse der Arrays bis auf die Daten für IAA4 bestätigten. Aus den bisherigen Analysen kann geschlossen werden, dass es einen Unterschied der Genexpression nach Gravistimulation zwischen InsP_6 -defizienten Pflanzen und Wildtyppflanzen gibt. Die Daten weisen darauf hin, dass die verringerte Bildung des TIR1-Kofaktors InsP_6 die Wahrnehmung von Auxin durch das F-Box-Protein

beeinflusst und sich die Expression von vielen, mit der Auxinantwort in Verbindung stehenden Genen, wie IAA1, verändert.

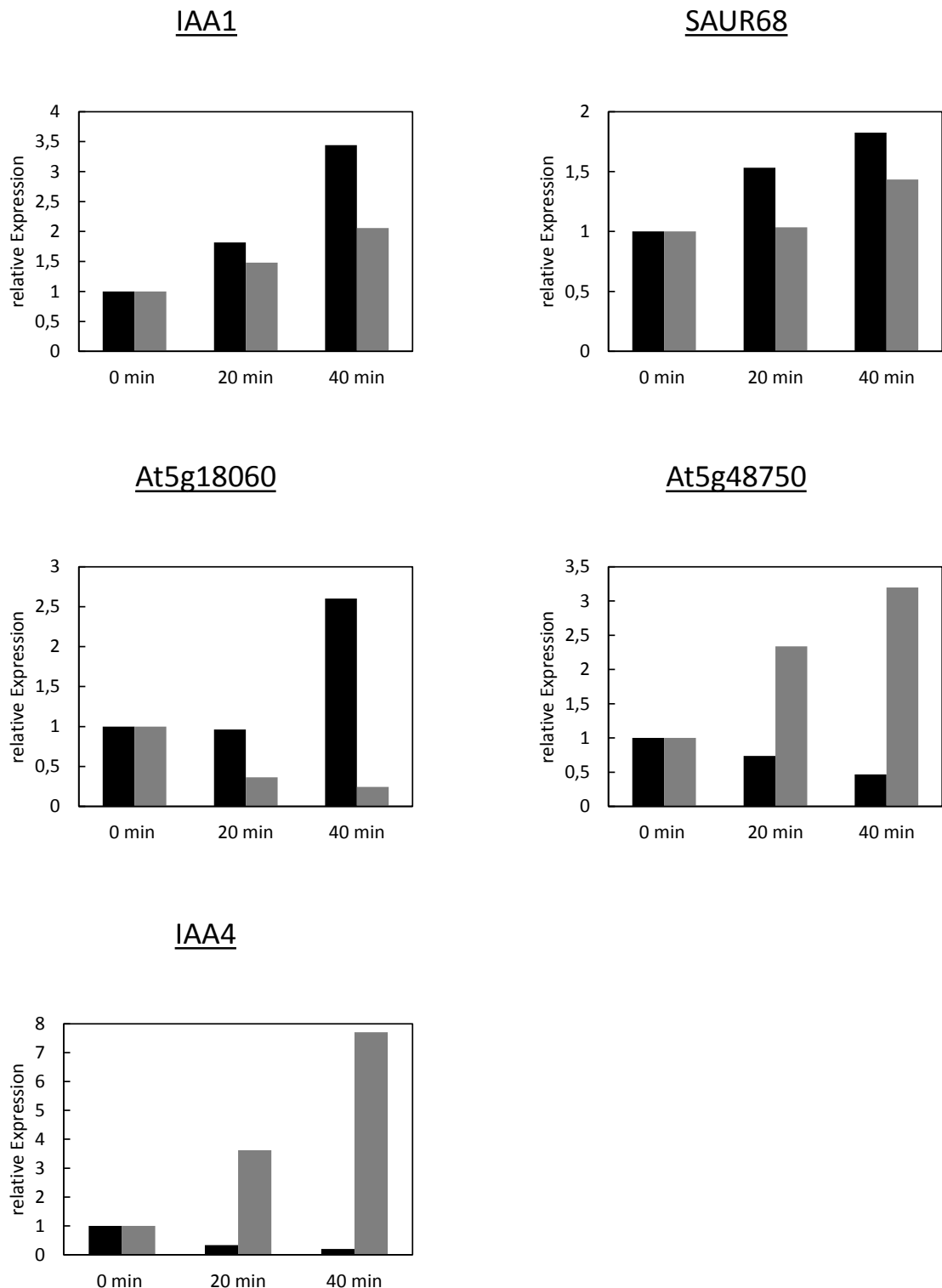
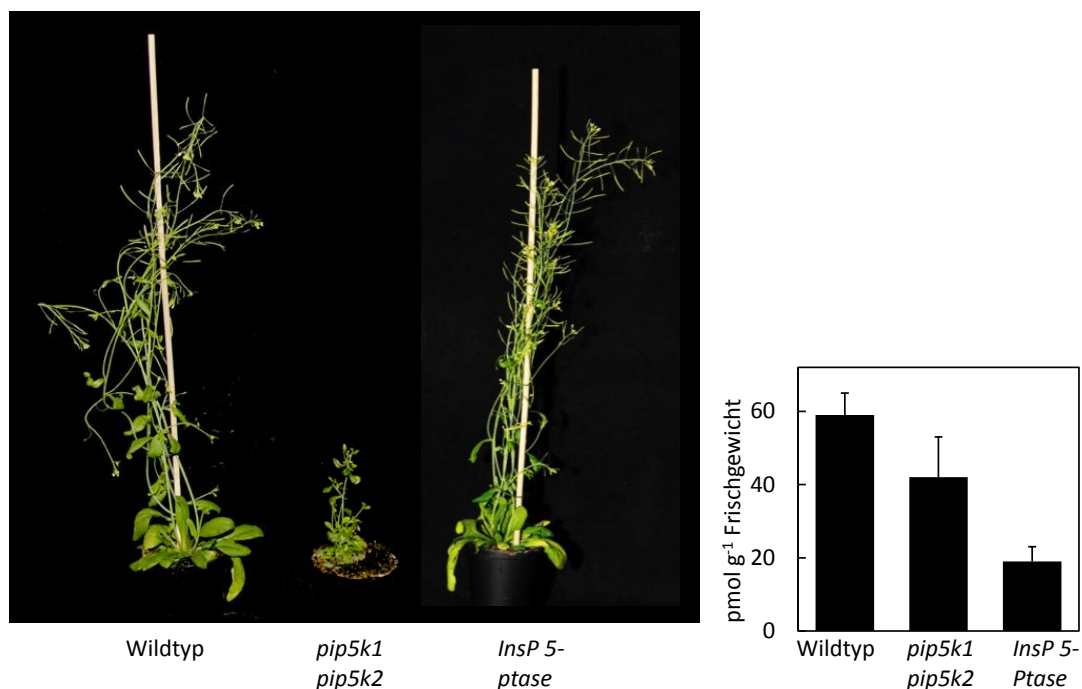


Abb. 3.20.: Verifizierung der Expressionsmuster ausgewählter Kandidatengene durch qPCR. Schwarze Balken repräsentieren die relative Expression des Wildtyps, graue die der *ipk1-1*-Mutante nach 0, 20, 40 min Gravistimulation. Die Werte für den Zeitpunkt ohne Gravistimulation wurden auf 1 gesetzt und die Werte für die anderen Zeitpunkte daran angeglichen. Die Ergebnisse repräsentieren Mittelwerte aus zwei unabhängigen Experimenten.

3.3. Komplexe Änderung im PI-Stoffwechsel und der Auxinsignalleitung in der *InsP 5-Ptase*-Pflanze

Eine weitere Pflanzenlinie, die im Rahmen dieser Arbeit behandelt wurde, ist die *InsP 5-Ptase*-Linie, welche eine menschliche Inositolpolyphosphat-5-Phosphatase des Typs I (*InsP 5-Ptase*) exprimiert, die spezifisch Inositol(1,4,5)trisphosphat (InsP_3) hydrolisiert. Durch die Expression der *InsP 5-Ptase* kommt es zu einer erhöhten Aktivität von PI4P 5-Kinasen, aber zu einer globalen Reduktion von $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ innerhalb der Pflanze, die sogar noch drastischer ist als die der *pip5k1 pip5k2*-Doppelmutante. Obwohl ihre $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ -Gehalte niedriger sind als in der Doppelmutante, zeigen *InsP 5-Ptase*-Pflanzen keinen auffälligen Phänotyp (Abb. 3.21.). Dies weist darauf hin, dass in den *InsP 5-Ptase*-Pflanzen $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ -Mikrodomänen mit physiologischer Relevanz keine verringerten $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ -Gehalte haben und nur $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ hydrolisiert wird, das seine regulatorische Funktion möglicherweise bereits ausgeübt hat. Neben $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ sind von InsP_3 abgeleitete IPPs wie InsP_4 , InsP_5 und InsP_6 ebenfalls reduziert. Mit der transgenen *InsP 5-Ptase*-Linie steht also neben den *pip5p1 pip5k2*-Doppelmutanten und den *ipk1-1*-Mutanten eine Pflanzenlinie zur Verfügung, in der nicht selektiv einzelne Schritte des PI-Stoffwechsels betroffen sind, sondern der PI-Stoffwechsel global verändert ist.



Ab. 3.21.: Darstellung des Phänotyps und der $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ -Gehalte der *InsP 5-Ptase*-Pflanzen im Vergleich mit dem Wildtyp und der *pip5k1 pip5k2*-Doppelmutante. Obwohl die Pflanzen phänotypisch dem Wildtyp gleichen, sind die Gehalte an $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ geringer als in der *pip5k1 pip5k2*-Doppelmutante. Die Daten wurden von Prof. Dr. Ingo Heilmann zur Verfügung gestellt.

3.3.1. Verminderte gravitrope Krümmung der *InsP 5-ptase*-Pflanzen

Verminderte gravitrope Krümmung der *InsP 5-Ptase*-Pflanzen wurde bereits beschrieben (Perera et al., 2006). Neben der verringerten gravitropen Krümmung zeigen *InsP 5-Ptase*-Pflanzen eine Reihe weiterer abgeschwächter Stressantworten, unter anderem verringerte Stomatabewegung und verminderte Abwehr gegen Insektenfraß. Trotz deutlich abgeschwächter gravitroper Reaktion der *InsP 5-Ptase*-Pflanzen wurde bislang keine umfassende physiologische und zellbiologische Charakterisierung auxinabhängiger Prozesse in dieser Pflanzenlinie durchgeführt und die Ursachen der Stressantworten bleiben bislang unklar. Auch mit den *InsP 5-Ptase*-Pflanzen wurden hier zunächst Krümmungsexperimente auf die gleiche Weise wie mit den anderen Pflanzenlinien durchgeführt. Auch hier (Abb. 3.22.C) ist die Krümmungsreaktion bei im Dunkeln durchgeführten Experimenten im Gegensatz zum Wildtyp reduziert (Abb. 3.22.A und B). Die graphische Auswertung der Krümmung zeigt, dass sich Wurzeln und Hypokotyle nach 24 h bei 135° nur um 60°-90° krümmten (Abb. 3.22.D), während Wildtypwurzeln in den meisten Fällen den maximalen Krümmungswinkel erreichten und sich Hypokotyle zwischen 90° und 120° krümmten. Also zeigte auch die *InsP 5-Ptase*-Linie, wie schon die anderen beiden, im PI-Stoffwechsel gestörten Pflanzenlinien eine Abschwächung ihrer Krümmungsreaktion als Antwort auf gravitrope Stimulation.

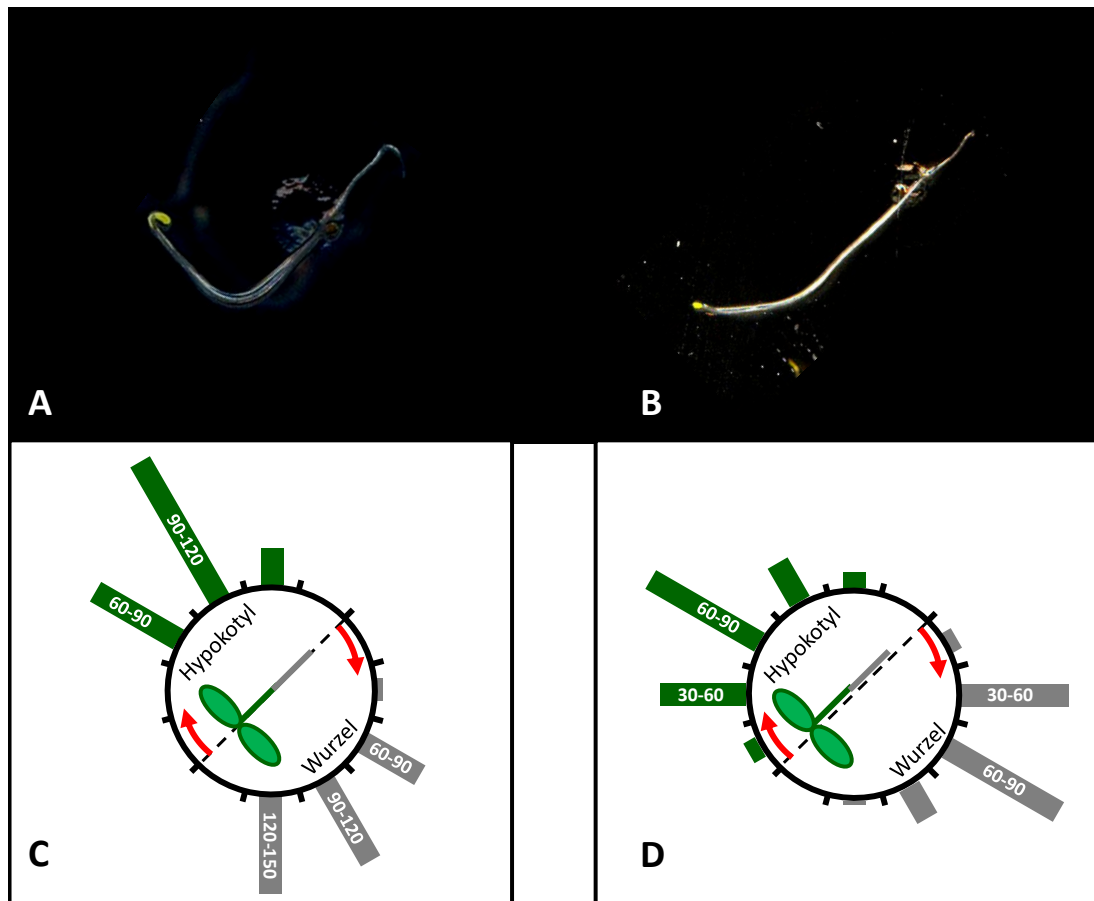


Abb. 3.22.: **Verminderte gravitrope Krümmung der *InsP 5-ptase*-Pflanzen.** Keimlinge des Wildtyps (A) und der *InsP 5-Ptase*-Pflanzen (B) wurden auf ihre Krümmungseigenschaften nach 24 h gravitroper Stimulation untersucht. A und B zeigen die Keimlinge nach 24 h Drehung um 135°. C und D zeigen eine graphische Auswertung des Krümmungsexperiments für Wildtyp (C) und *InsP 5-Ptase* (D). Grüne Balken repräsentieren die gemessenen Hypokotyle, graue Balken die gemessenen Wurzeln. Die Auswertung für die *InsP 5-Ptase*-Linie ist repräsentativ für zwei Experimente, die für den Wildtyp für sechs Experimente. Pro Experiment wurden 50-60 Pflanzen beider Linien gemessen. Das Experiment wurde auch mit im Langtag gezogenen Pflanzen wiederholt und dort die Krümmung der Wurzel verfolgt (siehe Daten im Anhang Abb A.1.). Auch diese Pflanzen zeigten eine reduzierte Krümmung nach Gravistimulation.

3.3.2. Auxintransportmessung mit radioaktiv markiertem IAA

Auch mit den *InsP 5-Ptase*-Pflanzen wurde eine Auxintransportmessung mit radioaktiv markiertem IAA durchgeführt. Diese Pflanzen zeigten in zwei unabhängigen Experimenten eine deutliche Reduktion des Auxintransports vom Spross-Wurzel-Übergang in die Wurzelspitze (Abb. 3.23.). Die Menge an radioaktiv markiertem IAA in der Wurzelspitze nach 18 h Inkubation war ebenfalls im Vergleich zum Wildtyp um etwa ein Viertel reduziert. Die Reduktion war signifikant ($p=0,0016$, Student's t-test) und es zeigte sich auch bei der Betrachtung der *InsP 5-Ptase*-Pflanze, dass ein Eingriff in den PI-Metabolismus eine Beeinträchtigung auxingesteuerter Prozesse bedingt.

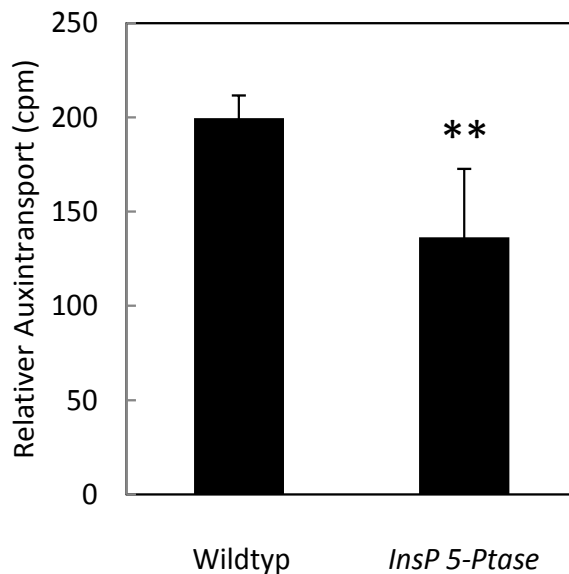


Abb. 3.23.: **Auxintransportmessung mit radioaktiv markiertem IAA.** Für die Auxintransportmessung wurden Wildtyppflanzen und *InsP 5-Ptase*-Pflanzen für sechs Tage in vertikaler Orientierung angezogen und dann über Nacht mit radioaktiv markiertem Auxin behandelt. 18 h später wurde 1 cm der Wurzelspitze abgeschnitten und die Menge des dorthin transportierten ^3H -IAA mittels eines Szintillationszählers gemessen. Daten stellen Mittelwerte \pm Standardfehler von acht Einzelpflanzen je Linie eines Experimentes dar. Das Experiment wurde zweimal mit vergleichbaren Ergebnissen durchgeführt. ** = $p < 0,01$ (Student's t-test).

3.3.3. Lokalisierung verschiedener Auxintransporter in der *InsP 5-Ptase* Pflanzen

Die *InsP 5-Ptase*-Pflanzen zeigten ähnlich den *ipk1-1*-Mutanten und den *pip5k1 pip5k2*-Doppelmutanten sowohl eine Verminderung der gravitropen Krümmung als auch eine signifikante Reduktion des Auxintransports in die Wurzelspitze. Aus diesem Grund wurde auch diese Linie auf die Lokalisation verschiedener membranständiger Auxinexportproteine getestet. Die *InsP 5-Ptase*-Pflanzen wurden dafür zunächst ebenfalls mit PIN1:GFP-, PIN2:GFP-, PIN3:GFP-, PIN4:GFP- und PIN7:GFP-exprimierenden Wildtyppflanzen gekreuzt. Da die *InsP 5-Ptase* nicht auf Homozygotie getestet werden konnte, wurden die Kreuzungen bis in die vierte Tochtergeneration selektiert, um stabile PIN:GFP-exprimierende *InsP 5-Ptase*-Pflanzen zu erhalten. Dafür wurden von der vierten Tochtergeneration zehn Pflanzen ausgesät und auf das Vorhandensein der heterologen (menschlichen) *InsP 5-Ptase*-cDNA genotypisiert. Für alle folgenden Experimente wurden nur Samen von Pflanzen verwendet, die zehn von zehn positive Ergebnisse für die Genotypisierung lieferten.

Abbildung 3.24.A-E zeigt die Lokalisierung verschiedener PIN-Transporter in Zellen der Wurzelspitze von *InsP 5-Ptase*-Pflanzen. Für PIN1:GFP ergab sich eine vergleichbare Lokalisation wie bei Wildtyppflanzen (Wildtyp siehe Abschnitt 3.2.3. Abb. 3.11.). Der Exporter lokalisierte im Gewebe des Zentralzylinders und teilweise auch noch weniger stark im Kortexgewebe der Wurzel (Abb. 3.24.A). PIN2:GFP zeigte ebenfalls eine Verteilung im

Kortex und Epidermisgewebe ähnlich dem Wildtyp (Abb. 3.24.B). Auch PIN3:GFP, welches das Auxin in der Wurzelspitze zu den Seiten an PIN2 weitergibt, lokalisierte wie in Wildtyppflanzen (Abb. 3.24.C). Ein sichtbarer Unterschied war bei PIN4 zu beobachten (Abb. 3.24.D). Im Wildtyp lokalisierte PIN4:GFP sowohl in den Kolumellastammzellen unterhalb des Ruhezentrums und ebenso im Vaskulargewebe des Zentralzylinders der Wurzelspitze (Abschnitt 3.2.3. Abb. 3.11.D). In den *InsP 5-Ptase*-Pflanzen war die gleiche Lokalisation von PIN4:GFP in den Kolumellazellen vorhanden, die Lokalisation von PIN4:GFP im Vaskulargewebe des Zentralzylinders war jedoch schwächer ausgeprägt (Abb. 3.24.D). In der Literatur wird die Lokalisierung von PIN4:GFP zum einen für das Ruhezentrum und die umgebenden Zellen als auch in Initialzellen des vaskulären Gewebes angegeben, so dass es zu einer teilweisen Überlappung der Lokalisation mit PIN1:GFP kommt (Friml et al., 2002a). Eine derartige Lokalisierung konnte im Zuge der hier durchgeführten Experimente jedoch auch für den Wildtyp (Abb. 3.11.D) nur teilweise bestätigt werden. Eine Lokalisierung von PIN4:GFP im Ruhezentrum fand sich beispielsweise in keinem der untersuchten Keimlinge.

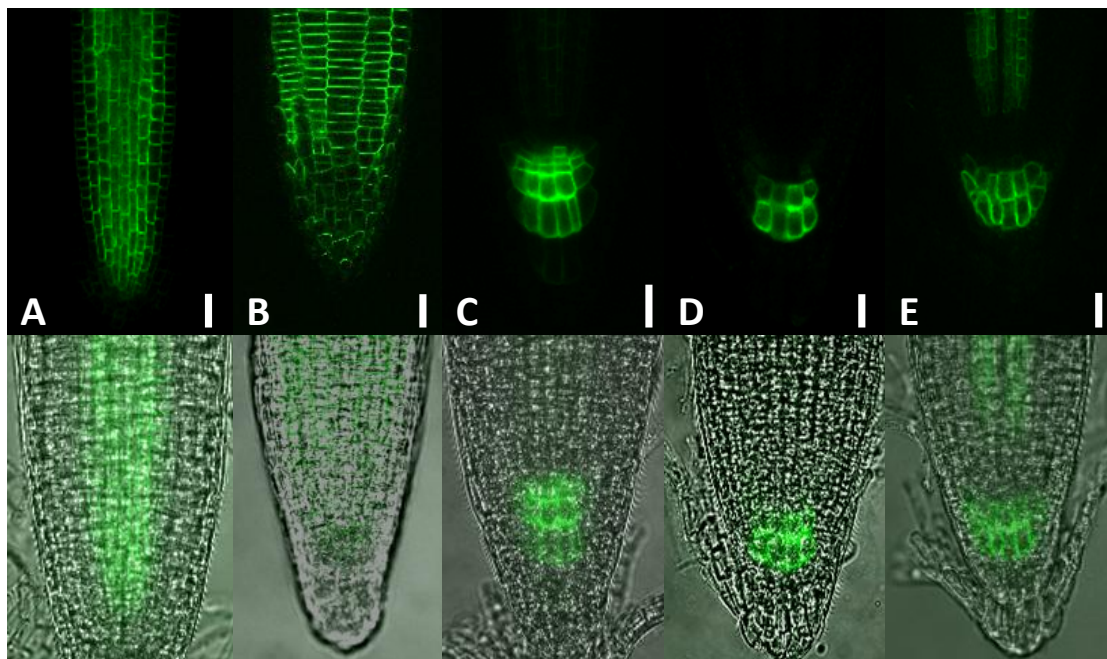


Abb. 3.24.: Lokalisation von PIN:GFP-Proteinen in Wurzelspitzen der *InsP 5-Ptase*-Pflanzen. A zeigt die Lokalisierung für PIN1:GFP in der Wurzelspitze, B für PIN2:GFP, C für PIN3:GFP, D für PIN4:GFP und E für PIN7:GFP. Der Maßstabsbalken entspricht 20 μm . Die Lokalisation der PIN-Transporter wurde in 5-10 Einzelpflanzen für jede Linie untersucht.

Die Lokalisation von PIN7:GFP in *InsP 5-Ptase*-Pflanzen zeigte keinen Unterschied zu der in Wildtyppflanzen (Abb. 3.24.E und Abb. 3.11.E). Auch in *InsP 5-Ptase*-Pflanzen fand sich PIN7:GFP hauptsächlich im provaskulären Gewebe, in den Kolumellazellen und im vaskulären Gewebe des Zentralzylinders in der Elongationszone der Wurzel.

3.3.4. **Veränderte endozytotische Internalisierung von PIN2:GFP in *InsP 5-Ptase*-Pflanzen**

Entscheidend für die Umverteilung von Auxin ist – wie bereits erwähnt – die flexible polare Umverteilung der Auxintransporter, im Besonderen von PIN2, da es das Auxin im Kortex zu den sich letztendlich krümmenden Geweben führt und so die asymmetrische Auxinverteilung bedingt. Mit PIN2:GFP-exprimierenden Pflanzen gekreuzte *InsP 5-Ptase*-Pflanzen wurden mittels BFA- und Auxin-Gabe auf ihre PIN2-Internalisierung getestet. Im Wildtyp führte Auxingabe zu einer deutlichen Reduktion der BFA-Körper in PIN2:GFP-exprimierenden Zellen (Abb. 3.25.1. A, C und 3.25.2.). Durchschnittlich lagen pro Zelle bei gleichzeitiger Behandlung mit BFA und Auxin nur etwa die Hälfte der BFA-Körper vor im Vergleich zu Proben, die nur mit BFA behandelt wurden (wie auch schon in Abschnitt 3.1.2.5 gezeigt). Nach Behandlung von *InsP 5-Ptase*-Pflanzen mit BFA sammelte sich PIN2:GFP wie in Wildtypwurzeln in BFA-Körpern (Abb. 3.25.1.C). Im Mittel waren dies jedoch weniger BFA-Körper pro Zelle als im Wildtyp. Da es bei diesem Experiment von Versuch zu Versuch auch zu Schwankungen der Anzahl der BFA-Einschlüsse kam, wurde das Experiment 15-mal wiederholt. Daraus ergab sich für die *InsP 5-Ptase*-Pflanzen eine signifikant geringere Menge an BFA-Körpern nach BFA-Behandlung verglichen mit dem Wildtyp. Wurden Wurzeln von *InsP 5-Ptase*-Pflanzen mit BFA und Auxin behandelt, ergaben sich deutlich unterschiedliche Ergebnisse zum Wildtyp, da es scheinbar nicht zu einer Inhibierung der Endozytose von PIN2:GFP kam und sich noch immer PIN2:GFP-haltige BFA-Körper bildeten (Abb. 3.25.1.D). Auxin hatte also in *InsP 5-Ptase*-Pflanzen keine oder nur eine geringe hemmende Wirkung auf die endozytotische Internalisierung von PIN2:GFP, da es zu einer schwächeren Reduktion der ausgezählten BFA-Körper im Vergleich zum Wildtyp kam und die Zahl der BFA-Einschlüsse pro Zelle etwa gleich blieb (siehe Abb. 3.25.2.).

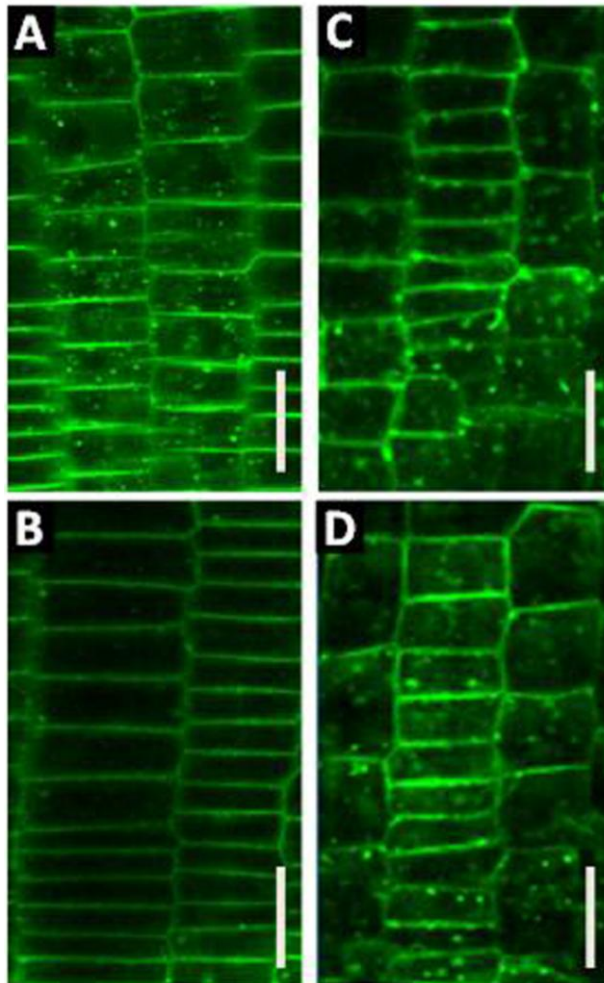


Abb. 3.25.1.: **Veränderte endozytotische Internalisierung von PIN2:GFP in *InsP 5-Ptase*-Pflanzen.** Wildtyp- und *InsP 5-Ptase*-Pflanzen wurden zunächst für eine Stunde mit Brefeldin A inkubiert um die Internalisierung von PIN2:GFP in BFA-Körper zu untersuchen (A für Wildtyp, C für *InsP 5-Ptase*-Linie). In einem Parallelexperiment wurden Pflanzen zusätzlich zu Brefeldin A mit IAA behandelt. Dies verhindert im Normalfall über Bindung an ABP1 die Endozytose von PIN2 und somit die Akkumulation in BFA-Körper (B für Wildtyp, D für *InsP 5-Ptase*-Linie). Für die *InsP 5-Ptase*-Pflanzen ist deutlich zu sehen, dass Auxin die Internalisierung von PIN2:GFP in BFA-Körper nicht verhindern kann (D). Der Maßstabsbalken entspricht 20 μm . Das Experiment wurde 15-mal durchgeführt.

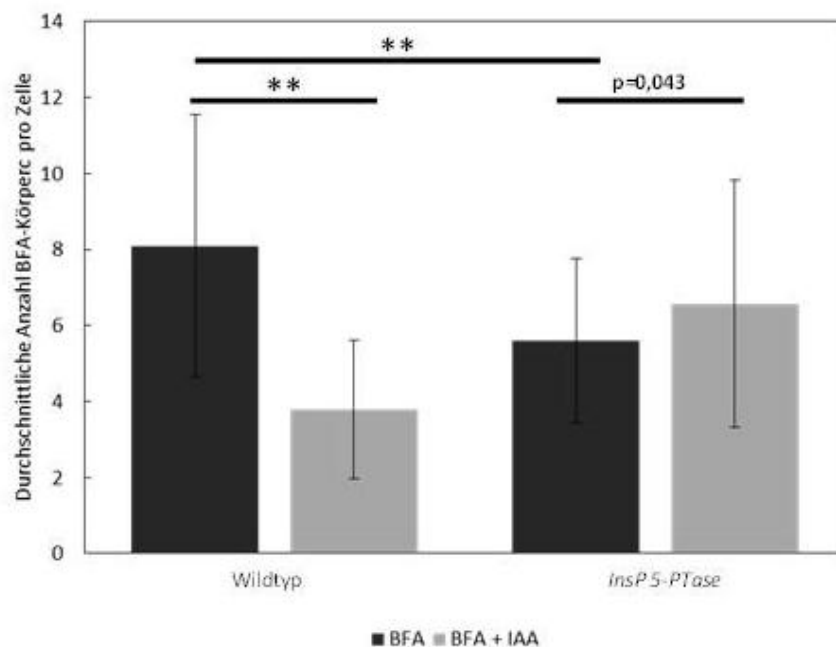


Abb. 3.25.2.: **Keine Reduktion der BFA-Körper-Zahl nach Auxinbehandlung in den *InsP 5-Ptase*-Pflanzen.** Die Graphik zeigt eine Auswertung der Menge an BFA-Körper pro Zelle. Ausgezählt wurden pro Experiment etwa 25-30 Einzelzellen pro Wurzel von jeweils drei Keimlingen. Die Auszählung wurde für zwei unabhängige Experimente mit vergleichbaren Ergebnissen durchgeführt. Die Ergebnisse zeigen Mittelwerte \pm Standardfehler eines Experiments. ** = $p < 0,01$ (Student's t-test).

Das beschriebene Experiment wurde für alle während des Projektes untersuchten Pflanzenlinien sowohl mehrmals mit einem konfokalen Mikroskop durchgeführt (nur hier ließen sich die BFA-Körper dann quantifizieren), wie auch mit einem Epifluoreszenzmikroskop. Bei den Versuchen mit dem Epifluoreszenzmikroskop wurden die beobachteten Gesamt-BFA-Körper-Aufkommen für die *InsP 5-Ptase*-Pflanzen verglichen, um einen Eindruck zu erhalten, ob und wie oft es einen optisch sichtbaren Unterschied zum Wildtyp gab. Dabei wurden zwei Kategorien gewählt, in die Wurzeln je nach BFA-Körperzahl eingeteilt wurden. Keimlinge mit keinen bis wenigen (0-5) BFA-Körpern (Kategorie: keine BFA-Körper) bei gleichzeitiger Gabe von Auxin gehörten in eine Kategorie und Keimlinge mit mittleren bis vielen (mehr als 5) BFA-Körpern (Kategorie: mit BFA-Körper) in eine weitere.

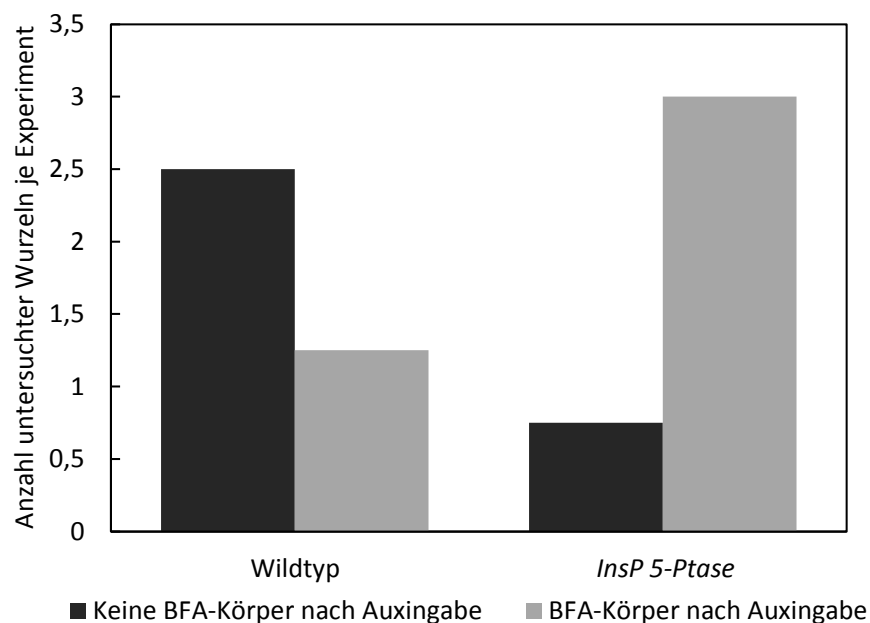


Abb. 3.26.: **Vergleich der auxininhibierenden Wirkung auf die BFA-Körperbildung in Wildtyp- und *InsP 5-Ptase*-Pflanzen.** Dargestellt sind die BFA-Körper-Vorkommen in Wildtyp- und *InsP 5-Ptase*-Pflanzen nach gleichzeitiger Gabe von BFA und Auxin. Dabei wurde gegenübergestellt, wie oft BFA-Körper in der untersuchten Anzahl von Keimlingen entstanden und wie oft nicht. Das BFA/Auxin-Experiment wurde 15-mal durchgeführt. Die Graphik soll verdeutlichen, dass in vier willkürlich ausgewählten Experimenten eine unterschiedliche Reaktion der *InsP 5-Ptase*-Pflanzen verglichen mit dem Wildtyp zu beobachten ist. Da für die Auswertung lediglich eine Einteilung getroffen wurde, ob BFA-Körper entstehen oder nicht und die genaue Anzahl der BFA-Einschlüsse keine Rolle spielte, war es nicht sinnvoll einen Standardfehler zu berechnen. Für die Auswertung wurden Werte aus vier unabhängigen Experimenten gemittelt. In jedem Experiment wurden pro Linie drei bis vier Keimlinge untersucht.

In Abbildung 3.26. wird verglichen, wie viele BFA-Körper in Wildtyp- und *InsP 5-Ptase*-Pflanzen nach Auxingabe entstehen. Dafür wurden je drei bis vier Keimlinge aus vier unabhängigen Experimenten verglichen. Für den Wildtyp zeigten im Durchschnitt drei von vier Pflanzen je Experiment keine Bildung von BFA-Körpern nach Auxingabe. Von den *InsP*

5-Ptase-Pflanzen reagierte in allen vier Experimenten lediglich eine Pflanze auf die Auxinhemmung. Beim Wildtyp reagierte durchschnittlich eine Pflanze nicht auf die Auxinbehandlung und bildete dennoch BFA-Körper. Im Gegensatz dazu reagierten im Durchschnitt drei von vier *InsP 5-Ptase*-Keimlingen pro Experiment nicht auf die Auxinbehandlung und akkumulierte PIN2:GFP dennoch in BFA-Körpern.

3.3.5. Asymmetrische Verteilung von Auxin während der Gravistimulation

Die bisherigen Ergebnisse der Analyse der *InsP 5-Ptase*-Pflanzen wiesen darauf hin, dass in *InsP 5-Ptase*-Pflanzen gravitrope Krümmung und Auxintransport ebenso wie die Endozytose von PIN-Proteinen im Vergleich zum Wildtyp verändert waren. Daher wurden im Folgenden *InsP 5-Ptase*-Pflanzen auch auf ihre Auxinverteilung nach Gravistimulation untersucht. Dafür wurden sie mit Pflanzen gekreuzt, die das DR5::GFP-Reporterkonstrukt für Auxin exprimieren. Auch diese Kreuzungen mussten für stabile Nachkommen bis in die dritte Generation selektiert werden. Diese erfolgreich gekreuzten Pflanzen wurden anschließend ebenfalls um 135° rotiert und nach den Zeitpunkten 0, 30, 60 und 90 min mikroskopiert.

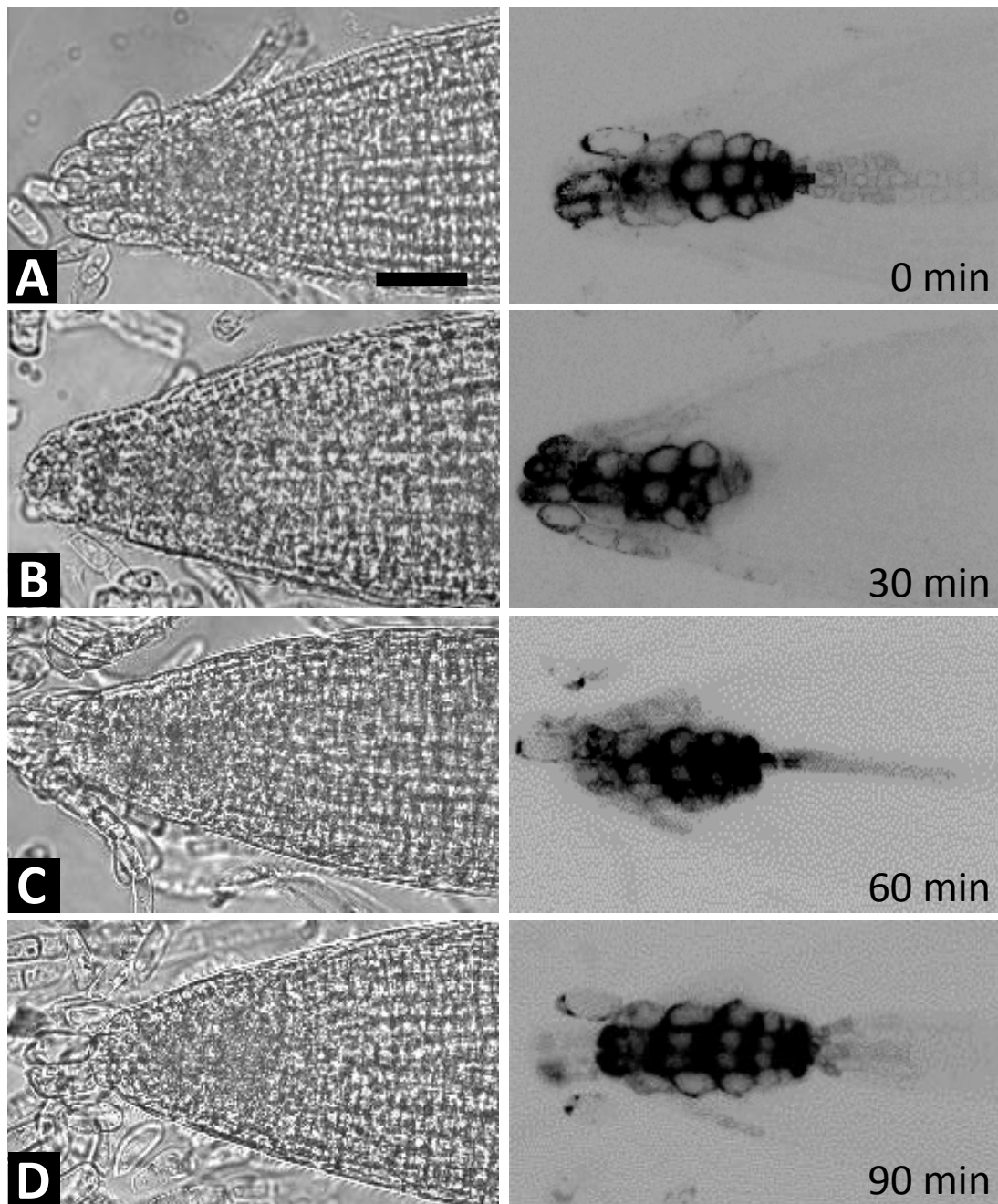


Abb. 3.27.: **Asymmetrische Verteilung von Auxin nach verschiedenen Zeiten der Gravistimulation in den *InsP 5-Ptase*-Pflanzen.** Die DR5::GFP exprimierenden Keimlinge wurden für sechs Tage auf vertikalen MS-Platten angezogen und im Dunkeln um 135° gedreht und anschließend mit einem konfokalen Mikroskop untersucht. A zeigt Kontrollpflanzen ohne Gravistimulation, B 30 min, C 60 min und D 90 min nach Drehung. Für jeden Zeitpunkt wurden 5-10 Pflanzen ausgewertet. Der Maßstabsbalken entspricht 20 μm . Der Kontrast wurde verstärkt, damit die Auxinumverteilung besser sichtbar wird. Außerdem wurde das Bild schwarz-weiß gefärbt und die Farben invertiert, um die schwache Fluoreszenz des GFPs besser sichtbar zu machen.

Wie beim Wildtyp zeigte sich die erste deutliche Auxinumverteilung nach 60 min (siehe Abschnitt 3.2.5. Abb. 3.14.C und Abb. 3.27.C). Nach 30 min war ebenfalls schon eine leichte Zunahme der Fluoreszenz an der Unterseite der Wurzel zu verzeichnen (Abb. 3.27.B). Die Mehrzahl der *InsP 5-Ptase*-Keimlinge zeigte zu diesem Zeitpunkt jedoch keine sichtbare

Umverteilung von DR5:GFP nach 30 min Gravistimulation. Somit kann davon ausgegangen werden, dass es nach 30 min in den *InsP 5-Ptase*-Pflanzen wie im Wildtyp noch zu keiner asymmetrischen Auxinverteilung kam. Ein deutliches GFP-Signal war wie im Wildtyp nach 90 min gravitroper Stimulation zu beobachten (Abb. 3.27.D). Die Daten weisen darauf hin, dass die Auxinverteilung trotz veränderter PIN-Umverteilung nicht substantiell gestört ist.

3.3.6. Änderung der Genexpression nach Gravistimulation

Die bisherigen Experimente wiesen darauf hin, dass die *InsP 5-Ptase*-Pflanzen multiple Veränderungen bei der Antwort auf auxinvermittelte Prozesse zeigten, da sowohl gravitrope Krümmung, als auch Auxintransport und die endozytotische Internalisierung von PIN2 verändert waren. Da auch die Gehalte an $InsP_6$ nachweislich reduziert sind (Perera et al., 2008), könnte die *InsP 5-Ptase*-Pflanze nicht nur in Auxinverteilungsprozessen, sondern auch in der Wahrnehmung von Auxin gestört sein. Aus diesem Grund wurden die *InsP 5-Ptase*-Pflanzen, wie die *ipk1-1*-Mutanten auf auxinabhängige Genexpression getestet und mit Genen, die im Wildtyp nach Gravistimulation hoch- oder runterreguliert wurden, verglichen. Wie in Abschnitt 3.2.6. beschrieben waren im Wildtyp 1047 Gene über einen Wert von $I/NI > 2$ hochreguliert und 555 Gene unter $I/NI < 0,5$ runterreguliert. Diesen nach Gravistimulation in ihrer Expression veränderten Gene wurden ebenfalls in gleicher Weise für die *InsP 5-Ptase*-Pflanzen ausgewertet (siehe Abb. 3.28.) Die Expressionsmuster der *InsP 5-Ptase*-Pflanzen unterschieden sich deutlich von drei Replikaten des Wildtyps. Viele Gene, die im Wildtyp nach Gravistimulation stärker exprimiert waren, zeigten in den *InsP 5-Ptase*-Pflanzen keine Induktion oder waren sogar vermindert exprimiert. Auch innerhalb der drei biologischen Replikate der *InsP 5-Ptase*-Pflanzen gab es deutliche Unterschiede. So zeigte Replikat 1 (Abb. 3.28. Spalte 4) Expressionsmuster mit deutlich mehr hochregulierten Genen als Replikat 2 (Spalte 5) und 3 (Spalte 6), welche recht ähnliche Expressionsmuster zeigten. Wegen ihrer internen Konsistenz schienen die Daten von Replikat 2 und 3 glaubhafter.

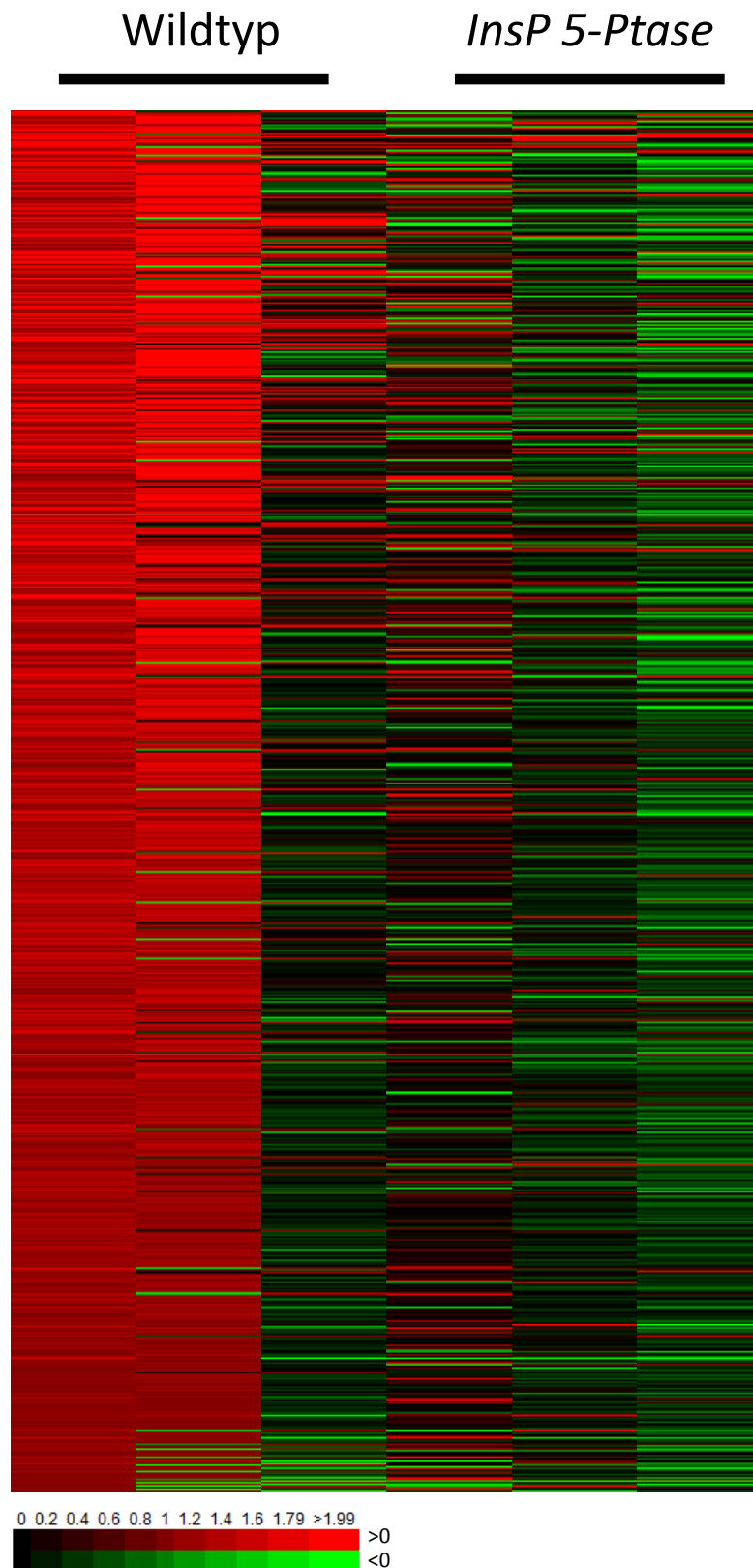


Abb. 3.28.: **Unterschiedliche Muster der Genexpression von Wildtyppflanzen und *InsP 5-Ptase*-Pflanzen nach Gravistimulation.** Graphische Darstellung der Gene, die in Wildtyppflanzen nach 20 min Gravistimulation $I/NI > 2$ erreichten. Die *heatmap* repräsentiert 1047 Kandidaten des Gesamt-Arrays. Aufgetragen sind drei biologische Replikate des Wildtyps gegen die der *InsP 5-Ptase*-Pflanzen. Jede Spalte entspricht einem biologischen Replikate der Linien (1-3 für Wildtyp, 4-6 für *InsP 5-Ptase*). Die Abbildung wurde mit dem Programm Heatmapper Plus (http://bar.utoronto.ca/ntools/cgi-bin/ntools_heatmapper_plus.cgi) erstellt.

Die Betrachtung interessanter Kandidaten, die im Wildtyp nach Gravistimulation hochreguliert waren, zeigte für auxin- oder durch andere Phytohormone induzierte Gene in den *InsP 5-Ptase*-Pflanzen ein vom Wildtyp unterschiedliches Muster (Abb. 3.29.).

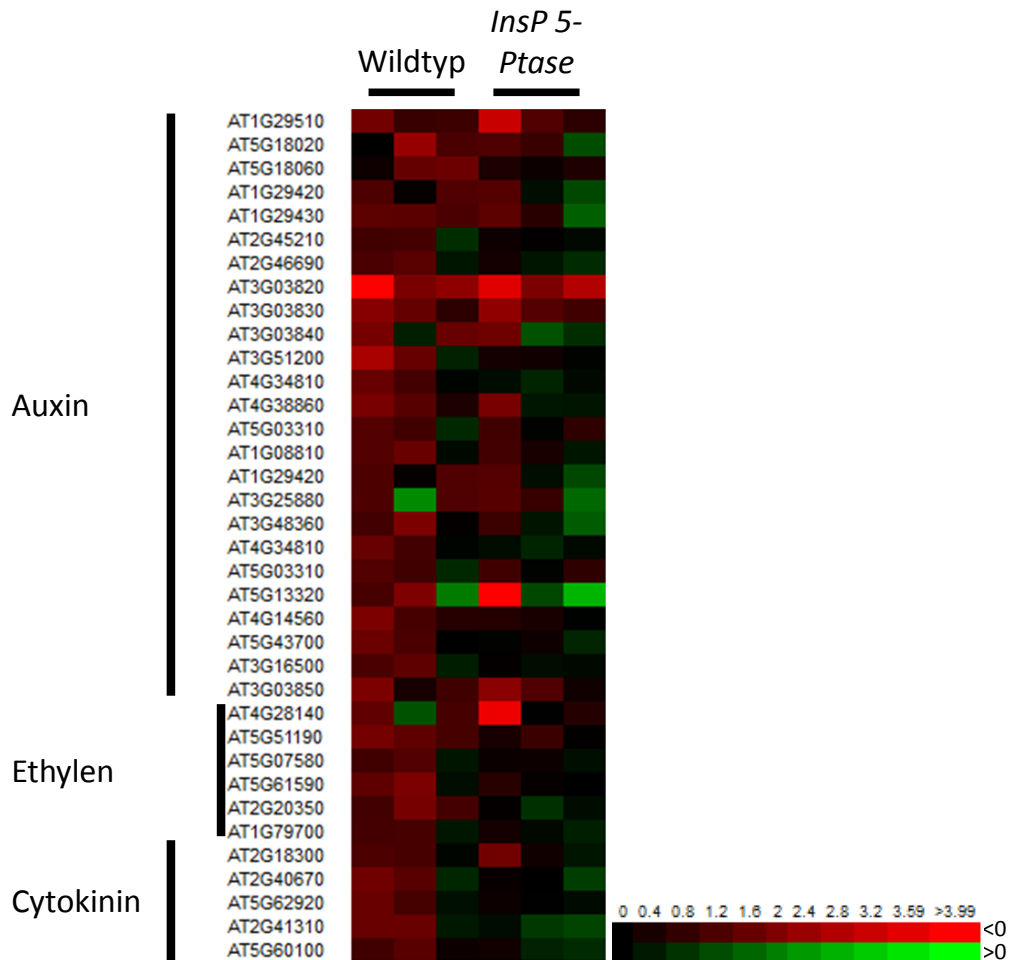


Abb. 3.29.: **Graphische Darstellung einer Auswahl Phytohormon-abhängiger Gene.** Gene waren im Wildtyp nach der Bedingung $I/NI > 2$ hochreguliert. In der *heatmap* sind drei biologische Replikate des Wildtyps gegen die der *InsP 5-Ptase*-Pflanzen aufgetragen. Jede Spalte entspricht einem biologischen Replikate der Linien (1-3 für Wildtyp, 4-6 für *InsP 5-Ptase*). Die Abbildung wurde mit dem Programm Heatmapper Plus (http://bar.utoronto.ca/ntools/cgi-bin/ntools_heatmapper_plus.cgi) erstellt.

Wie in den *ipk1-1*-Mutanten zeigten auch IAA1 (At4g14560) und IAA4 (At5g43700) in den *InsP 5-Ptase*-Pflanzen eine verminderte Expression nach Gravistimulation im Vergleich zum Wildtyp. Aber auch At2g45210, At3g51200 und At4g34810, die für SAUR-like auxin-responsive proteins kodieren, zeigten erhöhte Expression im Wildtyp und keine bis niedrigere Expressionsänderungen in *InsP 5-Ptase*-Pflanzen. Diese Daten weisen darauf hin, dass die globale Reduktion von PIs und mehrerer IPPs bis hin zu $InsP_6$ Einfluss auf die nach Gravistimulation folgenden Genexpression in der Wurzel haben können. Im Folgenden wurden auch Gene betrachtet, die nach Gravistimulation im Wildtyp verringerte Expression zeigten (Abb. 3.30.).

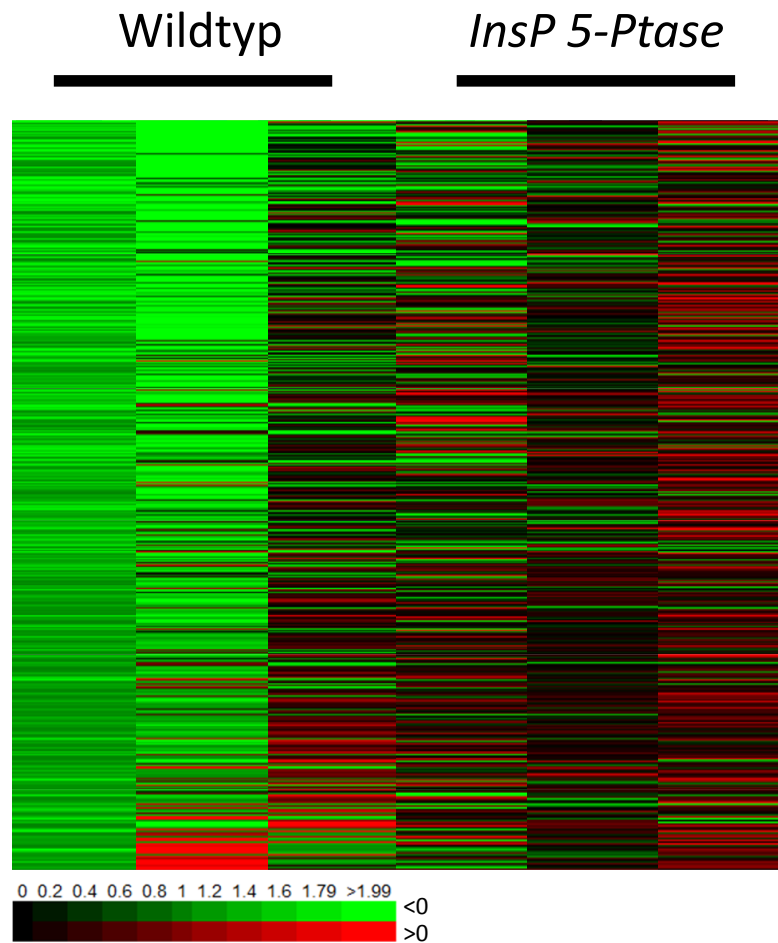


Abb.: 3.30.: **Unterschiedliche Muster der Genexpression von Wildtyppflanzen und *InsP 5-Ptase*-Pflanzen nach Gravistimulation.** Graphische Darstellung der Gene, die in Wildtyppflanzen nach 20 min Gravistimulation $I/NI < 0,5$ erreichten. Die *heatmap* repräsentiert 555 Kandidaten des Gesamt-Arrays. Aufgetragen sind drei biologische Replikate des Wildtyps gegen die der *InsP 5-Ptase*-Pflanzen. Jede Spalte entspricht einem biologischen Replikate der Linien (1-3 für Wildtyp, 4-6 für *InsP 5-Ptase*). Die Abbildung wurde mit dem Programm Heatmapper Plus (http://bar.utoronto.ca/ntools/cgi-bin/ntools_heatmapper_plus.cgi) erstellt.

Die Muster im Wildtyp nach Gravistimulation runterregulierter Gene wich deutlich von denen der *InsP 5-Ptase*-Pflanzen ab. Viele Gene zeigten in den *InsP 5-Ptase*-Pflanzen sogar einen Expressionsanstieg. Auch hier gab es Unterschiede zwischen den einzelnen biologischen Replikaten für die *InsP 5-Ptase*-Pflanzen. Replikate 3 (Abb. 3.30., Spalte 6) zeigte deutlich mehr hochregulierte Gene als Replikate 1 (Spalte 4) und Replikate 2 (Spalte 5). Dennoch zeigte die *InsP 5-Ptase*-Pflanze im Mittel für die meisten im Wildtyp runterregulierten Gene keine vergleichbare Änderung oder sogar höhere Genexpression. In Abbildung 3.31. sind den schon in Kapitel 3.2.6 beschriebenen, im Wildtyp runterregulierten Beispielgenen Expressionsdaten der *InsP 5-Ptase*-Pflanzen nach Gravistimulation gegenüber gestellt.

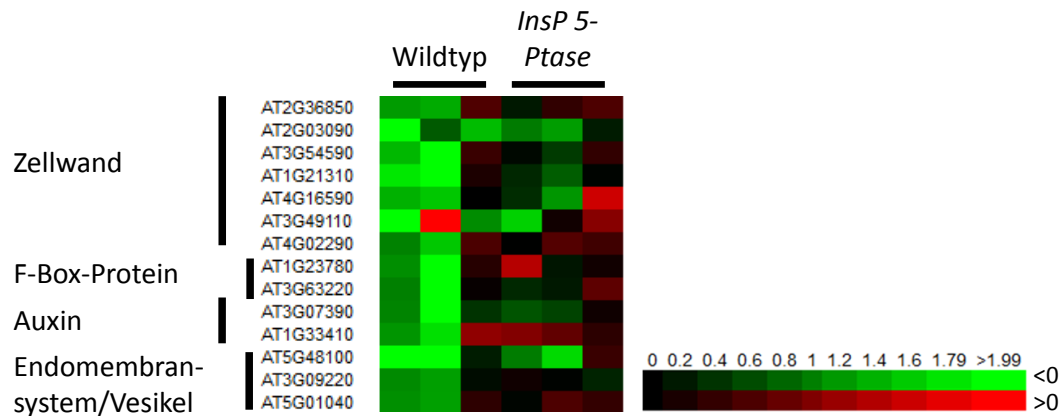


Abb. 3.31.: **Auswahl einer Reihe von Genen, die im Wildtyp eine Verringerung der Genexpression zeigten.** Genen des Wildtyps zeigten eine Verringerung der Expression nach der Bedingung I/NI<0,5. In der „heatmap“ sind drei biologische Replikate des Wildtyps gegen die der *InsP 5-Ptase*-Pflanzen aufgetragen. Jede Spalte entspricht einem biologischen Replikat der Linien. Die Abbildung wurde mit dem Programm Heatmapper Plus (http://bar.utoronto.ca/ntools/cgi-bin/ntools_heatmapper_plus.cgi) erstellt.

Die *InsP 5-Ptase*-Pflanzen zeigten in einigen Fällen deutliche Unterschiede in der Expression der in Abbildung 3.30. dargestellten Gene. Die Expression der beiden F-Box-Proteine SKIP 22 und 30 (At1g23780 und At3g63220) war im Vergleich zum Wildtyp nicht runter- sondern hochreguliert. Ein ähnliches Muster war für SAR1 (At1g33410) zu beobachten.

Somit zeigte das Transkript-Array für die *InsP 5-Ptase*-Pflanzen, dass eine Reduktion von PIs und mehrerer IPPs eine Änderung der TIR1/AFB-abhängigen Genexpression hervorrufen kann, die zudem ein anderes Muster aufweist, als die der *ipk1-1*-Mutanten, die nur eine Reduktion an InsP_6 aufweisen.

3.3.7. Verifizierung im Transkript-Array gefundener Transkriptgehalte ausgewählter Kandidatengene mittels qPCR

Für die qPCRs wurden die gleichen Gene getestet, die zuvor schon bei den *ipk1-1*-Mutanten in Abschnitt 3.2.7. beschrieben wurden. Die Ergebnisse für IAA1, SAUR68, At5g18060, At5g48750 und IAA4 sind in Abbildung 3.32. dargestellt. Die Auswertung des Arrays zeigte, dass IAA1 (At4g14560) auch in den *InsP 5-Ptase*-Pflanzen nach Gravistimulation schwächer exprimiert war, als im Wildtyp. Dieses Ergebnis ließ sich durch die qPCR-Analyse bestätigen, wo der Wildtyp nach 20 min eine doppelt so hohe Expression zeigte wie zum Zeitpunkt 0 min. In den *InsP 5-Ptase*-Pflanzen kam es dagegen während der ganzen Versuchszeit zu keiner nennenswerten Änderung der Genexpression.

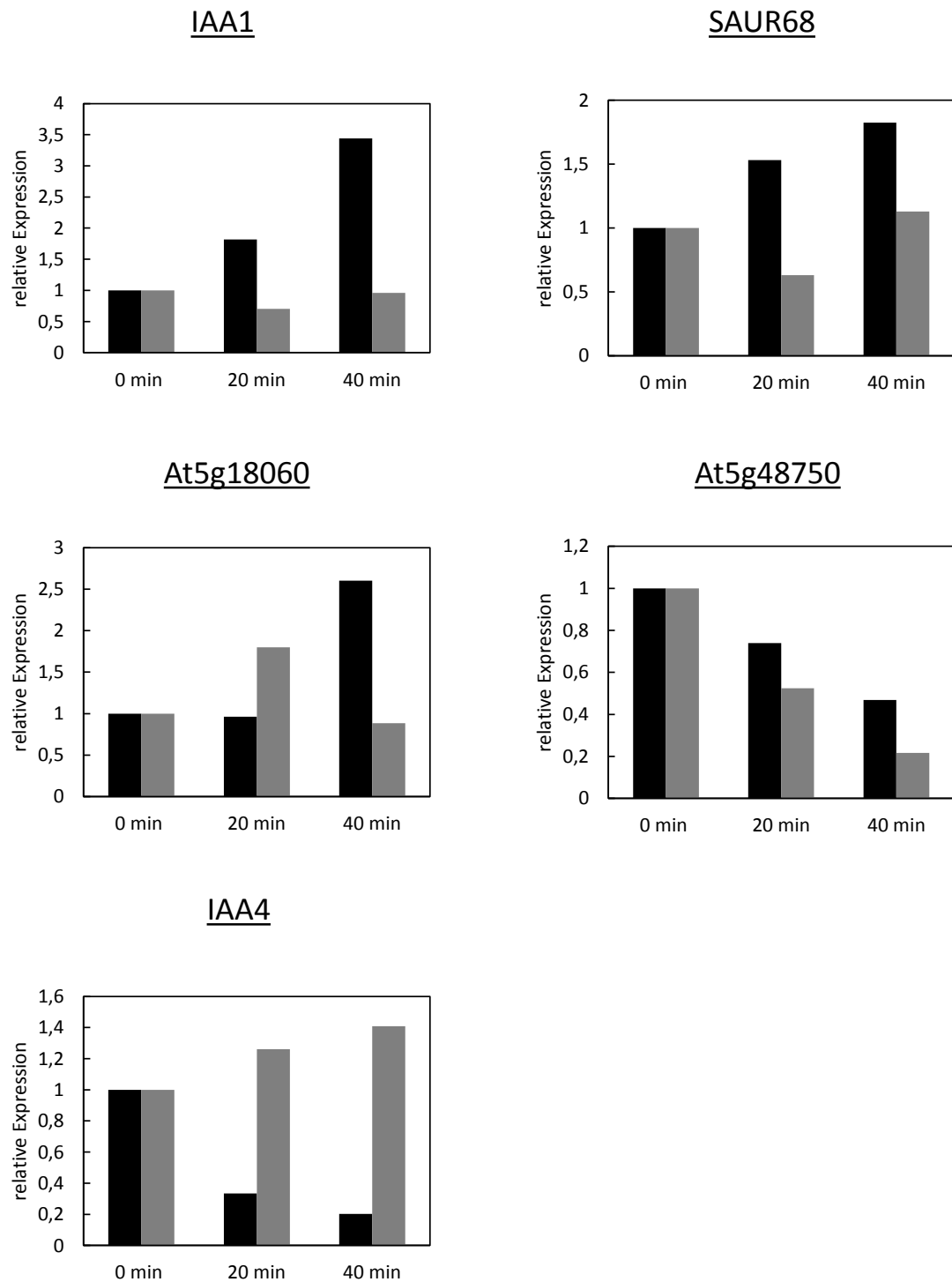


Abb. 3.32.: **Verifizierung der Expressionsmuster ausgewählter Kandidatengene durch qPCR.** Schwarze Balken repräsentieren die relative Expression des Wildtyps, graue die der *InsP 5-Ptase*-Pflanzen nach 0, 20, 40 min Gravistimulation. Die Werte für den Zeitpunkt ohne Gravistimulation wurden auf 1 gesetzt und die Werte für die anderen Zeitpunkte daran angeglichen. Die Ergebnisse repräsentieren Mittelwerte aus zwei unabhängigen Experimenten.

Für SAUR68 zeigten die Daten des Arrays einen leichten Anstieg der Expression nach Gravistimulation. Dies konnte durch die qPCR-Analysen jedoch nicht bestätigt werden, da die *InsP 5-Ptase*-Pflanzen nach 20 min Gravistimulation eine Verringerung der Expression zeigten, die sich nach 40 min wieder dem Expressionsniveau ohne Gravistimulation

annäherte. Für das Gen At5g18060 zeigte das Array keine Änderung der Expression in den *InsP 5-Ptase*-Pflanzen, wohingegen der Wildtyp einen Anstieg zeigte. Die qPCR-Daten konnten beides nicht bestätigen. Nach 20 min Gravistimulation zeigte der Wildtyp noch immer das Expressionsniveau wie zum Zeitpunkt 0 min. Ein drastischer Anstieg war erst nach 40 min zu beobachten. In den *InsP 5-Ptase*-Pflanzen hingegen nahm die Expression nach 20 min zu und zeigte nach 40 min wieder eine Expression ähnlich der des 0 min Zeitpunkts. At5g48750 wurde wie in Abschnitt 3.2.7 schon erläutert wegen seiner starken Expressionsänderung in den *ipk1-1*-Pflanzen ausgewählt. Dieser Anstieg blieb sowohl im Wildtyp, als auch in den *InsP 5-Ptase*-Pflanzen aus, was darauf hinweist, dass durchaus Unterschiede in der Regulation der beiden InsP_6 -defizienten Linien bestehen, die vermutlich durch die anderen Störungen in den *InsP 5-Ptase*-Pflanzen zu erklären sind. Für IAA4 (At5g43700) ließ sich im Array ein starker Anstieg der Expression im Wildtyp beobachten, der jedoch in der qPCR ausblieb. Hier kam es nach 20 min zu einer Reduktion (Abb. 3.32.). Die Expression des Gens nahm in den *InsP 5-Ptase*-Pflanzen leicht zu, was den Expressionsraten in der *ipk1-1*-Mutante entspricht.

Die Daten des Transkript-Arrays und der qPCR bestätigten, dass es in den *InsP 5-Ptase*-Pflanzen nicht nur durch die reduzierten Gehalte an $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ zu Störungen des Auxintransports kommen kann, sondern auch, dass der Wegfall regulatorischer IPPs wie InsP_6 Einfluss auf die Genexpression haben kann. Dadurch ist es möglich, dass *InsP 5-Ptase*-Pflanze sowohl Defekte in der Auxinverteilung als auch in der Auxinwahrnehmung aufweisen.

4. Diskussion

In frühere Arbeiten wurde gezeigt, dass PIs bei auxinabhängigen Prozessen wie der gravitropen Krümmung dynamische Änderungen zeigen. Weiterhin wurde beobachtet, dass Pflanzen bei pharmakologischer Behandlung oder genetisch bedingten reduzierten PI-Gehalten eine abgeschwächte Krümmungsreaktion zeigten (Perera et al., 2006). Einen weiteren Hinweis, dass das PI-System auch für die Auxin-Signaltransduktion wichtig sein könnte, kam von Tan et al., die einen InsP_6 -Kofaktor unbekannter Funktion in TIR1 beschrieben. InsP_6 entsteht unter anderem nach mehrmaliger Phosphorylierung aus InsP_3 , was ein Spaltungsprodukt von $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ ist. Die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen weiterführenden Experimente sollte klären, wie PIs und IPPs in die Kontrolle auxingesteuerten Wachstums integriert sind

4.1. Methoden zur Untersuchung auxinabhängiger Prozesse

Um auxinabhängige Prozesse in Pflanzen mit gestörtem PI-Stoffwechsel zu untersuchen, wurden Gravitropismus-Experimente durchgeführt. Die auxinabhängige gravitrope Krümmung erfordert die Umverteilung und die Wahrnehmung von Auxin zur Induktion der selektiven Genexpression und der letztendlichen Krümmung der Pflanze. Da die gravitrope Krümmung nach Reorientierung einer Pflanze also das Resultat einer Kette auxinabhängiger Prozesse darstellt, wurden zunächst einmal die Krümmungsreaktionen in *pip5k1 pip5k2*-Doppelmutanten, den *ipk1-1*-Mutanten und in den *Insp 5-Ptase*-Pflanzen untersucht und mit der des Wildtyps verglichen. Diese Experimente zeigten für alle Linien eine verlangsamte Krümmungsreaktion nach gravitroper Stimulation. Um zu erklären, wie sich die spezifische Störung im PI-System jeder dieser Pflanzenlinien auf verschiedene auxinabhängige Prozesse auswirkt, wurde zunächst der Transport von Auxin innerhalb der Pflanzen untersucht. Dies geschah mit Hilfe radioaktiv markierten Auxins und – deutlich verlässlicher – mittels des fluoreszenzmarkierten Reporterkonstrukts DR5::GFP. Der Transport des radioaktiven IAAs zeigte für jede der beschriebenen Linien eine Transportreduktion im Vergleich zum Wildtyp. Diese ließ sich jedoch in den *ipk1-1*-Mutanten und den *Insp 5-Ptase*-Pflanzen nicht durch die Ergebnisse der anderen Versuche bestätigen, da weder die Lokalisation und die endozytotische Internalisierung der PIN-Proteine maßgeblich gestört war, noch die Auxinumverteilung nach Gravistimulation. Dies ließ den Schluss zu, dass die Transportmessung mit radioaktiv markiertem IAA nicht in jedem Fall zuverlässige Ergebnisse lieferte, da sie für eine präzise Vorhersage der

Auxinverteilung innerhalb der Wurzel zu ungenau war. Das radioaktiv markierte Auxin könnte sich beispielsweise auch an der Außenseite der Wurzel entlangziehen und die Ergebnisse so verfälschen. Aus diesem Grund ist anzunehmen, dass der reduzierte Transport, wie er sich für die *ipk1-1*-Mutanten und die *Insp 5-Ptase*-Pflanzen ergab, nicht sehr belastbar ist, da zudem keines der anderen Experimente dieses Ergebnis stützte. Ein weiteres Experiment war die Untersuchung der auxinabhängig induzierten Transkripte nach Gravistimulation. Transkript-Arrays bieten die Möglichkeit, Transkriptprofile zu ermitteln und so Gengruppen zu identifizieren, die nach der spezifischen Stimulation Expressionsveränderungen zeigen. Nach Gravistimulation änderte sich wie zu erwarten nur ein kleiner Teil der Genexpression. Dennoch fanden sich unter diesen Kandidaten viele auxinabhängig regulierte Gene. Das Array-Experiment diente in erster Linie dazu, Tendenzen aufzuzeigen und Kandidatengene oder -gengruppen zu identifizieren, die dann mittels qPCR-Analysen weiter untersucht wurden. Das Array wurden nur für die *ipk1-1*-Mutanten und die *Insp 5-Ptase*-Pflanzen durchgeführt. Ein Grund war, dass beide Linien im Gegensatz zu den *pip5k1 pip5k2*-Doppelmutanten nachweislich weniger InsP_6 aufweisen, was Einfluss auf die Funktion der TIR1/AFB-F-Box-Proteine und so die auxinvermittelte Transkription haben könnte.

4.2. Sowohl PIs als auch IPPs haben Einfluss auf die gravitrope Krümmungsreaktion nach Gravistimulation

Die Krümmungsexperimente für die *pip5k1 pip5k2*-Doppelmutante, *ipk1-1*-Mutanten und *Insp 5-Ptase*-Pflanzen (Abschnitt 3.1.3., 3.2.1. und 3.3.1.) zeigten sowohl für Wurzeln, als auch Hypokotyle eine abgeschwächte Krümmung nach 24 h Gravistimulation.

Die Krümmungsdefizite können auf unterschiedliche Störungen im PI-System zurückgeführt werden. Die *pip5k1 pip5k2*-Doppelmutante zeichnet sich durch reduzierte Gehalte an $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ aus, die *ipk1-1*-Mutanten lediglich durch reduzierte Gehalte an InsP_6 und erhöhte Gehalte an InsP_4 und InsP_5 , während die *Insp 5-Ptase*-Pflanzen sowohl weniger $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ haben und zudem noch reduzierte Gehalte an IPPs bis hin zum InsP_6 . Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei schon im Detail beschriebene Hypothesen aufgestellt. Nach Hypothese I könnten PIs unter anderem für den Auxintransport innerhalb der Pflanze relevant sein, in dem sie die polare Rekrutierung von Membrankomponenten steuern. Nach Hypothese II ist das von $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ abgeleitete InsP_6 wichtig für die Funktion von TIR1/AFBs und somit die Auxinwahrnehmung. Beide in den Hypothesen aufgeworfenen Prozesse schienen für die Krümmungsreaktion relevant zu sein.

4.3. Die Verteilung von Auxin wird durch PIN-Proteine diktiert

Die *pip5k1 pip5k2*-Doppelmutante zeigte für die untersuchten Auxintransporter PIN1 und PIN2 veränderte Lokalisation und veränderte dynamische Umverteilung (Abschnitt 3.1.4 und 3.1.5). PIN1:GFP lokalisierte im Wildtyp an der basalen Membran, während es in der Mutante in manchen Zellen sichtbar auch apikal vorlag. Ähnliches war für PIN2:GFP zu beobachten. Dynamische Internalisierungsprozesse wurden anhand von PIN2:GFP in BFA-behandelten Wurzeln untersucht und die Ergebnisse zeigten, dass in der *pip5k1 pip5k2*-Doppelmutante weniger PIN2:GFP-haltige BFA-Körper entstanden als im Wildtyp. Ein Grund dafür könnte sein, dass die durch das ARF-GEF GNOM regulierte polare Rekrutierung von PIN2:GFP an die basale Membran BFA-sensitiv ist, die zur apikalen Membran jedoch nicht, da diese PINOID-abhängig über den Phosphorylierungszustand der PIN-Proteine reguliert wird. Da in den Doppelmutanten bereits ein Teil von PIN1 und auch PIN2 falsch an der apikalen bzw. einer anderen Seite der Membran lokalisierte, konnte weniger PIN in BFA-Körper internalisiert werden. Die Beobachtungen sprechen dafür, dass der polare Transport der PIN-Proteine gestört ist, auch wenn dieses Phänomen nicht in jeder Zelle zu beobachten war. Möglicherweise beeinflusst das Defizit an PtdIns(4,5)P₂ die Bildung von Vesikeln an der Membran. Da PIN-Proteine nach der Produktion zunächst unipolar überall in der Plasmamembran lokalisieren und erst durch dynamische Internalisierungsprozesse polar verteilt werden, besteht die Möglichkeit, dass die verminderte Bildung oder der Transport von Vesikeln durch das Fehlen von PtdIns(4,5)P₂ zu der gestörten Lokalisation der PIN-Proteine in der Doppelmutante führt, weil die verminderte Vesikelbildung Internalisierungsprozesse erschwert. Dies würde sowohl den durch PINOID, als auch den GNOM-regulierten Weg stören, da phosphorylierte als auch nicht phosphorylierte PIN-Proteine zunächst auf die Vesikelbildung angewiesen sind. Die hier gewonnenen Ergebnisse stützen diese Hypothese, da beide untersuchten PINs sowohl an der apikalen als auch an der basalen Membran gefunden wurden und in manchen Zellen keine Präferenz für eine der Seiten zu erkennen war. Allein diese Störungen der PIN-Lokalisierung könnten erklären, warum die gravitrope Krümmung abgeschwächt ist, da die nötige Auxinumverteilung von der polaren Lokalisation der PINs abhängt.

Die Clathrin-vermittelte Endozytose von PIN-Proteinen an der Membran von Wurzelzellen wird durch die GTPasen ROP6 (Chen et al., 2012) und die Rab5-Homologen Ara7, Rha1 und Ara6, welches pflanzenspezifisch ist, reguliert (Dhonukshe et al., 2008; Goh et al., 2007). ROP6 nimmt dabei die Rolle eines negativen Regulators ein, da es in seiner aktiven Form die

Bildung von Clathrin-umhüllten Vesikeln verhindert. Dies geschieht, wenn Auxin an ABP1 bindet, welches dann auf bisher unbekanntem Weg ROP6 aktiviert. Chen et al. konnten zeigen, dass in Linien ohne funktionales ROP6 oder dessen Effektor RIC1 mehr Vesikel an der Membran entstehen (Chen et al., 2012). Da aus anderen Arbeiten bekannt ist, dass auch PtdIns(4,5)P₂ ein positiver Regulator der ROPs ist, weil es deren Assoziation mit GDIs hemmt (Ischebeck et al., 2011; Kost, 2008), ist es verwunderlich, dass eine Mutante mit deutlich weniger PtdIns(4,5)P₂ dennoch weniger PIN-Proteine endozytiert, obwohl die Aktivierung von ROP6 begünstigt wäre. Eine mögliche Erklärung ist, dass PtdIns(4,5)P₂, was durch PIP5K1 und PIP5K2 entsteht, nicht demselben Pool zugeführt wird, der ROP6 aktiviert. Andere PI4P 5-Kinasen könnten auf Grund des Fehlens von PIP5K1 und PIP5K2 in der *pip5k1 pip5k2*-Doppelmutante aktiver sein, um dieses Defizit auszugleichen. In Pollenschläuchen konnten Ischebeck et al. zeigen, dass Überexpression von AtPIP11 einen Einfluss auf die Lokalisierung von NtRac5 hat, indem PtdIns(4,5)P₂ die Assoziation mit GDIs verhindert. Somit könnte in der *pip5k1 pip5k2*-Doppelmutante ein anderer PtdIns(4,5)P₂-Pool in den Vordergrund treten, wenn 2 der 11 Kinasen fehlen, deren PtdIns(4,5)P₂ andere ROPs reguliert und somit die Vesikelbildung fördern.

Ara6, Ara7 und Rha1 spielen eine Rolle bei der Endozytose von PINs, die zunächst unipolar verteilt worden sind und anschließend durch PINOID durch Phosphorylierung in den Zytoplasten zur apikalen Membran eingespeist werden (Dhonukshe et al., 2008). In Pflanzen, deren Ara7 so mutiert ist, dass es nicht von der inaktiven GDP-Form in die GTP-Form umgewandelt werden kann, ist die Umverteilung der PINs gestört, so dass sie keine polare Lokalisation einnehmen können und weiterhin unipolar an der Plasmamembran verbleiben. Wie bereits erwähnt, ist PtdIns(4,5)P₂ ein positiver Regulator von GTPasen, da es die Assoziation mit GDIs verhindert. Da die *pip5k1 pip5k2*-Doppelmutante geringere Gehalte des Lipids aufweist, könnte dies Einfluss auf die Aktivität von Ara6, Ara7 und Rha1 und somit die PIN-Verteilung haben. Dies würde die teils unipolare Lokalisierung der PIN-Proteine in der *pip5k1 pip5k2*-Doppelmutante erklären. Ara6, Ara7 und auch Rha1 lokalisieren primär an frühen Endosomen und es ist nicht geklärt, wie sie Einfluss auf die Endozytose von PINs an der Plasmamembran nehmen. Aus dem tierischen System ist bekannt, dass das zu den pflanzlichen Ara6, Ara7 und Rha1 homologe Rab5 auch in geringer Menge an der Plasmamembran und an Clathrin-Vesikeln vorliegt (van der Bliek, 2005), wo es durch das Rab5-GEF RME-6 aktiviert wird. Dieser Prozess scheint jedoch nicht für die Bildung der Vesikel nötig zu sein, sondern für die Aktivierung von Rab5 an den Vesikeln. Ohne aktives Rab5 fusionieren die Clathrin-Vesikel in tierischen Zellen nicht mehr zu frühen Endosomen. Sollten die pflanzlichen Rab5-Homologen über einen ähnlichen

Rekrutierungsmechanismus verfügen, so könnte fehlendes PtdIns(4,5)P₂ die Dissoziation der GDIs von den GTPasen verhindern, so dass es zwar zur Vesikelbildung kommt, diese aber nicht mehr zu funktionierenden frühen Endosomen verschmelzen. Ein solches, indirektes Modell könnte die PIN2:GFP-haltigen punktförmigen Strukturen nahe der Plasmamembran erklären (siehe Abb. 3.4.1. H), die in der *pip5k1 pip5k2*-Doppelmutante beobachtet wurden.

Eine weitere Erklärung veränderter PIN-Lokalisierung in der Doppelmutante ist ein Effekt auf die Exozytose, die für die polare Verteilung der PINs nach den Recyclingprozessen vonnöten ist. Lavy et al. zeigten, dass ROP6 ebenfalls mit ICR1 (interactor of constitutive active ROPs 1) interagiert, das wiederum mit einem Teil des Exozyst-Komplexes AtSec3A interagiert (Lavy et al., 2007). Diese Interaktion scheint für die Positionierung des Exozystkomplexes relevant, da Pflanzen ohne funktionierendes ICR1 Störungen im Auxintransport aufweisen. Ob für die Aktivierung dieses Regulationsweges auch ABP1 relevant ist, ist unbekannt. Für die Interaktion des Exozyst-Komplexes über Exo70 mit der Plasmamembran ist PtdIns(4,5)P₂ nötig, wie in *S. cerevisiae* gezeigt wurde (He et al., 2007). Der Exozyst-Komplex setzt sich aus mehreren Untereinheiten zusammen und dient der Anbindung des Vesikels an die Membran vor dem eigentlichen Andocken und der Verschmelzung. In Hefen und Tieren besteht er aus 8 Untereinheiten, die ebenfalls Homologe in Pflanzen aufweisen (Hsu et al., 2004). Zudem konnten Camacho L. et al. zeigen, dass PIP5K2 wichtig für die Exozytose in Wurzelspitzen- und Epidermiszellen ist, da sie mit allen Mitgliedern der Rab-E-Subfamilie der Rab-GTPasen interagieren kann und diese in ihrer aktiven GTP-gebundenen Form an die Membran rekrutiert (Camacho et al., 2009). Rab-E GTPasen sind wichtig für die spezifische Vesikelrekrutierung an eine bestimmte Stelle, die Spezifizierung der Membranidentität und die Rekrutierung molekularer Motoren, die für die Vesikelfusion nötig sind. Die über die MORN-Domäne der PIP5K2 hergestellte Interaktion erhöht die Aktivität der Kinase, so dass die Bildung von PtdIns(4,5)P₂ an der Membran erhöht ist, was seinerseits die Exozytose erhöht. Es könnte also einen Zusammenhang zwischen dem von der PIP5K2 produzierten PtdIns(4,5)P₂ und der Positionierung des Exozystkomplexes geben, wie vereinfacht in Abbildung 4.1. dargestellt.

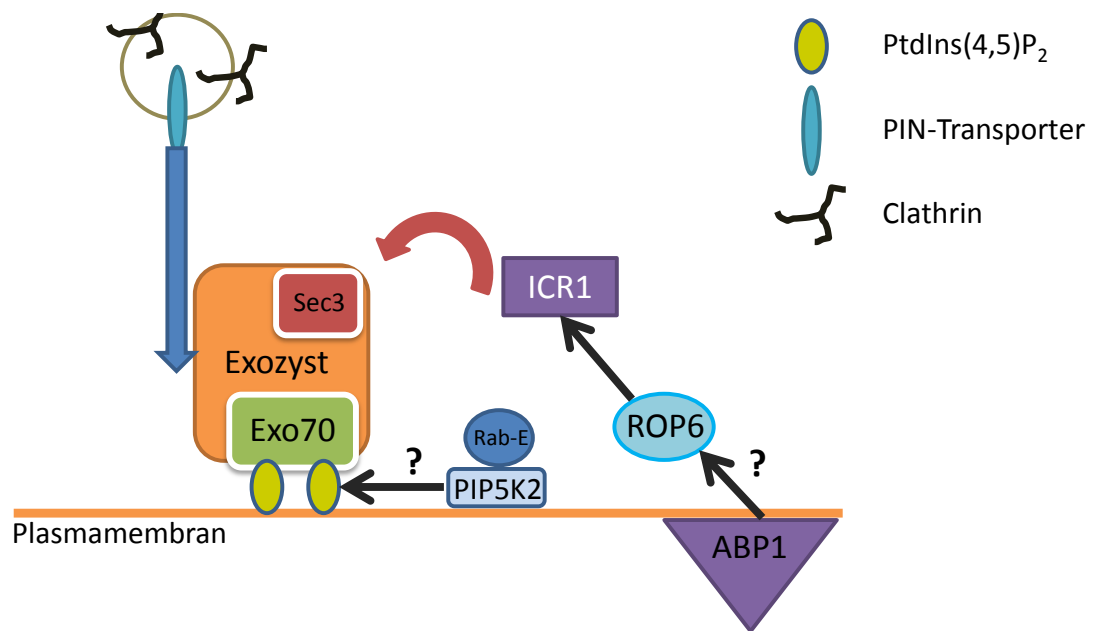


Abb. 4.1.: **Rekrutierung von PIN-transportierenden Vesikeln an die Plasmamembran im Wildtyp.** ABP1 nimmt über einen bislang unbekanntem Mechanismus Einfluss auf die Aktivität von ROP6. ROP6 interagiert mit ICR1, welches eine Rolle bei der Rekrutierung des Exozyst-Komplexes spielt. Dieser interagiert über Exo70 durch Bindung an PtdIns(4,5)P₂ mit der Membran. Ob es einen Zusammenhang zwischen der Rab-E-induzierten PIP5K2-Aktivität und der PtdIns(4,5)P₂-abhängigen Positionierung des Exozyst-Komplexes gibt, ist nicht bekannt.

Somit könnte ein Zusammenhang zwischen PtdIns(4,5)P₂ und der Exozytose von PIN-Proteinen bestehen, die in der *pip5k1 pip5k2*-Doppelmutante dadurch erschwert sein könnte, dass der Exozyst-Komplex nicht richtig an der Plasmamembran positioniert werden kann. Dies würde die teilweise diffuse, bis punktförmige Lokalisation der PIN:GFP-Proteine in Membrannähe erklären. Zudem zeigten Mutanten, ohne funktionierendes ICR1 deutliche Defekte im Auxintransport. PIN-Proteine zeigten veränderte Lokalisation und in der Wurzelspitze bildete sich kein Auxinmaximum mehr aus, was zum Kollaps des Wurzelspitzenmeristems führte. Der Phänotyp dieser Pflanzen zeichnete sich durch stark verkürzte Wurzeln und erhöhte Seitenwurzelbildung aus (Lavy et al., 2007). Die *pip5k1 pip5k2*-Doppelmutanten wiesen ebenfalls kein Auxinmaximum in der Wurzelspitze auf, wie im folgenden Abschnitt erläutert wird. Gegen eine Störung der Exozytose spricht, dass es nach BFA-Behandlung der *pip5k1 pip5k2*-Doppelmutante nicht zu einer erhöhten Menge an BFA-Körpern kam. Dennoch könnten die an der Plasmamembran beobachteten punktförmigen Strukturen, die auch ohne BFA-Behandlung vorliegen, neben fehlerhafter Endozytose auch auf eine fehlerhafte Exozytose hinweisen. Wahrscheinlich ist, dass in der *pip5k1 pip5k2*-Doppelmutante beide Prozesse durch das Fehlen von PtdIns(4,5)P₂ betroffen sind.

4.4. ***pip5k1 pip5k2*-Doppelmutanten zeigen kein Auxinmaximum in der Wurzelspitze**

Die Tatsache, dass die Internalisierung und auch die intrazelluläre Lokalisation der PINs gestört ist, könnte ein Grund sein, warum die *pip5k1 pip5k2*-Doppelmutanten kein Auxinmaximum in der Wurzelspitze aufbauen können, was durch das Reporterkonstrukt DR5::GUS sichtbar gemacht wurde (siehe Abschnitt 3.1.6.). Auch die exogene Gabe verschiedener Auxine änderte daran nichts. Im Wildtyp zeigte sich für das diffundierende NAA eine stärkere Blaufärbung in der ohnehin schon durch das endogene Auxin natürlich gefärbten Wurzelspitze, welche jedoch mit der Zeit so stark zunahm, dass die ganze Wurzel blau gefärbt war. IAA und 2,4-D können nicht diffundieren und sind auf Transporter in und aus der Zelle angewiesen. Das erklärt, warum die Blaufärbung zunächst in den oberen Bereichen der Wurzel begann und sich erst später Richtung Spitze erstreckte. Die durch das endogene Auxin hervorgerufene Blaufärbung der Spitze wäre erst nach längerer Inkubation in der X-Gluc-Lösung in Erscheinung getreten (siehe Wildtypkontrolle Abschnitt 3.1.6.) und war in den auxinbehandelten Wildtypkontrollen noch nicht zu sehen. Auch hier kam es nach längerer Inkubation durch die GUS-Aktivität zu einer Blaufärbung des gesamten Wurzelgewebes (Daten nicht gezeigt). In der *pip5k1 pip5k2*-Doppelmutante zeigte sich lediglich nach 20 h Inkubation mit 2,4-D eine Blaufärbung in vereinzelt Zellen, jedoch kein Maximum in der Wurzelspitze. Eine mögliche Erklärung ist, dass sich durch die teils unpolare Lokalisation der PINs kein Auxinmaximum aufbauen kann, da Auxin ständig ungerichtet innerhalb der Gewebe verteilt wird. Somit würde auch in den meisten Zellen nie genug Auxin vorliegen, um das DR5::GUS-Konstrukt so zu induzieren, dass es zu einer Blaufärbung käme. Der Versuch wurde auch mit einem DR5::GFP-Konstrukt durchgeführt. Diese Daten sind jedoch nicht gezeigt, da es überhaupt keine messbare Fluoreszenz in den *pip5k1 pip5k2*-Doppelmutante gab, die man hätte bildlich darstellen können. Dennoch stützt diese Tatsache die Daten, da auch ein zweites, unabhängiges Konstrukt, welches über DR5 auxininduziert ist, keine Hinweise auf ein Auxinmaximum in der Wurzelspitze der *pip5k1 pip5k2*-Doppelmutante lieferte.

4.5. **Trotz verringerten Auxintransports sind *pip5k1 pip5k2*-Doppelmutanten auxinsensitiv**

Obwohl die *pip5k1 pip5k2*-Doppelmutante verringerten Auxintransport und kein Auxinmaximum in der Spitze der Wurzel aufweist, ist sie auxinsensitiv (siehe Abb. 3.7) und ihr Wurzelwachstum wurde wie beim Wildtyp nach Auxingabe inhibiert. Die

Wachstumshemmung durch höhere Auxindosen ist wohl unter anderem auch darauf zurückzuführen, dass die Synthese von Ethylen durch eine Transkriptionserhöhung Ethylenproduzierender Genprodukte induziert wird (Hansen und Grossmann, 2000). Das bedeutet, dass dieser Effekt auf die Wahrnehmung von Auxin unter anderem auf die Transkriptionsmaschinerie zurückzuführen sein könnte. Diese scheint in den *pip5k1 pip5k1*-Doppelmutanten demnach nicht gestört zu sein, auch wenn eine geringere Konzentration von IAA zu einer geringeren Wurzelwachstumshemmung führt als im Wildtyp (siehe Anhang Abb. A.2). Dieser Effekt könnte auch auf den verminderten Transport von IAA zurückzuführen sein. Andere Studien belegen zudem, dass Transportmutanten, wie beispielsweise *aux1* weniger sensitiv auf die auxininduzierte Wurzelwachstumshemmung reagieren (Pickett et al., 1990). Dies legt den Schluss nahe, dass für den beschriebenen Effekt nicht nur die Auxinwahrnehmung auf Transkriptionsebene wichtig ist, sondern auch, dass ausreichende Mengen an Auxin in die Zelle gelangen. Für weitere Studien könnte es also interessant sein, *pip5k1 pip5k2*-Doppelmutante auf Expression und Verteilung von Auxinimportproteinen wie AUX1 zu testen. Zudem muss hier bedacht werden, dass der starke Phänotyp der Doppelmutante nicht allein auf einer Störung auxinvermittelter Prozesse beruhen muss, sondern dass die Mutation in der PIP5K1 und der PIP5K2 auch pleiotrope Effekte hervorrufen kann. Da nicht nur auxintransportierende Enzyme sondern viele weitere Membrankomponenten auf den Vesikelverkehr angewiesen sind, ist denkbar, dass der Einfluss der Mutationen auf die Auxinverteilung nur ein Nebeneffekt globaler Vorgänge ist, die innerhalb der *pip5k1 pip5k2*-Doppelmutante nicht mehr richtig funktionieren. Dennoch zeigen die *pip5k1 pip5k2*-Doppelmutanten deutliche auxinabhängige Phänotypen. Dies lässt sich dadurch erklären, dass polar lokalisierende, mit hoher Internalisierungsrate – wie beispielsweise PIN-Proteine – stärker vom Fehlen des PtdIns(4,5)P₂ betroffen sein könnten als andere Proteine wie zum Beispiel Aquaporine. Weitere Analysen werden diese Fragen klären.

4.6. Die *ipk1-1*-Mutante zeigte verminderte Krümmung ohne Defizite beim Auxintransport

Die *ipk1-1*-Mutante weist durch das Fehlen der Inositolpolyphosphat-Kinase 1 reduzierte Gehalte an InsP₆ und erhöhte für InsP₅ und InsP₄ auf. Im Gegensatz zu den *pip5k1 pip5k2*-Doppelmutanten ist die Synthese der PIs und insbesondere für PtdIns(4,5)P₂ nicht betroffen. Die *ipk1-1*-Mutante wurde der *pip5k1 pip5k2*-Doppelmutante als mögliche Auxinwahrnehmungsmutante gegenüber gestellt. Auch hier wurde zunächst die

Krümmungsreaktion nach Gravistimulation, die polare Verteilung der PIN-Transporter und die Auxinverteilung untersucht. Die gravitrope Krümmung von Wurzeln und Hypokotylen zeigte sich nach Gravistimulation im Vergleich mit dem Wildtyp signifikant reduziert (Abschnitt 3.2.1). Weitere Experimente zur PIN-Lokalisation, deren Endozytose und auch zum Auxintransport zeigten, dass die verlangsamte Krümmung auf keinen dieser Prozesse zurückzuführen war. Die PIN-Proteine zeigten die gleiche Lokalisierung wie im Wildtyp (Abschnitt 3.2.3.). Dennoch zeigte auch diese Linie nach Behandlung mit exogenem IAA, dass die Reduzierung des Wurzelwachstums geringer ist im Vergleich mit dem Wildtyp (siehe Anhang Abb. A.2).

Die endozytische Internalisierung von PIN2:GFP wurde mittels BFA untersucht (Abschnitt 3.2.4.). Die *ipk1-1*-Mutante wies wie die Wildtyppflanzen Akkumulation von PIN2:GFP in BFA-Körpern auf. Die zusätzliche Gabe von Auxin führte in der *ipk1-1*-Mutante wie auch im Wildtyp zu einer Reduktion der PIN2:GFP-haltigen BFA-Körper. Die Untersuchung der Auxinverteilung nach Gravistimulation mittels eines DR5::GFP-Konstrukts zeigte für die Mutante eine vergleichbare Umverteilungsgeschwindigkeit des Hormons an die untere Seite der Wurzelspitze wie beim Wildtyp (Abschnitt 3.2.5).

Alle Kontrollexperimente wiesen darauf hin, dass die verminderte Krümmungsreaktion nicht auf fehlerhafte Auxinverteilungsprozesse zurückzuführen ist. Um eine mögliche veränderte Auxinsensitivität über das TIR1/AUX/IAA-System zu testen, wurden Transkriptarrays von gravistimulierten *ipk1-1*-Wurzelspitzen durchgeführt. Die *ipk1-1*-Mutanten zeigten dabei im Vergleich zum Wildtyp veränderte Genexpression nach Gravistimulation. Unter den Kandidaten mit veränderten Genexpressionsmustern befanden sich eine Reihe auxininduzierter Gene, die durch den SCF^{TIR1/AFB}-vermittelten Signaltransduktionsweg reguliert werden, wie zum Beispiel IAA1. Aus diesen Kandidaten wurde eine Auswahl durch qPCR verifiziert. Diese Daten bestätigen zum einen, dass sich die Reduktion des InsP₆-Kofaktors nachhaltig auf die auxinvermittelte Genexpression auswirkt und der Kofaktor daher von Bedeutung für die Funktion von TIR1/AFBs ist, und zum anderen, dass die *ipk1-1*-Mutanten tatsächlich in der Auxinwahrnehmung verändert sind. Zudem zeigten die Experimente, dass auch die auxinvermittelte Genexpression entscheidend für die Reaktion auf gravitrope Stimulation ist und nicht nur die Veränderung des Auxintransports innerhalb der Wurzel und die schnellen Veränderung der PIN-Lokalisation, die an der Membran stattfinden. Zudem könnte die auxinvermittelte Genexpression auch Einfluss auf die Reaktion auf exogenes IAA haben, da die Wurzeln nicht in gleicher Weise mit inhibiertem Wachstum reagierten, wie der Wildtyp (Abb. A.2). Da die Verkürzung der Wurzel unter anderem auf die Synthese ethylenproduzierender

Genprodukte zurückgeht, ist dies ein Indiz, dass auch hier Auxinwahrnehmung eine Rolle spielen könnte. Da die Behandlung mit exogenem Auxin jedoch auch viele andere Prozesse innerhalb der Pflanze stört, vor allem den Transport endogenen Auxins, sind diese Ergebnisse mit Vorbehalten zu betrachten. Zudem sind die Unterschiede der *ipk1-1*-Mutante zum Wildtyp nicht derart ausgeprägt, wie beispielsweise die der *pip5k1 pip5k2*-Doppelmutante.

4.7. ***Insp 5-Ptase*-Pflanzen zeigten Defekte für den Auxintransport trotz korrekter PIN-Lokalisation**

Im phänotypischen Erscheinungsbild komplexer stellen sich die *Insp 5-Ptase*-Pflanzen dar. *Insp 5-Ptase*-Pflanzen zeigten wie die *pip5k1 pip5k2*-Doppelmutanten ebenfalls Störungen bei der Endozytose von PIN2, jedoch nicht bei der Lokalisation. Auch die anderen PIN-Proteine, bis auf PIN4 zeigten keine Fehllokalisierung. Da PIN4:GFP jedoch auch im Wildtyp schon eine von der in der Literatur beschrieben abweichende Lokalisation zeigte, soll darauf hier nicht weiter eingegangen werden. Zur Untersuchung von Endozytoseprozessen wurden Pflanzen in einem Ansatz mit BFA behandelt und in einem anderen mit BFA und gleichzeitig Auxin. BFA führte wie beim Wildtyp zur Akkumulation von PIN2:GFP in BFA-Körpern. *Insp 5-Ptase*-Pflanzen bildeten signifikant weniger BFA-Körper nach der Behandlung als Wildtyp Kontrollen. In dem zusätzlich mit Auxin durchgeführten Experiment kam es im Wildtyp zu einer deutlichen Inhibierung der Endozytose und die Anzahl der BFA-Körper war signifikant reduziert. In gleich-behandelten *Insp 5-Ptase*-Pflanzen nahm die Anzahl der BFA-Körper hingegen auch nach gleichzeitiger Gabe von Auxin nicht ab, was bedeutet, dass die Endozytose hier nicht gehemmt war (siehe Abschnitt 3.3.4.).

Trotz einer ähnlichen globalen Reduktion von $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ wie in der *pip5k1 pip5k2*-Doppelmutante zeigten die *Insp 5-Ptase*-Pflanzen also eine gänzlich andere Reaktion auf BFA. Ein Unterschied ist, dass die *Insp 5-Ptase*-Pflanzen eine starke Hochregulierung der PI4P 5-Kinasen und auch der PI-PLC als Antwort auf die ständige Hydrolyse des InsP_3 zeigen. Es muss daher angenommen werden, dass es zwar zu einer globalen Reduktion von $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ in der Pflanze kommt, lokal in der Plasmamembran aber zunächst sehr hohe Konzentrationen an $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ produziert werden. Die gesteigerte PI4P 5-Kinase-Aktivität produziert $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$, was zunächst an diverse Bindungspartner weitergegeben wird, bevor es freigesetzt und von der PI-PLC gespalten wird. Erst hier kann dann die *Insp 5-Ptase* wirken. Somit könnte die *Insp 5-Ptase*-Pflanze zwar global eine Linie mit reduzierten Gehalten an $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ sein, aber dennoch PIP5K-Überexpressionsphänotypen zeigen.

Hinweise darauf lieferten Experimente an Blatt-Protoplasten. Wie in der Einleitung bereits beschrieben, ist PtdIns(4,5)P₂ ein positiver Regulator von Ionenkanälen. Zudem ist die Regulierung auxingesteuert, da Auxin Ionenkanäle und Protonenpumpen aktiviert, um ein Anschwellen der Zelle zu induzieren. Dieser Prozess ist ABP1-gesteuert (Sauer und Kleine-Vehn, 2011). In einem Experiment, in dem Wildtyp, *Insp 5-Ptase*-Pflanzen und eine PIP5K2-Überexpressionslinie (PIP5K2ÜE) protoplastiert und mit Auxin behandelt wurden, kam heraus, dass sich die Größe der Zellen der *Insp 5-Ptase*-Pflanzen und PIP5K2ÜE nach Auxingabe im Vergleich zu den Kontrollen nicht vergrößerten. Zudem waren die Protoplasten der beiden Linien auch ohne Auxingabe bereits wesentlich größer verglichen mit denen des Wildtyps (Anna Müller, persönliche Mitteilung). Diese Beobachtung spricht dafür, dass die Ionenkanäle auch ohne Auxingabe schon geöffnet waren und der Einstrom von Wasser in die Zelle erhöht war. Ein weiterer Effekt von Auxin wäre dann nicht mehr möglich und dieses Phänomen wäre mit einem Überschuss an PtdIns(4,5)P₂ an der Membran zu erklären, was für eine erhöhte Ionenkanalaktivität sorgt.

Auch die Beobachtung, dass sich die *Insp 5-Ptase*-Pflanzen nach BFA-Behandlung eher wie der Wildtyp verhalten, anstatt wie die *pip5k1 pip5k2*-Doppelmutante lässt sich durch dieses Konzept erklären. Dass sich die Endozytose durch Auxingabe nicht inhibieren ließ, spricht dafür, dass die ABP1-vermittelte Clathrin-Rekrutierung nicht gehemmt wurde oder die auxininhibierte Endozytose, die auf noch nicht geklärte Weise auch durch PIs gesteuert sein könnte, durch den Überschuss an PtdIns(4,5)P₂ derartig hochreguliert ist, dass die ABP1-vermittelte Hemmung keine Wirkung zeigt. Die Endozytosemaschinerie beruht darauf, dass ein Adapterprotein über Membraninteraktion Clathrin an die für eine Vesikelknospung richtige Stelle der Membran führt. Im tierischen System wird die Bindung des Adapterproteins über ein spezifisches Sequenzmotiv mit der Membran über PtdIns(4,5)P₂ hergestellt (Holstein und Oliviusson, 2005). In *A. thaliana* fand man ebenfalls Adapterproteine, jedoch trugen sie nicht das Sequenzmotiv für die Bindung von PtdIns(4,5)P₂, so dass man vermutet, dass die Bindung mit der Membran auch über ein anderes PI zustande kommen könnte. Da die *Insp 5-Ptase*-Pflanzen eine globale Störung des PI-Netzwerkes zeigen, ist es möglich, dass auch die Synthese anderer Vorstufen wie beispielsweise PtdIns4P fehlreguliert ist. Somit könnte ein Ungleichgewicht der membranintegrierten PIs dazu führen, dass durch vermehrte Bindung von Adapterproteinen mehr Clathrin rekrutiert wird, als durch den ABP1-Weg gehemmt werden kann und es auch nach Auxingabe noch immer zur Vesikelbildung kommt. Ungeklärt bleibt an dieser Stelle, wie ROP6 und sein Effektor RIC1 Einfluss auf die Clathrin-vermittelte Endozytose über das Adapterprotein nehmen und warum dieser Effekt durch einen

Überschuss von PIs überbrückt wird. Ein vereinfachtes Modell, wie ABP1 die Endozytose im Wildtyp hemmen könnte, ist in Abbildung 4.2. dargestellt.

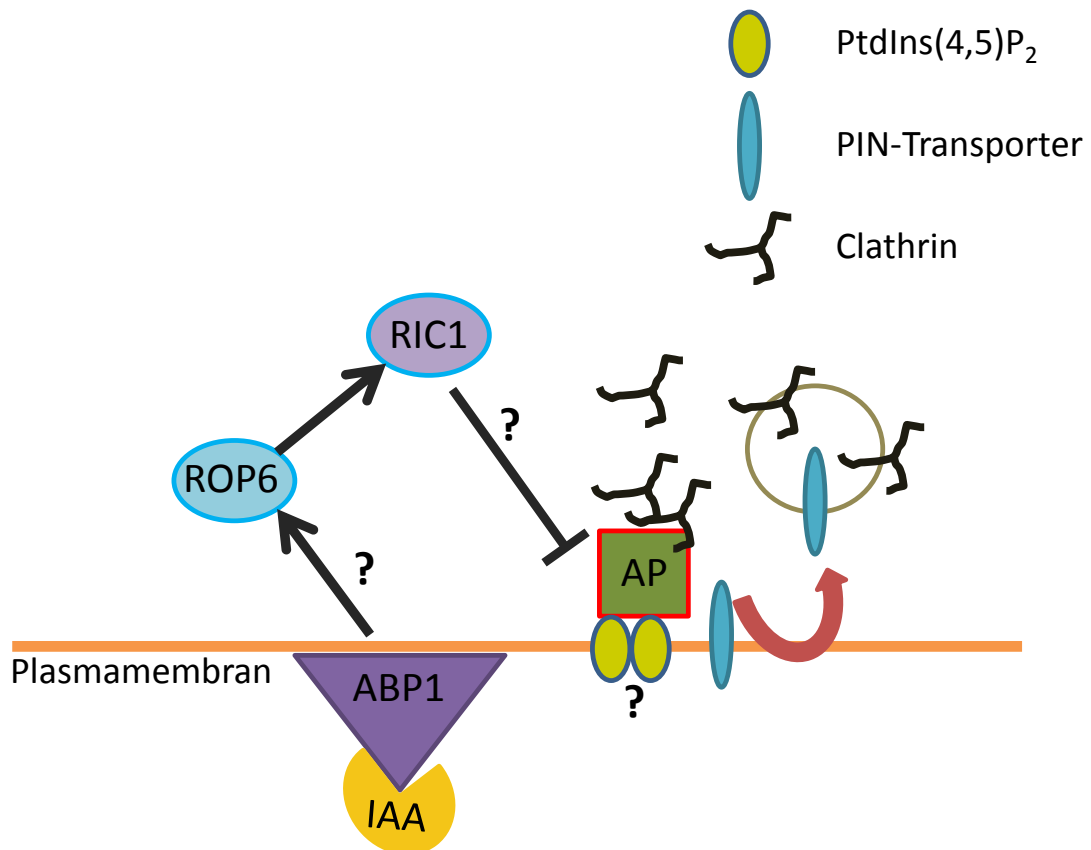


Abb. 4.2.: **ABP1 hemmt nach Auxinbindung die Clathrin-vermittelten Endozytose.** Es ist bisher ungeklärt, welche Faktoren die ABP1-Aktivierung an ROP6 weitergeben und auch, wie RIC1 die Hemmung der Endozytose auslöst. Es ist aber möglich, dass es Einfluss auf die Rekrutierung der Adapterproteine nimmt, welche in Pflanzen über PIs an die Membran binden. Da pflanzliche Adapterproteine kein Sequenzmotiv für die Bindung an PtdIns(4,5)P₂ aufweisen, nimmt man an, dass die Bindung über andere PIs erfolgt.

Da der Transport aller Proteine zur Membran von Zytoseprozessen abhängt, ist nicht auszuschließen, dass ABP1, das vom ER an die Außenseite der Plasmamembran gelangen muss, selbst betroffen ist. Hinweise dafür wären, dass viele ABP1-abhängige, über Auxin induzierte Prozesse, wie die Regulation von Ionenkanälen und die PIN-Internalisierung in *Insp 5-Ptase*-Pflanzen gestört sind. Eine Möglichkeit ist, dass ABP1 als globaler Regulator auxininduzierter Signale an der Außenseite der Membran seiner Aufgabe nicht mehr nachkommen kann, weil seine Sekretion vom Vesikelverkehr abhängt, der nicht mehr korrekt funktioniert.

Auch nicht außer Acht zu lassen, ist die Tatsache, dass PtdIns(4,5)P₂ und PtdIns4P nicht nur Substrate für die PI-PLC sind, sondern auch noch für andere Phospholipasen, deren Spaltprodukte in Verdacht stehen, den Auxintransport und die PIN-Verteilung nachhaltig zu beeinflussen (Scherer et al., 2012). Somit könnte ein erhöhter PtdIns(4,5)P₂-Gehalt auch so

Einfluss auf das Gleichgewicht von Metaboliten wie beispielsweise freien Fettsäuren oder Lysophospholipiden haben.

Die Ergebnisse deuten in der Summe darauf hin, dass Auxin seine polare Verteilung innerhalb der *Insp 5-Ptase*-Pflanzen nicht so reguliert wie im Wildtyp, wo zumindest die Regulation der PIN2-Lokalisierung auxininsensitiv ist. Dennoch scheint dies keine derart gravierenden Störungen der Auxinverteilung wie bei den *pip5k1 pip5k2*-Doppelmutanten hervorzurufen, da sich in der Wurzelspitze dennoch ein Auxinmaximum bildet und es auch nach Gravistimulation zu einer Auxinumverteilung im gleichen zeitlichen Rahmen wie beim Wildtyp kam (siehe Abschnitt 3.3.5). Die verminderte Krümmungsreaktion der *Insp 5-Ptase*-Pflanzen kann also nicht auf eine verlangsamte Umverteilung von Auxin nach Gravistimulation zurückzuführen sein. Im Falle gravitroper Stimulation einer Pflanze kommt es zu einer Auxinumverteilung, die dazu führt, dass sich Zellen an der einen Seite strecken müssen, um sich wieder am Schwerkraftwinkel auszurichten. Im Falle der Wurzel wird der Auxinfluss an die Unterseite der Wurzel umgelenkt, wodurch an der Oberseite weniger Auxin da ist um eine Streckung der Zellen zu blockieren. Im Spross der Pflanze ist das System gegensätzlich reguliert. Auch hier wird Auxin an die Unterseite der Pflanze umgeleitet, löst hier jedoch eine Streckung aus, so dass sich das Hypokotyl wieder aufrichtet. In beiden Fällen wird die Krümmung jedoch durch Streckung von Zellen hervorgerufen, die letztendlich auf einer Regulation von Ionenkanälen beruht und es der Zelle so ermöglichen zu wachsen, indem der Protoplast anschwillt und die Zellwand gelockert wird. Wie zuvor beschrieben sind Blatt-Protoplasten der *Insp 5-Ptase*-Pflanzen von vornherein größer als die des Wildtyps und reagieren nicht auf die Gabe von Auxin mit zusätzlichem Anschwellen (Daten von Anna Müller). Da die PtdIns(4,5)P₂-Gehalte in der ganzen Pflanze verändert sind, könnte die Fehlregulation der Ionenkanäle auch bei der gravitropen Krümmung eine Rolle spielen und es der Pflanze schwerer machen, im gleichen zeitlichen Rahmen mit Zellvergrößerung auf Gravistimulation zu reagieren wie der Wildtyp.

4.8. Die *Insp 5-Ptase*-Pflanzen zeigten eine gestörte Auxinwahrnehmung

Ein Erklärung für die verringerte gravitrope Krümmung der *Insp 5-Ptase*-Pflanzen ist, dass die Auxinwahrnehmung auf Transkriptionsebene im Vergleich zum Wildtyp verändert ist (siehe Abschnitt 3.3.6 und 3.3.7). Viele Gene, die im Wildtyp nach Gravistimulation reguliert wurden, waren in der *Insp 5-Ptase*-Pflanze nicht oder gegensätzlich reguliert. Viele dieser Gene sind typische auxininduzierte Gene wie IAA1 oder IAA4, aber auch Gene, die mit der

Zellwandsynthese assoziiert sind, die im Falle gravitroper Stimulation im Wildtyp runterreguliert wurden.

Der Einfluss auf die auxininduzierte Transkriptionsänderung nach Gravistimulation könnte in den *Insp 5-Ptase*-Pflanzen von der Reduktion mehrerer IPPs herrühren. Wie schon in der Einleitung beschrieben ist InsP_6 ein Kofaktor in TIR1, dem Auxinrezeptor des $\text{SCF}^{\text{TIR1/AFB}}$ -Komplexes. Da sich die Reduktion der IPPs nachweislich bis zum InsP_6 ausweitet (Perera et al., 2008), könnte dies ein Grund für die veränderte Genregulation der *Insp 5-Ptase*-Pflanzen sein. Die Daten weisen darauf hin, dass der InsP_6 -Kofaktor eine Funktion bei der Auxinwahrnehmung durch TIR1 hat. Wie bereits in früheren Studien vermutet, könnte InsP_6 auf Grund seiner Lage innerhalb der Struktur von TIR1 eine Funktion bei der Stabilisierung des Proteins haben (Hao und Yang, 2010), vielleicht auch in Bindung mit Auxin. Studien an COI1, dem TIR1-homologen Rezeptor in der Jasmonat-Signalperzeption, zeigten, dass das dort gebundene InsP_5 die Bindung des Ubiquitinierungsziels beeinflusst (Mosblech et al., 2011; Sheard et al., 2010). Ähnliches ist nun auch für InsP_6 und TIR1 anzunehmen, da die auxininduzierte Geneexpression in den *Insp 5-Ptase*-Pflanzen maßgeblich beeinflusst ist. Da die *Insp 5-Ptase*-Pflanzen im Syntheseweg der PIs und dem der IPPs gestört sind, ergibt sich eine kombinierte und komplexe Erklärung für den verringerten Gravitropismus dieser Pflanzen, bei der sowohl veränderte Auxinverteilung als auch veränderte Auxinwahrnehmung eine Rolle spielt. Auch die *Insp 5-Ptase*-Pflanzen zeigten eine verminderte Reduktion des Wurzelwachstums nach exogener Auxingabe ähnlich den *ipk1-1*-Mutanten (siehe Anhang Abb. A.2.), die die Daten der reduzierten gravitropen Krümmung und der veränderten Wahrnehmung von Auxin stützen.

4.9. PIs sind wichtige Mediatoren der polaren Verteilung von Auxinsignalen

Die polare Auxinverteilung innerhalb der Gewebe, aber auch die intrazelluläre Verteilung wird durch ein kompliziertes System von Transportproteinen gewährleistet, deren Positionierung aufwendig reguliert ist und sich der gesamten Transportmaschinerie innerhalb einer Zelle bedient. Somit ist Auxin eine der am aufwendigsten zu verteilenden Substanzen in Pflanzen. Für diesen Prozess sind besonders die Endo- wie auch die Exozytose innerhalb der Zelle wichtig, da sie gewährleisten, dass der Auxinfluss durch die Gewebe flexibel von Zelle zu Zelle umgeleitet werden kann. Auxin ist in der Lage über die Bindung an ABP1 von außerhalb der Zelle regulatorisch in diese Zytoseprozesse einzugreifen und die Endozytose von PIN-Proteinen zu verhindern und vielleicht sogar deren Exozytose zu steigern. Die Zytosemaschinerie innerhalb von Zellen ist einer komplexen Regulation

unterworfen, die eine ganze Reihe von Einheiten, wie Adapter-Proteine, GTPasen, den Exocyst-Komplex, Aktin und Microtubuli, aber auch bestimmte Membranzusammensetzungen voraussetzt. Wie weitreichend in der Literatur beschrieben sind besonders Membranbereiche, die reich an PIs sind, relevant für die Vesikelbildung, als auch die Vesikelverschmelzung. Somit ist es nicht verwunderlich, dass auch die dynamische Verteilung von PIN-Proteinen von PIs abhängig ist. Die in dieser Arbeit präsentierten Daten zeigen, dass ein Ungleichgewicht im PI-Haushalt der Membranen zu deutlichen Änderungen in der Verteilung der PIN-Proteine und in der Auxinverteilung führt. Störungen von Zytoseprozessen haben weitreichende Folgen für die Pflanze, was den deutlichen und sicherlich nicht nur auf Auxin reduzierbaren Phänotyp der *pip5k1 pip5k2*-Doppelmutante erklärt. Nicht nur das Fehlen von PIs, sondern auch ein lokaler Überschuss an $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$, wie er in den *InsP 5-Ptase*-Pflanzen zu vermuten ist, hat Einfluss auf die polare Verteilung der Auxintransporter. Somit ist nicht nur das reine Vorhandensein von PIs relevant für die polare Auxinverteilung, sondern auch die Menge. Alles in allem zeigen die gewonnenen Daten, dass PIs relevant für die polare PIN-Verteilung an der Membran sind, wie es in der dieser Arbeit zugrundeliegenden Hypothese I angenommen wurde.

4.10. Der InsP_6 -Kofaktor von TIR1 ist relevant für die auxinvermittelte Genexpression

Wie in Abschnitt 4.6. beschrieben, zeigen die für die *ipk1-1*-Mutante im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Daten, dass InsP_6 relevant für die Funktion von TIR1 ist, da die auxinabhängige Transkription bestimmter Gene in Pflanzen mit reduzierten InsP_6 -Gehalten verändert ist. Der Großteil an pflanzlichen InsP_6 geht auf InsP_3 zurück, das durch die Spaltung von $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ entsteht. Somit spielt der Gehalt von PIs innerhalb der Pflanze eine indirekte Rolle für die Auxinwahrnehmung. Dieser Zusammenhang konnte auch am Beispiel der *InsP 5-Ptase*-Pflanzen gezeigt werden, in denen InsP_3 , was aus $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ hervorgeht, entzogen wird und so die Gehalte von InsP_6 reduziert sind. Auch diese Pflanzen zeigten Störungen in der Auxinwahrnehmung, die sich in einigen Fällen mit den Defekten, die in den *ipk1-1*-Mutanten beobachtet wurden, überschneiden. InsP_6 ist also relevant für die Auxinwahrnehmung, was der als Grundlage für diese Arbeit angenommenen Hypothese II entspricht.

4.11. Ausblick

Die vorliegenden Ergebnisse untermauern einen Zusammenhang zwischen PIs und abgeleiteten IPPs sowohl mit dem Auxintransport als auch der Auxinwahrnehmung.

Eine direkte Interaktion der PtdIns(4,5)P₂-vermittelten Endo- oder Exozytose mit der auxininduzierten PIN-Verteilung konnte jedoch nicht gezeigt werden. In weiteren Experimenten könnten durch Interaktionsstudien untersucht werden, ob die im Auxinprozess relevanten GTPasen ROP6, Ara6, Ara7 und Rha1 mit einer der 11 in *A. thaliana* vorkommenden PI4P 5-Kinasen direkt interagieren können oder ob die Proteine innerhalb der Zelle kolokalisieren. Des Weiteren wäre es wichtig, PIP5K-Überexpressionslinien auf PIN-Lokalisierung und PIN-Transportprozesse zu untersuchen, um die Hypothese zu testen, dass Beobachtungen bei der *InsP 5-Ptase*-Pflanze auf gesteigerte PI-Bildung zurückzuführen sind.

Weitere Experimente bezüglich der zweiten Hypothese, dass InsP₆ ein nötiger Kofaktor für TIR1 ist, wären Hefe-Zwei-Hybrid-Experimente, die zeigen, ob eine Interaktion zwischen TIR1 und AUX/IAAs in InsP₆-defizienten Hefemutanten funktioniert. Außerdem könnte TIR1 selektiv mutiert werden, so dass das InsP₆ nicht mehr koordiniert werden kann, um zu untersuchen, ob es noch zu einer Interaktion von TIR1 mit Aux/IAAs kommt oder sich das F-Box-Protein überhaupt faltet.

Viele der in der Transkriptanalyse gefundenen Gene sind bisher nicht hinreichend auf ihre Funktionalität untersucht, sondern lediglich einem Prozess wie beispielsweise der Zellwandbiosynthese oder der Signaltransduktion von Auxin zugeordnet, da in vorangegangenen Transkriptanalysen auffällige Expressionsmuster im Rahmen dieser Prozesse gefunden wurden. Es wäre interessant, einige dieser Gene und deren Produkte näher zu charakterisieren, um ihre Rolle in der Signaltransduktion nach Gravistimulation besser zu verstehen.

5. Zusammenfassung

Auxin ist eines der wichtigsten Phytohormone für das pflanzliche Wachstum und die Entwicklung und ein entscheidender Regulator des Gravitropismus. Für alle auxinvermittelten Prozesse ist die spezifische Verteilung des Hormons innerhalb der Gewebe relevant. Diese wird durch spezialisierte Auxintransporter umgesetzt, von denen besonders die PIN-Auxinexporter entscheidend sind. PINs lokalisieren in einer Zelle in den meisten Fällen polar an einer Seite der Plasmamembran um einen strikten Auxinfluss in das Zielgewebe zu erzeugen. Diese PIN-Verteilung muss dynamisch sein, damit der Auxinfluss zum Beispiel im Falle gravitroper Stimulation zügig in ein anderes Gewebe umgeleitet werden kann. Die schnelle Umverteilung der PINs hängt unter anderem von der Zusammensetzung und Funktionalität der Plasmamembran ab. In früheren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass Pls eine wichtige Funktion bei der Vesikelbildung und der Rekrutierung der dafür nötigen Proteinmaschinerie einnehmen. In dieser Arbeit wurde getestet, ob Pls eine Rolle bei der PIN-Verteilung spielen. Pflanzen mit Störungen im PI-Syntheseweg wurden auf ihre gravitropen Krümmungseigenschaften und ihre PIN- und Auxinverteilung untersucht. Eine *pip5k1 pip5k2*-Doppelmutante zeigte neben verminderter gravitroper Krümmung auch eine gestörte PIN-Lokalisation als Defekt bei der Auxinverteilung, da sich Auxin mittels eines DR5::GUS-Reporters in der Wurzelspitze der Mutanten nicht nachweisen ließ. Diese Experimente lieferten daher wichtige Hinweise darauf, dass PtdIns(4,5)P₂ eine Rolle bei der Lokalisierung und Umverteilung und damit der Regulierung des Auxinflusses spielen. PtdIns(4,5)P₂ ist nicht nur als intaktes Lipid für viele Signalwege in der Pflanze relevant. Auch die abgeleiteten IPPs spielen eine wichtige Rolle. In der Kristallstruktur des Auxinrezeptors TIR1 wurde ein InsP₆-Kofaktor beschrieben, dessen Funktion aber bisher unklar blieb. Im Rahmen dieser Arbeit wurden *ipk1-1*-Mutanten und *InsP 5-Ptase*-Pflanzen mit verminderten Gehalten an InsP₆ auf Auxinvermittelte Prozesse wie gravitrope Krümmung und die Verteilung von Auxin und dessen Transporter untersucht. Weiterhin wurde die Transkription auxinabhängiger Gene getestet. Dazu wurden diese Pflanzenlinien gravitrop stimuliert und die Transkriptgehalte in der Wurzelspitze nach dieser Stimulation mittels einer Transkript-Arrayanalyse mit Pflanzen des Wildtyps verglichen. Die Ergebnisse zeigten, dass die gravitrope Stimulation in Wildtyppflanzen eine deutliche Veränderung der Genexpression hervorruft, die sich in *ipk1-1*-Mutanten und die *InsP 5-Ptase*-Pflanzen nicht beobachten ließ. Verifizierungen ausgewählter Gene mittels qPCR bestätigten die Befunde. Zusammenfassend zeigen die

Ergebnisse, dass sowohl PIs, als auch abgeleitete IPPs, im besonderen InsP_6 , eine Rolle bei auxinvermittelten Prozessen spielen.

6. Anhang

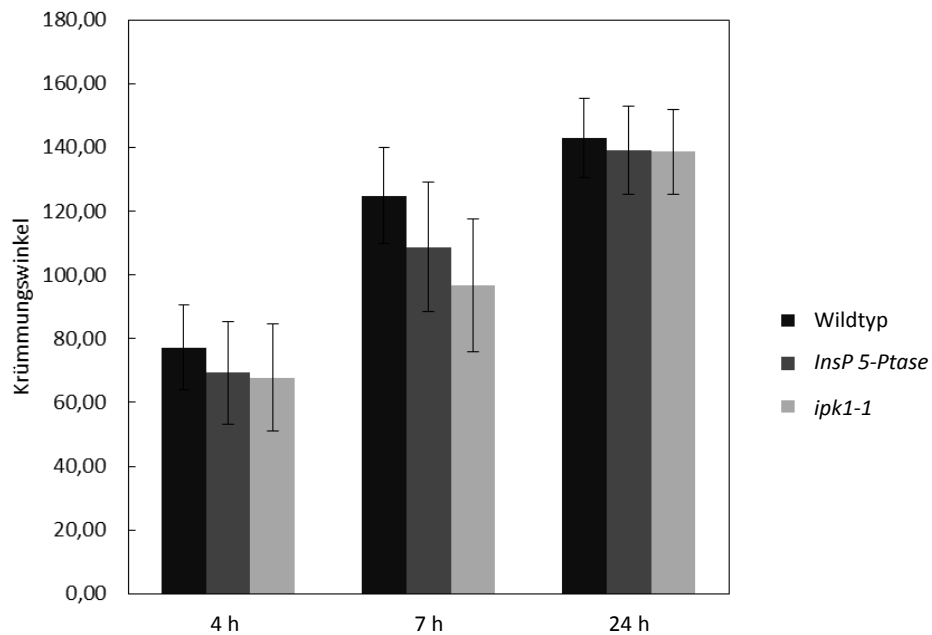


Abb. A.1.: Im Langtag für sechs Tage angezogene Keimlinge des Wildtyps, der *InsP 5-Ptase*-Pflanzen und der *ipk1-1*-Mutante wurden auf ihre Krümmungseigenschaften ihrer Wurzeln nach 4, 7 und 24 h gravitroper Stimulation untersucht. Das Experiment wurde 1-mal durchgeführt als Verifizierung der gewonnenen Daten, die mit im Dunkeln angezogenen Keimlingen gewonnen wurden.

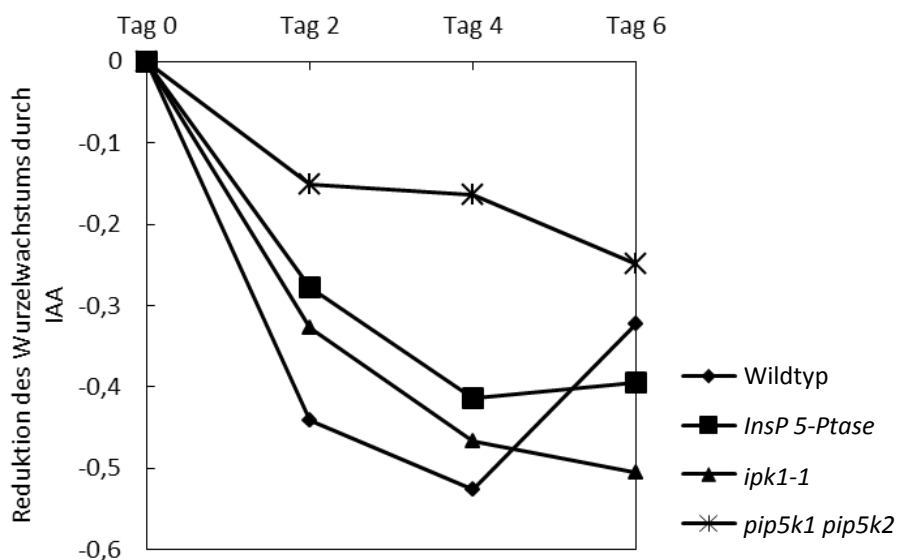


Abb. A.2.: Im Langtag gezogene Keimlinge wurden nach sechs Tagen auf MS-Medium mit 20 nM IAA umgesetzt. Dargestellt ist die Reduktion des Wurzelwachstums alle zwei Tage nach Umsetzen der Keimlinge. Getestet wurden neben Wildtyp die Linien *pip5k1 pip5k2*-Doppelmutanten, *InsP 5-Ptase*-Pflanze und *ipk1-1*-Mutanten.

7. Literaturverzeichnis

- Abas, L., Benjamins, R., Malenica, N., Paciorek, T., Wisniewska, J., Moulinier-Anzola, J.C., Sieberer, T., Friml, J., Luschnig, C. (2006) Intracellular trafficking and proteolysis of the Arabidopsis auxin-efflux facilitator PIN2 are involved in root gravitropism. *Nat Cell Biol*, **8**(3), 249-256.
- Audhya, A., Foti, M., Emr, S.D. (2000) Distinct roles for the yeast phosphatidylinositol 4-kinases, Stt4p and Pik1p, in secretion, cell growth, and organelle membrane dynamics. *Mol Biol Cell*, **11**(8), 2673-2689.
- Bargmann, B.O., Laxalt, A.M., ter Riet, B., Testerink, C., Merquiol, E., Mosblech, A., Leon-Reyes, A., Pieterse, C.M., Haring, M.A., Heilmann, I., Bartels, D., Munnik, T. (2009) Reassessing the role of phospholipase D in the Arabidopsis wounding response. *Plant Cell Environ*, **32**(7), 837-850.
- Benjamins, R., Quint, A., Weijers, D., Hooykaas, P., Offringa, R. (2001) The PINOID protein kinase regulates organ development in Arabidopsis by enhancing polar auxin transport. *Development*, **128**(20), 4057-4067.
- 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**(5277), 948-950.
- Berwin, B., Floor, E., Martin, T.F. (1998) CAPS (mammalian UNC-31) protein localizes to membranes involved in dense-core vesicle exocytosis. *Neuron*, **21**(1), 137-145.
- Blilou, I., Xu, J., Wildwater, M., Willemsen, V., Paponov, I., Friml, J., Heidstra, R., Aida, M., Palme, K., Scheres, B. (2005) The PIN auxin efflux facilitator network controls growth and patterning in Arabidopsis roots. *Nature*, **433**(7021), 39-44.
- Camacho, L., Smertenko, A.P., Perez-Gomez, J., Hussey, P.J., Moore, I. (2009) Arabidopsis Rab-E GTPases exhibit a novel interaction with a plasma-membrane phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase. *J Cell Sci*, **122**(Pt 23), 4383-4392.
- Carrier, D.J., Bakar, N.T., Swarup, R., Callaghan, R., Napier, R.M., Bennett, M.J., Kerr, I.D. (2008) The binding of auxin to the Arabidopsis auxin influx transporter AUX1. *Plant Physiol*, **148**(1), 529-535.
- Chen, X., Naramoto, S., Robert, S., Tejos, R., Lofke, C., Lin, D., Yang, Z., Friml, J. (2012) ABP1 and ROP6 GTPase signaling regulate clathrin-mediated endocytosis in Arabidopsis roots. *Curr Biol*, **22**(14), 1326-1332.
- Cheng, Y., Dai, X., Zhao, Y. (2004) AtCAND1, a HEAT-repeat protein that participates in auxin signaling in Arabidopsis. *Plant Physiol*, **135**(2), 1020-1026.
- Cholodny, N. (1926) Beiträge zur Analyse der geotropischen Reaktion. *Jahrbuch Wiss. Bot* **65**, 447-459.
- Chomczynski, P. and Mackey, K. (1995) Short technical reports. Modification of the TRI reagent procedure for isolation of RNA from polysaccharide- and proteoglycan-rich sources. *Biotechniques*, **19**(6), 942-945.
- Costacurta, A., Keijers, V., Vanderleyden, J. (1994) Molecular cloning and sequence analysis of an *Azospirillum brasilense* indole-3-pyruvate decarboxylase gene. *Mol Gen Genet*, **243**(4), 463-472.

- Darwin, F., Darwin, C. (1880) *The Power of Movement in Plants*. John Murray, London.
- Davis, A.J., Im, Y.J., Dubin, J.S., Tomer, K.B., Boss, W.F. (2007) Arabidopsis phosphatidylinositol phosphate kinase 1 binds F-actin and recruits phosphatidylinositol 4-kinase beta1 to the actin cytoskeleton. *J Biol Chem*, **282**(19), 14121-14131.
- Desprez, T., Juraniec, M., Crowell, E.F., Jouy, H., Pochylova, Z., Parcy, F., Hofte, H., Gonneau, M., Vernhettes, S. (2007) Organization of cellulose synthase complexes involved in primary cell wall synthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**(39), 15572-15577.
- Desrivieres, S., Cooke, F.T., Morales-Johansson, H., Parker, P.J., Hall, M.N. (2002) Calmodulin controls organization of the actin cytoskeleton via regulation of phosphatidylinositol (4,5)-biphosphate synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem J*, **366**(Pt 3), 945-951.
- Dhonukshe, P., Huang, F., Galvan-Ampudia, C.S., Mahonen, A.P., Kleine-Vehn, J., Xu, J., Quint, A., Prasad, K., Friml, J., Scheres, B., Offringa, R. (2010) Plasma membrane-bound AGC3 kinases phosphorylate PIN auxin carriers at TPRXS(N/S) motifs to direct apical PIN recycling. *Development*, **137**(19), 3245-3255.
- Dhonukshe, P., Tanaka, H., Goh, T., Ebine, K., Mahonen, A.P., Prasad, K., Blilou, I., Geldner, N., Xu, J., Uemura, T., Chory, J., Ueda, T., Nakano, A., Scheres, B., Friml, J. (2008) Generation of cell polarity in plants links endocytosis, auxin distribution and cell fate decisions. *Nature*, **456**(7224), 962-966.
- Faure, J. and Dagher, M.C. (2001) Interactions between Rho GTPases and Rho GDP dissociation inhibitor (Rho-GDI). *Biochimie*, **83**(5), 409-414.
- Faure, J., Vignais, P.V., Dagher, M.C. (1999) Phosphoinositide-dependent activation of Rho A involves partial opening of the RhoA/Rho-GDI complex. *Eur J Biochem*, **262**(3), 879-889.
- Feraru, E., Feraru, M.I., Kleine-Vehn, J., Martiniere, A., Mouille, G., Vanneste, S., Vernhettes, S., Runions, J., Friml, J. (2011) PIN polarity maintenance by the cell wall in *Arabidopsis*. *Curr Biol*, **21**(4), 338-343.
- Friml, J. (2003) Auxin transport - shaping the plant. *Curr Opin Plant Biol*, **6**(1), 7-12.
- Friml, J., Benkova, E., Blilou, I., Wisniewska, J., Hamann, T., Ljung, K., Woody, S., Sandberg, G., Scheres, B., Jurgens, G., Palme, K. (2002a) AtPIN4 mediates sink-driven auxin gradients and root patterning in *Arabidopsis*. *Cell*, **108**(5), 661-673.
- Friml, J., Wisniewska, J., Benkova, E., Mendgen, K., Palme, K. (2002b) Lateral relocation of auxin efflux regulator PIN3 mediates tropism in *Arabidopsis*. *Nature*, **415**(6873), 806-809.
- Fu, H., Reis, N., Lee, Y., Glickman, M.H., Vierstra, R.D. (2001) Subunit interaction maps for the regulatory particle of the 26S proteasome and the COP9 signalosome. *EMBO J*, **20**(24), 7096-7107.
- Fukaki, H., Fujisawa, H., Tasaka, M. (1996) Gravitropic response of inflorescence stems in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol*, **110**(3), 933-943.
- Galvao, R.M., Kota, U., Soderblom, E.J., Goshe, M.B., Boss, W.F. (2008) Characterization of a new family of protein kinases from *Arabidopsis* containing phosphoinositide 3/4-kinase and ubiquitin-like domains. *Biochem J*, **409**, 117-127.

- Gaudin, V., Camilleri, C., Jouanin, L. (1993) Multiple regions of a divergent promoter control the expression of the *Agrobacterium rhizogenes* aux1 and aux2 plant oncogenes. *Mol Gen Genet*, **239**(1-2), 225-234.
- Geldner, N., Anders, N., Wolters, H., Keicher, J., Kornberger, W., Muller, P., Delbarre, A., Ueda, T., Nakano, A., Jurgens, G. (2003) The Arabidopsis GNOM ARF-GEF mediates endosomal recycling, auxin transport, and auxin-dependent plant growth. *Cell*, **112**(2), 219-230.
- Goh, T., Uchida, W., Arakawa, S., Ito, E., Dainobu, T., Ebine, K., Takeuchi, M., Sato, K., Ueda, T., Nakano, A. (2007) VPS9a, the common activator for two distinct types of Rab5 GTPases, is essential for the development of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*, **19**(11), 3504-3515.
- Guo, W., Roth, D., Walch-Solimena, C., Novick, P. (1999) The exocyst is an effector for Sec4p, targeting secretory vesicles to sites of exocytosis. *EMBO J*, **18**(4), 1071-1080.
- Hansen, B.G. and Halkier, B.A. (2005) New insight into the biosynthesis and regulation of indole compounds in *Arabidopsis thaliana*. *Planta*, **221**(5), 603-606.
- Hansen, H. and Grossmann, K. (2000) Auxin-induced ethylene triggers abscisic acid biosynthesis and growth inhibition. *Plant Physiol*, **124**(3), 1437-1348.
- Hao, G.F. and Yang, G.F. (2010) The role of Phe82 and Phe351 in auxin-induced substrate perception by TIR1 ubiquitin ligase: a novel insight from molecular dynamics simulations. *PLoS One*, **5**(5), e10742.
- Hay, J.C., Fiset, P.L., Jenkins, G.H., Fukami, K., Takenawa, T., Anderson, R.A., Martin, T.F. (1995) ATP-dependent inositide phosphorylation required for Ca(2+)-activated secretion. *Nature*, **374**(6518), 173-177.
- He, B., Xi, F., Zhang, X., Zhang, J., Guo, W. (2007) Exo70 interacts with phospholipids and mediates the targeting of the exocyst to the plasma membrane. *EMBO J*, **26**(18), 4053-4065.
- Heilmann, I. (2009) Using genetic tools to understand plant phosphoinositide signalling. *Trends Plant Sci*, **14**, 171-179.
- Heilmann, I., Perera, I.Y., Gross, W., Boss, W.F. (1999) Changes in phosphoinositide metabolism with days in culture affect signal transduction pathways in *Galdieria sulphuraria*. *Plant Physiol*, **119**(4), 1331-1339.
- Hilgemann, D.W. and Ball, R. (1996) Regulation of cardiac Na⁺,Ca²⁺ exchange and KATP potassium channels by PIP2. *Science*, **273**(5277), 956-959.
- Holstein, S.E. and Oliviusson, P. (2005) Sequence analysis of *Arabidopsis thaliana* E/ANTH-domain-containing proteins: membrane tethers of the clathrin-dependent vesicle budding machinery. *Protoplasma*, **226**(1-2), 13-21.
- Hsu, S.C., Hazuka, C.D., Foletti, D.L., Scheller, R.H. (1999) Targeting vesicles to specific sites on the plasma membrane: the role of the sec6/8 complex. *Trends Cell Biol*, **9**(4), 150-153.
- Hsu, S.C., TerBush, D., Abraham, M., Guo, W. (2004) The exocyst complex in polarized exocytosis. *Int Rev Cytol*, **233**, 243-265.
- Hull, A.K., Vij, R., Celenza, J.L. (2000) Arabidopsis cytochrome P450s that catalyze the first step of tryptophan-dependent indole-3-acetic acid biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**(5), 2379-2384.

- Ischebeck, T. and Heilmann, I. (2010) PIP-kinases as key regulators of plant function. In *Lipid Signaling in Plants* (T. Munnik, ed, Springer, Berlin, Germany: pp 79-93).
- Ischebeck, T., Seiler, S., Heilmann, I. (2010) At the poles across kingdoms: phosphoinositides and polar tip growth. *Protoplasma*, **240**, 13-31.
- Ischebeck, T., Stenzel, I., Heilmann, I. (2008) Type B phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinases mediate pollen tube growth in *Nicotiana tabacum* and *Arabidopsis* by regulating apical pectin secretion. *Plant Cell*, **20**, 3312-3330.
- Ischebeck, T., Stenzel, I., Hempel, F., Jin, X., Mosblech, A., Heilmann, I. (2011) Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate influences Nt-Rac5-mediated cell expansion in pollen tubes of *Nicotiana tabacum*. *Plant J*, **65**, 453-468.
- Janke, C., Magiera, M.M., Rathfelder, N., Taxis, C., Reber, S., Maekawa, H., Moreno-Borchart, A., Doenges, G., Schwob, E., Schiebel, E., Knop, M. (2004) A versatile toolbox for PCR-based tagging of yeast genes: new fluorescent proteins, more markers and promoter substitution cassettes. *Yeast*, **21**(11), 947-962.
- Justin, A.M., Kader, J.C., Collin, S. (2002) Phosphatidylinositol synthesis and exchange of the inositol head are catalysed by the single phosphatidylinositol synthase 1 from *Arabidopsis*. *Eur J Biochem*, **269**(9), 2347-2352.
- Kleine-Vehn, J., Dhonukshe, P., Sauer, M., Brewer, P.B., Wisniewska, J., Paciorek, T., Benkova, E., Friml, J. (2008) ARF GEF-dependent transcytosis and polar delivery of PIN auxin carriers in *Arabidopsis*. *Curr Biol*, **18**(7), 526-531.
- Kleine-Vehn, J., Huang, F., Naramoto, S., Zhang, J., Michniewicz, M., Offringa, R., Friml, J. (2009) PIN auxin efflux carrier polarity is regulated by PINOID kinase-mediated recruitment into GNOM-independent trafficking in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **21**(12), 3839-3849.
- Kobayashi, T., Takematsu, H., Yamaji, T., Hiramoto, S., Kozutsumi, Y. (2005) Disturbance of sphingolipid biosynthesis abrogates the signaling of Mss4, phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase, in yeast. *J Biol Chem*, **280**(18), 18087-18094.
- König, S., Ischebeck, T., Lerche, J., Stenzel, I., Heilmann, I. (2008) Salt stress-induced association of phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate with clathrin-coated vesicles in plants. *Biochem J*, **415**, 387-399.
- König, S., Mosblech, A., Heilmann, I. (2007) Stress-inducible and constitutive phosphoinositide pools have distinct fatty acid patterns in *Arabidopsis thaliana*. *FASEB J*, **21**, 1958-1967.
- Kost, B. (2008) Spatial control of Rho (Rac-Rop) signaling in tip-growing plant cells. *Trends Cell Biol*, **18**(3), 119-127.
- Krecek, P., Skupa, P., Libus, J., Naramoto, S., Tejos, R., Friml, J., Zazimalova, E. (2009) The PIN-FORMED (PIN) protein family of auxin transporters. *Genome Biol*, **10**(12), 249.
- Krouk, G., Lacombe, B., Bielach, A., Perrine-Walker, F., Malinska, K., Mounier, E., Hoyerova, K., Tillard, P., Leon, S., Ljung, K., Zazimalova, E., Benkova, E., Nacry, P., Gojon, A. (2010) Nitrate-regulated auxin transport by NRT1.1 defines a mechanism for nutrient sensing in plants. *Dev Cell*, **18**(6), 927-937.
- Kusano, H., Testerink, C., Vermeer, J.E.M., Tsuge, T., Shimada, H., Oka, A., Munnik, T., Aoyama, T. (2008) The *Arabidopsis* phosphatidylinositol phosphate 5-

- kinase PIP5K3 is a key regulator of root hair tip growth. *Plant Cell*, **20**, 367-380.
- Laux, T. and Jurgens, G. (1997) Embryogenesis: A New Start in Life. *Plant Cell*, **9**(7), 989-1000.
- Lavy, M., Bloch, D., Hazak, O., Gutman, I., Poraty, L., Sorek, N., Sternberg, H., Yalovsky, S. (2007) A Novel ROP/RAC effector links cell polarity, root-meristem maintenance, and vesicle trafficking. *Curr Biol*, **17**(11), 947-952.
- Lee, S., Hirt, H., Lee, Y. (2001) Phosphatidic acid activates a wound-activated MAPK in *Glycine max*. *Plant J*, **26**(5), 479-486.
- Lee, Y., Kim, Y.W., Jeon, B.W., Park, K.Y., Suh, S.J., Seo, J., Kwak, J.M., Martinoia, E., Hwang, I. (2007) Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate is important for stomatal opening. *Plant J*, **52**(5), 803-816.
- Lemcke, K., Prinsen, E., van Onckelen, H., Schmulling, T. (2000) The ORF8 gene product of *Agrobacterium rhizogenes* TL-DNA has tryptophan 2-monooxygenase activity. *Mol Plant Microbe Interact*, **13**(7), 787-790.
- Lemtiri-Chlieh, F., MacRobbie, E.A., Brearley, C.A. (2000) Inositol hexakisphosphate is a physiological signal regulating the K⁺-inward rectifying conductance in guard cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**(15), 8687-8692.
- Liang, M., Davis, E., Gardner, D., Cai, X., Wu, Y. (2006) Involvement of AtLAC15 in lignin synthesis in seeds and in root elongation of *Arabidopsis*. *Planta*, **224**(5), 1185-1196.
- Livak, K.J. and Schmittgen, T.D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, **25**(4), 402-408.
- Ljung, K., Bhalerao, R.P., Sandberg, G. (2001) Sites and homeostatic control of auxin biosynthesis in *Arabidopsis* during vegetative growth. *Plant J*, **28**(4), 465-474.
- Löfke, C., Ischebeck, T., König, S., Freitag, S., Heilmann, I. (2008) Alternative metabolic fates of phosphatidylinositol produced by PI-synthase isoforms in *Arabidopsis thaliana*. *Biochem J*, **413**, 115-124.
- Lofke, C., Luschnig, C., Kleine-Vehn, J. (2012) Posttranslational modification and trafficking of PIN auxin efflux carriers. *Mech Dev*.
- Ludwig-Muller, J. (2011) Auxin conjugates: their role for plant development and in the evolution of land plants. *J Exp Bot*, **62**(6), 1757-1773.
- Ma, X., Shor, O., Diminshtein, S., Yu, L., Im, Y.J., Perera, I., Lomax, A., Boss, W.F., Moran, N. (2009) Phosphatidylinositol (4,5)bisphosphate inhibits K⁺-efflux channel activity in NT1 tobacco cultured cells. *Plant Physiol*, **149**(2), 1127-1140.
- MacCleery, S.A. and Kiss, J.Z. (1999) Plastid sedimentation kinetics in roots of wild-type and starch-deficient mutants of *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, **120**(1), 183-192.
- Mano, Y. and Nemoto, K. (2012) The pathway of auxin biosynthesis in plants. *J Exp Bot*, **63**(8), 2853-2872.
- Marchant, A., Bhalerao, R., Casimiro, I., Eklof, J., Casero, P.J., Bennett, M., Sandberg, G. (2002) AUX1 promotes lateral root formation by facilitating indole-3-acetic acid distribution between sink and source tissues in the *Arabidopsis* seedling. *Plant Cell*, **14**(3), 589-597.
- Marchant, A., Kargul, J., May, S.T., Muller, P., Delbarre, A., Perrot-Rechenmann, C., Bennett, M.J. (1999) AUX1 regulates root gravitropism in *Arabidopsis* by

- facilitating auxin uptake within root apical tissues. *EMBO J*, **18**(8), 2066-2073.
- Marrocco, K., Lecureuil, A., Nicolas, P., Guerche, P. (2003) The Arabidopsis SKP1-like genes present a spectrum of expression profiles. *Plant Mol Biol*, **52**(4), 715-727.
- Mashiguchi, K., Tanaka, K., Sakai, T., Sugawara, S., Kawaide, H., Natsume, M., Hanada, A., Yaeno, T., Shirasu, K., Yao, H., McSteen, P., Zhao, Y., Hayashi, K., Kamiya, Y., Kasahara, H. (2011) The main auxin biosynthesis pathway in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **108**(45), 18512-18517.
- Mei, Y., Jia, W.J., Chu, Y.J., Xue, H.W. (2012) Arabidopsis phosphatidylinositol monophosphate 5-kinase 2 is involved in root gravitropism through regulation of polar auxin transport by affecting the cycling of PIN proteins. *Cell Res*, **22**(3), 581-597.
- Meijer, H.J. and Munnik, T. (2003) Phospholipid-based signaling in plants. *Annu Rev Plant Biol*, **54**, 265-306.
- Mendel, R.R. and Bittner, F. (2006) Cell biology of molybdenum. *Biochim Biophys Acta*, **1763**(7), 621-635.
- Moon, J., Parry, G., Estelle, M. (2004) The ubiquitin-proteasome pathway and plant development. *Plant Cell*, **16**(12), 3181-3195.
- Morita, M.T. (2010) Directional gravity sensing in gravitropism. *Annu Rev Plant Biol*, **61**, 705-720.
- Mosblech, A., König, S., Stenzel, I., Grzeganeck, P., Feussner, I., Heilmann, I. (2008) Phosphoinositide and inositolpolyphosphate-signaling in defense responses of *Arabidopsis thaliana* challenged by mechanical wounding. *Molecular Plant*, **1**, 249-261.
- Mosblech, A., Thurow, C., Gatz, C., Feussner, I., Heilmann, I. (2011) Jasmonic acid perception by COI1 involves inositol polyphosphates in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, **65**, 949-957.
- Mravec, J., Skupa, P., Bailly, A., Hoyerova, K., Krecek, P., Bielach, A., Petrasek, J., Zhang, J., Gaykova, V., Stierhof, Y.D., Dobrev, P.I., Schwarzerova, K., Rolcik, J., Seifertova, D., Luschnig, C., Benkova, E., Zazimalova, E., Geisler, M., Friml, J. (2009) Subcellular homeostasis of phytohormone auxin is mediated by the ER-localized PIN5 transporter. *Nature*, **459**(7250), 1136-1140.
- Mueller-Roeber, B. and Pical, C. (2002) Inositol phospholipid metabolism in Arabidopsis. Characterized and putative isoforms of inositol phospholipid kinase and phosphoinositide-specific phospholipase C. *Plant Physiol*, **130**(1), 22-46.
- 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.
- Munnik, T. (2001) Phosphatidic acid: an emerging plant lipid second messenger. *Trends Plant Sci*, **6**(5), 227-233.
- Nemoto, K., Hara, M., Suzuki, M., Seki, H., Muranaka, T., Mano, Y. (2009) The NtAMI1 gene functions in cell division of tobacco BY-2 cells in the presence of indole-3-acetamide. *FEBS Lett*, **583**(2), 487-492.
- Ohlrogge, J. and Browse, J. (1995) Lipid biosynthesis. *Plant Cell*, **7**(7), 957-970.

- Ojala, P.J., Paavilainen, V., Lappalainen, P. (2001) Identification of yeast cofilin residues specific for actin monomer and PIP2 binding. *Biochemistry*, **40**(51), 15562-15569.
- Ormo, M., Cubitt, A.B., Kallio, K., Gross, L.A., Tsien, R.Y., Remington, S.J. (1996) Crystal structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein. *Science*, **273**(5280), 1392-1395.
- Parry, G., Ward, S., Cernac, A., Dharmasiri, S., Estelle, M. (2006) The Arabidopsis SUPPRESSOR OF AUXIN RESISTANCE proteins are nucleoporins with an important role in hormone signaling and development. *Plant Cell*, **18**(7), 1590-1603.
- Pedras, M.S., Nycholat, C.M., Montaut, S., Xu, Y., Khan, A.Q. (2002) Chemical defenses of crucifers: elicitation and metabolism of phytoalexins and indole-3-acetonitrile in brown mustard and turnip. *Phytochemistry*, **59**(6), 611-625.
- Perera, I.Y., Heilmann, I., Boss, W.F. (1999) Transient and sustained increases in inositol 1,4,5-trisphosphate precede the differential growth response in gravistimulated maize pulvini. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**(10), 5838-5843.
- Perera, 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**(3), 1499-1507.
- Perera, I.Y., Hung, C.Y., Brady, S., Muday, G.K., Boss, W.F. (2006) A universal role for inositol 1,4,5-trisphosphate-mediated signaling in plant gravitropism. *Plant Physiol*, **140**(2), 746-760.
- Perera, I.Y., Hung, C.Y., Moore, C.D., Stevenson-Paulik, J., Boss, W.F. (2008) Transgenic Arabidopsis Plants Expressing the Type 1 Inositol 5-Phosphatase Exhibit Increased Drought Tolerance and Altered Abscisic Acid Signaling. *Plant Cell*, **20**, 2876-2893.
- Perera, I.Y., Love, J., Heilmann, I., Thompson, W.F., Boss, W.F. (2002) Up-regulation of phosphoinositide metabolism in tobacco cells constitutively expressing the human type I inositol polyphosphate 5-phosphatase. *Plant Physiol*, **129**(4), 1795-1806.
- Pickart, C.M. (2001) Mechanisms underlying ubiquitination. *Annu Rev Biochem*, **70**, 503-533.
- Pickett, F.B., Wilson, A.K., Estelle, M. (1990) The *aux1* Mutation of Arabidopsis Confers Both Auxin and Ethylene Resistance. *Plant Physiol*, **94**(3), 1462-1466.
- Pollmann, S., Muller, A., Piotrowski, M., Weiler, E.W. (2002) Occurrence and formation of indole-3-acetamide in *Arabidopsis thaliana*. *Planta*, **216**(1), 155-161.
- Pollmann, S., Neu, D., Weiler, E.W. (2003) Molecular cloning and characterization of an amidase from *Arabidopsis thaliana* capable of converting indole-3-acetamide into the plant growth hormone, indole-3-acetic acid. *Phytochemistry*, **62**(3), 293-300.
- Preuss, M.L., Schmitz, A.J., Thole, J.M., Bonner, H.K., Otegui, M.S., Nielsen, E. (2006) A role for the RabA4b effector protein PI-4Kbeta1 in polarized expansion of root hair cells in *Arabidopsis thaliana*. *J Cell Biol*, **172**(7), 991-998.
- Quittenden, L.J., Davies, N.W., Smith, J.A., Molesworth, P.P., Tivendale, N.D., Ross, J.J. (2009) Auxin biosynthesis in pea: characterization of the tryptamine pathway. *Plant Physiol*, **151**(3), 1130-1138.

- Radwanski, E.R. and Last, R.L. (1995) Tryptophan biosynthesis and metabolism: biochemical and molecular genetics. *Plant Cell*, **7**(7), 921-934.
- Rashotte, A.M., Brady, S.R., Reed, R.C., Ante, S.J., Muday, G.K. (2000) Basipetal auxin transport is required for gravitropism in roots of *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, **122**(2), 481-490.
- Rebecchi, M.J. and Pentylala, S.N. (2000) Structure, function, and control of phosphoinositide-specific phospholipase C. *Physiol Rev*, **80**(4), 1291-1335.
- Rhee, S.G., Suh, P.G., Ryu, S.H., Lee, S.Y. (1989) Studies of inositol phospholipid-specific phospholipase C. *Science*, **244**(4904), 546-550.
- Risseuw, E.P., Daskalchuk, T.E., Banks, T.W., Liu, E., Cotelesage, J., Hellmann, H., Estelle, M., Somers, D.E., Crosby, W.L. (2003) Protein interaction analysis of SCF ubiquitin E3 ligase subunits from *Arabidopsis*. *Plant J*, **34**(6), 753-767.
- Robert, S., Kleine-Vehn, J., Barbez, E., Sauer, M., Paciorek, T., Baster, P., Vanneste, S., Zhang, J., Simon, S., Covanova, M., Hayashi, K., Dhonukshe, P., Yang, Z., Bednarek, S.Y., Jones, A.M., Luschnig, C., Aniento, F., Zazimalova, E., Friml, J. (2010) ABP1 mediates auxin inhibition of clathrin-dependent endocytosis in *Arabidopsis*. *Cell*, **143**(1), 111-121.
- Rozelle, A.L., Machesky, L.M., Yamamoto, M., Driessens, M.H., Insall, R.H., Roth, M.G., Luby-Phelps, K., Marriott, G., Hall, A., Yin, H.L. (2000) Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate induces actin-based movement of raft-enriched vesicles through WASP-Arp2/3. *Curr Biol*, **10**(6), 311-320.
- Rupwate, S.D. and Rajasekharan, R. (2012) Plant phosphoinositide-specific phospholipase C: An insight. *Plant Signal Behav*, **7**(10).
- Santarius, M., Lee, C.H., Anderson, R.A. (2006) Supervised membrane swimming: small G-protein lifeguards regulate PIPK signalling and monitor intracellular PtdIns(4,5)P₂ pools. *Biochem J*, **398**(1), 1-13.
- Santner, A. and Estelle, M. (2010) The ubiquitin-proteasome system regulates plant hormone signaling. *Plant J*, **61**(6), 1029-1040.
- Sauer, M. and Kleine-Vehn, J. (2011) AUXIN BINDING PROTEIN1: the outsider. *Plant Cell*, **23**(6), 2033-2043.
- Scherer, G.F., Labusch, C., Effendi, Y. (2012) Phospholipases and the Network of Auxin Signal Transduction with ABP1 and TIR1 as Two Receptors: A Comprehensive and Provocative Model. *Frontiers Plant Science*, **3**, 56.
- Schillmiller, A.L. and Howe, G.A. (2005) Systemic signaling in the wound response. *Curr Opin Plant Biol*, **8**(4), 369-377.
- Schmid, M., Davison, T.S., Henz, S.R., Pape, U.J., Demar, M., Vingron, M., Schölkopf, B., Weigel, D., Lohmann, J.U. (2005) A gene expression map of *Arabidopsis thaliana* development. *Nat Genet*, **37**, 501-506.
- Schorr, M., Then, A., Tahirovic, S., Hug, N., Mayinger, P. (2001) The phosphoinositide phosphatase Sac1p controls trafficking of the yeast Chs3p chitin synthase. *Curr Biol*, **11**(18), 1421-1426.
- Seo, M., Akaba, S., Oritani, T., Delarue, M., Bellini, C., Caboche, M., Koshiba, T. (1998) Higher activity of an aldehyde oxidase in the auxin-overproducing superroot1 mutant of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol*, **116**(2), 687-693.
- Sheard, L.B., Tan, X., Mao, H., Withers, J., Ben-Nissan, G., Hinds, T.R., Kobayashi, Y., Hsu, F.F., Sharon, M., Browse, J., He, S.Y., Rizo, J., Howe, G.A., Zheng, N. (2010) Jasmonate perception by inositol-phosphate-potentiated COI1-JAZ co-receptor. *Nature*, **468**(7322), 400-405.

- Shibasaki, Y., Ishihara, H., Kizuki, N., Asano, T., Oka, Y., Yazaki, Y. (1997) Massive actin polymerization induced by phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase in vivo. *J Biol Chem*, **272**(12), 7578-7581.
- Shimomura, O., Johnson, F.H., Saiga, Y. (1962) Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*. *J Cell Comp Physiol*, **59**, 223-239.
- Songstad, D.D., De Luca, V., Brisson, N., Kurz, W.G., Nessler, C.L. (1990) High levels of tryptamine accumulation in transgenic tobacco expressing tryptophan decarboxylase. *Plant Physiol*, **94**(3), 1410-1413.
- Sousa, E., Kost, B., Malho, R. (2008) Arabidopsis Phosphatidylinositol-4-Monophosphate 5-Kinase 4 Regulates Pollen Tube Growth and Polarity by Modulating Membrane Recycling. *Plant Cell*, **20**, 3050-3064.
- Stenzel, I., Ischebeck, T., König, S., Holubowska, A., Sporysz, M., Hause, B., Heilmann, I. (2008) The type B phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase 3 is essential for root hair formation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*, **20**, 124-141.
- Stenzel, I., Ischebeck, T., Quint, M., Heilmann, I. (2012) Variable regions of PI4P 5-kinases direct PtdIns(4,5)P₂ toward alternative regulatory functions in tobacco pollen tubes. *Frontiers Plant Science*, **2**(114), 1-14.
- Stepanova, A.N., Robertson-Hoyt, J., Yun, J., Benavente, L.M., Xie, D.Y., Dolezal, K., Schlereth, A., Jurgens, G., Alonso, J.M. (2008) TAA1-mediated auxin biosynthesis is essential for hormone crosstalk and plant development. *Cell*, **133**(1), 177-191.
- Stevenson-Paulik, J., Bastidas, R.J., Chiou, S.T., Frye, R.A., York, J.D. (2005) Generation of phytate-free seeds in Arabidopsis through disruption of inositol polyphosphate kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**(35), 12612-12617.
- Stevenson-Paulik, J., Love, J., Boss, W.F. (2003) Differential regulation of two Arabidopsis type III phosphatidylinositol 4-kinase isoforms. A regulatory role for the pleckstrin homology domain. *Plant Physiol*, **132**(2), 1053-1064.
- Stevenson, J.M., Perera, I.Y., Heilmann, I., Persson, S., Boss, W.F. (2000) Inositol signaling and plant growth. *Trends Plant Sci*, **5**(6), 252-258.
- Strahl, T., Hama, H., DeWald, D.B., Thorner, J. (2005) Yeast phosphatidylinositol 4-kinase, Pik1, has essential roles at the Golgi and in the nucleus. *J Cell Biol*, **171**(6), 967-979.
- Strahl, T. and Thorner, J. (2007) Synthesis and function of membrane phosphoinositides in budding yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta*, **1771**(3), 353-404.
- Sugawara, S., Hishiyama, S., Jikumaru, Y., Hanada, A., Nishimura, T., Koshiba, T., Zhao, Y., Kamiya, Y., Kasahara, H. (2009) Biochemical analyses of indole-3-acetaldoxime-dependent auxin biosynthesis in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **106**(13), 5430-5435.
- 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**(20), 2648-2653.
- Szumanski, A.L. and Nielsen, E. (2009) The Rab GTPase RabA4d regulates pollen tube tip growth in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*, **21**(2), 526-544.

- Takahashi, N., Kuroda, H., Kuromori, T., Hirayama, T., Seki, M., Shinozaki, K., Shimada, H., Matsui, M. (2004) Expression and interaction analysis of Arabidopsis Skp1-related genes. *Plant Cell Physiol*, **45**(1), 83-91.
- Tan, X., Calderon-Villalobos, L.I., Sharon, M., Zheng, C., Robinson, C.V., Estelle, M., Zheng, N. (2007) Mechanism of auxin perception by the TIR1 ubiquitin ligase. *Nature*, **446**(7136), 640-645.
- Tanaka, M., Takei, K., Kojima, M., Sakakibara, H., Mori, H. (2006) Auxin controls local cytokinin biosynthesis in the nodal stem in apical dominance. *Plant J*, **45**(6), 1028-1036.
- Tasma, I.M., Brendel, V., Whitham, S.A., Bhattacharyya, M.K. (2008) Expression and evolution of the phosphoinositide-specific phospholipase C gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology and Biochemistry*, **46**, 627-637.
- Teale, W.D., Paponov, I.A., Palme, K. (2006) Auxin in action: signalling, transport and the control of plant growth and development. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **7**(11), 847-859.
- TerBush, D.R., Maurice, T., Roth, D., Novick, P. (1996) The Exocyst is a multiprotein complex required for exocytosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J*, **15**(23), 6483-6494.
- Tivendale, N.D., Davies, N.W., Molesworth, P.P., Davidson, S.E., Smith, J.A., Lowe, E.K., Reid, J.B., Ross, J.J. (2010) Reassessing the role of N-hydroxytryptamine in auxin biosynthesis. *Plant Physiol*, **154**(4), 1957-1965.
- Ugartechea-Chirino, Y., Swarup, R., Swarup, K., Peret, B., Whitworth, M., Bennett, M., Bougourd, S. (2010) The AUX1 LAX family of auxin influx carriers is required for the establishment of embryonic root cell organization in *Arabidopsis thaliana*. *Ann Bot*, **105**(2), 277-289.
- Ugolev, Y., Berdichevsky, Y., Weinbaum, C., Pick, E. (2008) Dissociation of Rac1(GDP).RhoGDI complexes by the cooperative action of anionic liposomes containing phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate, Rac guanine nucleotide exchange factor, and GTP. *J Biol Chem*, **283**(32), 22257-22271.
- van der Bliek, A.M. (2005) A sixth sense for Rab5. *Nat Cell Biol*, **7**(6), 548-550.
- Vicogne, J., Vollenweider, D., Smith, J.R., Huang, P., Frohman, M.A., Pessin, J.E. (2006) Asymmetric phospholipid distribution drives in vitro reconstituted SNARE-dependent membrane fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**(40), 14761-14766.
- Voges, D., Zwickl, P., Baumeister, W. (1999) The 26S proteasome: a molecular machine designed for controlled proteolysis. *Annu Rev Biochem*, **68**, 1015-1068.
- Walch-Solimena, C. and Novick, P. (1999) The yeast phosphatidylinositol-4-OH kinase pik1 regulates secretion at the Golgi. *Nat Cell Biol*, **1**(8), 523-525.
- Wang, C., Zien, C.A., Afithile, M., Welti, R., Hildebrand, D.F., Wang, X. (2000) Involvement of phospholipase D in wound-induced accumulation of jasmonic acid in Arabidopsis. *Plant Cell*, **12**(11), 2237-2246.
- Wasteneys, G.O. and Galway, M.E. (2003) Remodeling the cytoskeleton for growth and form: an overview with some new views. *Annu Rev Plant Biol*, **54**, 691-722.
- Went, F. (1926) On growth accelerating substances in the coleoptile of *Avena sativa*. *Proc. K. Akad. Wetensch. Amsterdam* **30**, 10-19

- Whippo, C.W. and Hangarter, R.P. (2006) Phototropism: bending towards enlightenment. *Plant Cell*, **18**(5), 1110-1119.
- Wisniewska, J., Xu, J., Seifertova, D., Brewer, P.B., Ruzicka, K., Blilou, I., Rouquie, D., Benkova, E., Scheres, B., Friml, J. (2006) Polar PIN localization directs auxin flow in plants. *Science*, **312**(5775), 883.
- Xu, T., Wen, M., Nagawa, S., Fu, Y., Chen, J.G., Wu, M.J., Perrot-Rechenmann, C., Friml, J., Jones, A.M., Yang, Z. (2010) Cell surface- and rho GTPase-based auxin signaling controls cellular interdigitation in Arabidopsis. *Cell*, **143**(1), 99-110.
- Yamada, M., Greenham, K., Prigge, M.J., Jensen, P.J., Estelle, M. (2009) The TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE2 gene is required for auxin synthesis and diverse aspects of plant development. *Plant Physiol*, **151**(1), 168-179.
- Yamamoto, M., Hilgemann, D.H., Feng, S., Bito, H., Ishihara, H., Shibasaki, Y., Yin, H.L. (2001) Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate induces actin stress-fiber formation and inhibits membrane ruffling in CV1 cells. *J Cell Biol*, **152**(5), 867-876.
- Yang, P., Fu, H., Walker, J., Papa, C.M., Smalle, J., Ju, Y.M., Vierstra, R.D. (2004) Purification of the Arabidopsis 26 S proteasome: biochemical and molecular analyses revealed the presence of multiple isoforms. *J Biol Chem*, **279**(8), 6401-6413.
- Zhang, R., Wang, B., Ouyang, J., Li, J., Wang, Y. (2008) Arabidopsis indole synthase, a homolog of tryptophan synthase alpha, is an enzyme involved in the Trp-independent indole-containing metabolite biosynthesis. *J Integr Plant Biol*, **50**(9), 1070-1077.
- Zhao, Y. (2010) Auxin biosynthesis and its role in plant development. *Annu Rev Plant Biol*, **61**, 49-64.
- Zhao, Y., Christensen, S.K., Fankhauser, C., Cashman, J.R., Cohen, J.D., Weigel, D., Chory, J. (2001) A role for flavin monooxygenase-like enzymes in auxin biosynthesis. *Science*, **291**(5502), 306-309.
- Zimmermann, P., Hirsch-Hoffmann, M., Hennig, L., Gruissem, W. (2004) GENEVESTIGATOR. Arabidopsis microarray database and analysis toolbox. *Plant Physiol*, **136**(1), 2621-2632.

8. Abkürzungsverzeichnis

2,4-D	2,4-Dichlorphenoxyessigsäure
ABP	Aktin-bindendes Protein
ABP1	AUXIN BINDING PROTEIN 1
AFB	AUXIN SIGNALING F-BOX
BFA	Brefeldin A
CHCl ₃	Chloroform
CHX	Cycloheximid
COI1	CORONATINE INSENSITIVE 1
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DEPC	Diethylcarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (desoxy ribonucleic acid)
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
GAP	GTPase activation protein
GDI	guanine nucleotide dissociation inhibitor
GEF	guanidine exchange factor
GFP	Green Fluoreszent Protein
GUS	β-Glucoronidase
IAA	Indol-3-Essigsäure
InsP 5-Ptase	Inositolpolyphosphat-5-Phosphatase
InsP ₃	Inositol(1,4,5)trisphosphat
InsP ₄	Inositol(1,3,4,5)tetrakisphosphat
InsP ₅	Inositol(1,3,4,5,6)pentakisphosphat
InsP ₆	Inositol(1,2,3,4,5)hexakisphosphat
IPK	Inositolpolyphosphat-Kinase
IPP	Inositolpolyphosphat
KOH	Kaliumhydroxid
MS	Murashige & Skoog Medium
NAA	2-(1-Naphthyl)essigsäure

NaCl	Natriumchlorid
PI	Phosphoinositid
PIP5K	Phosphatidylinositol-4-Phosphat-5-Kinase
PI-PLC	Phosphatidylinositol-spezifische Phospholipase C
PtdIns(4,5)P ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PtdIns4P	Phosphatidylinositol-4-phosphat
qPCR	quantitative Polymerase-Kettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)
ROP	Rho of plant
RT-PCR	Reverse Transkriptase- Polymerase-Kettenreaktion
SCF	Skip, Cullin, F-box
TIR1	TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE 1
Trp	Tryptophan
X-Gluc	5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-glucuronsäure

9. Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich ganz besonders bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Ingo Heilmann für die umfassende und großartige Betreuung während der letzten Jahre bedanken, insbesondere für die die Kreativität, durch die ich das Projekt in alle Richtungen ausbauen konnte (zur Not auch mit „Lego“). Vielen Dank für die zahlreichen Aufmunterungen, die Motivation und die stetige Bereitschaft Vorträge für Tagungen zu üben und überhaupt die Möglichkeit, eigene Daten auf Tagungen zu präsentieren; für die beruhigenden Worte, wenn etwas nicht klappte und die positive, lustige Art, die einen jeden Tag gern zur Arbeit kommen ließ. Zudem bedanke ich mich dafür, in den letzten Jahren sehr viel gelernt zu haben, für die passablen Kickerkünste, die ich mir aneignen konnte und nicht zuletzt dafür, jeden Zettel in der Mitte zu falten.

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. Ivo Feussner für die Betreuung und die stetige Diskussionsbereitschaft und hilfreichen Anregungen während der Arbeit und nach Vorträgen und für die Begutachtung meiner Dissertation. Zudem bedanke ich mich recht herzlich für die Parkmöglichkeit, die ich hinter dem Institut nutzen durfte.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft DFG danke ich für die Förderung meines Projektes He3424/2.

Neben meinen Betreuern Prof. Dr. Ingo Heilmann und Prof. Dr. Ivo Feussner bedanke ich mich bei PD Dr. Michael Hoppert, PD Dr. Thomas Teichmann, Dr. Dieter Klopfenstein und Prof. Dr. Ernst Wimmer für die Bereitschaft, meine Prüfungskommission zu bilden.

Besonders bedanken möchte ich mich an dieser Stelle bei Dr. Till Ischebeck für die Bereitstellung der *pip5k1 pip5k2*-Doppelmutante und das spannende gemeinsame Projekt, was sich aus der Zusammenarbeit ergab und die Großzügigkeit, mich in dem Maße daran teilhaben zu lassen. Vielen Dank auch für die vielen Methoden, die ich durch die Zusammenarbeit lernen konnte und vor allem den guten Musikgeschmack und die spannenden Wii-Duelle.

Ebenso gilt mein besonderer Dank Dr. Mareike Heilmann, die mir bei allen Fragen und Auswertungen rund um das Microarray eine große Hilfe war und allgemein immer Rat

wusste, wenn es irgendwo brannte. Vor allem für die gute Lakritz-Versorgung und den besten Linsensalat der Welt sei hier gedankt.

Ein großer Dank geht auch an Dr. Irene Stenzel für die große Hilfe beim Fotografieren von Pflanzen und die Bereitstellung der umfangreichen Kamera-Ausrüstung und vor allem für die Hilfe bei Experimenten jedweder Art über die Jahre hinweg.

Meiner Masterstudentin Anna Müller danke ich recht herzlich für die gewissenhafte Bearbeitung des aus meiner Arbeit entstandenen Ableger-Projektes und den großen Einsatz während der ganzen Zeit und vor allem für die vielen wertvollen Erkenntnisse, die aus dieser Arbeit entstanden sind.

Meiner Praktikantin Sarah Böhnisch danke ich für die gewissenhafte Durchführung schwieriger Klonierungen und die gute Mitarbeit.

Den Mitarbeitern des Transcriptome Analysis Labors (TAL) in Göttingen danke ich für die Durchführung der Microarray-Analyse.

Dr. Christian Löffke danke ich recht herzlich für die Hilfe bei schwierigen Auxin-Problemen und die Durchführung der Auxin-Transport-Tests.

Der AG Nies, insbesondere Dr. Cornelia Große, und der AG Behrens der Uni Halle sei gedankt für die Möglichkeit, die qPCR-Maschine und das konfokale Mikroskop nutzen zu dürfen.

Gerd Mader danke ich recht herzlich für den Bau der Pflanzenständer, die die Aufzucht der Keimlinge um einiges erleichtert hat.

Für die Versorgung mit allen möglichen Arabidopsis-Samen danke ich Prof. Dr. Jiří Friml für die PIN- und DR5-Linien, Dr. Imara Perera für die *InsP 5-Ptase*-Linie, Prof. Dr. John York für die *ipk1-1*-Mutante und Dr. Urs Fischer (Umea, Schweden) ebenfalls für eine DR::GFP-Linie.

Bei unseren Gärtnerinnen Susanne Mester (Uni Göttingen) und Frau Rosinsky (Uni Halle) bedanke ich mich für die gewissenhafte Pflege meiner Pflanzen, die Bereitstellung von Erde und die guten Tipps rund um die Blumenpflege.

An dieser Stelle möchte ich nun recht herzlich meinen zwei Mit-Doktorandinnen Jennifer Lerche und Franziska Hempel für die wundervollen Jahre des gemeinsamen Doktorierens in Göttingen und Halle danken. Besonders für das viele Lachen und die Hilfe und Unterstützung in jeder Lebenslage auch außerhalb des Labors.

Ein besonderer Dank geht auch an Dr. Alina Mosblech für die Hilfe bei allen Fragen über Pflanzenhormone und die Anleitung zur Herstellung guter RNA. Adelheit Moosbommel danke ich für das exquisite Radioprogramm jeden Freitag. Alonzo danke ich für den Spaß mit Anteilen von Wahnsinn, die Gesangsduette und die Bereitschaft, sich gemeinsam den Gefahren eines Gewitters am Kiesesee auszusetzen.

Ebenso möchte ich mich bei meiner ganzen Arbeitsgruppe (alten und neuen Mitgliedern) für die große Hilfe und Unterstützung und natürlich die großartige Stimmung und das Lachen im Labor und auch während der unzähligen Arbeitsgruppentreffen recht herzlich bedanken.

Der Abteilung Biochemie der Pflanze der Uni Göttingen danke ich für die nette Arbeitsatmosphäre und die vielen gemeinschaftlichen Veranstaltungen, vor allem die Wanderungen, die man gemeinsam bewältigt hat.

Außerdem möchte ich mich bei meinen lieben Freunden bedanken, die bereitwillig Vorträge mit mir geübt und meine Launen in Stresssituationen ertragen haben. Besonders bedanke ich mich auch bei meiner Mitbewohnerin Katherina Tinka Witte für die gute Zeit in Halle und vor allem für die wunderbaren Küchenabende nach anstrengenden Arbeitstagen.

Ein großer Dank geht an meine vier Eltern Sylvia Werner-Skiba, Lothar Werner, Klaus Skiba und Kerstin Werner, die mich über die Jahre hinweg immer unterstützten und mir diesen Weg erst ermöglicht haben. Mein besonderer Dank gilt Klaus, der nicht nur immer meine Vorträge angehört hat, sondern auch meine Arbeit mit Kommas und fehlenden Buchstaben nachgerüstet hat.

Auch bei dem Rest meiner Familie möchte ich mich bedanken, ganz besonders bei dem neuesten Mitglied. Vielen Dank für die wundervollen letzten Monate. Ich hoffe, es werden viele weitere.

10. Lebenslauf

Stephanie Werner

Geburtsdatum: 13. Oktober 1982
Geburtsort: Kassel
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig, keine Kinder

SCHULLAUFBAHN

1989 – 1993 Friedrich-Wöhler-Schule Kassel
 1993 – 2002 Friedrichsgymnasium Kassel

WISSENSCHAFTLICHER WERDEGANG

10/2002 – 10/2008 Studium der Biologie, Georg-August-Universität Göttingen
 02/2007 – 11/2008 Diplomarbeit in der Abteilung Biochemie der Pflanze, Albrecht-von-Haller-Institut für Pflanzenwissenschaften der Georg-August-Universität Göttingen bei Prof. Dr. Ivo Feußner
 Thema der Arbeit:
 „Sphingolipid-abhängige Funktion und subzelluläre Verteilung pflanzlicher Phosphatidylinositol-4-Phosphat 5-Kinasen“
 Betreuung: Dr. Ingo Heilmann
 Abschluss: Diplombiologin

Wissenschaftliche Anstellung:

04/2007 – 06/2007 Studentische Hilfskraft im Grundpraktikum Biologie für Mediziner, Institut für Pflanzenwissenschaften der Georg-August-Universität Göttingen
 11/2008 – 05/2009 Anstellung als wissenschaftliche Hilfskraft in der Arbeitsgruppe von Prof. Feußner bei Dr. Philipp Ternes, Abteilung Biochemie der Pflanze, Albrecht-von-Haller-Institut für Pflanzenwissenschaften der Georg-August-Universität Göttingen
 05/2009- 09/2010 Anstellung als Doktorand in der Arbeitsgruppe von Dr. Ingo Heilmann, Abteilung Biochemie der Pflanze, Albrecht-von-Haller-Institut für Pflanzenwissenschaften der Georg-August-Universität Göttingen
 10/2010 bis 01/2013 Anstellung als Doktorand in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Ingo Heilmann, Abteilung zelluläre Biochemie, Institut für Biochemie und Biotechnologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

VERÖFFENTLICHUNGEN

Ternes, P., Feussner, K., Werner, S., Lerche, J., Iven, T., Heilmann, I., Riezman, H., Feussner, I. (2011) Disruption of the ceramide synthase LOH1 causes spontaneous cell death in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytol*, **192**(4), 841-854.