

**Die Bedeutung von endogenem und künstlichem  
Auxin für die Kultivierung photoautotropher  
Zellen von *Chenopodium rubrum***

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Fakultät für Biologie, Chemie und Geowissenschaften  
an der Universität Bayreuth

vorgelegt von  
**Dipl.- Chem. Oscar Carlos Valdes Dominguez**  
aus Ciego de Avila, Cuba  
Bayreuth, März 2005

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Biologie, Chemie und Geowissenschaften der Universität Bayreuth genehmigten Promotionsschrift zur Erlangung des akademischen Grades Doktor der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.).

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Juli 1998 bis März 2005 am Lehrstuhl für Pflanzenphysiologie der Universität Bayreuth unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Erwin Beck angefertigt.

Die Arbeit wurde eingereicht am: 09. März 2005

Das Rigorosum fand am: 14. Juli 2005

Der Prüfungsausschuss bestand aus:

Prof. Dr. Erwin Beck	(Erstgutachter)
Prof. Dr. Benedikt Westermann	(Zweitgutachter)
Prof. Dr. Mathias Sprinzl	(Vorsitz)
Prof. Dr. Christian Lehner	
Prof. Dr. Franz Xaver Schmid	

---

**Inhaltsverzeichnis**

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b><i>Chenopodium rubrum</i> eine photoautotrophe Zellkultur mit meristematischem Charakter</b> .....	<b>2</b>
<b>1.2</b>	<b>Auxin-Biosynthese und Metabolismus der Pflanze</b> .....	<b>3</b>
<b>1.3</b>	<b>Physiologische Wirkung des Auxins, der Genexpression durch Auxin und die Rolle des Auxin-Rezeptor</b> .....	<b>4</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b> .....	<b>7</b>
<b>2.1</b>	<b>Material</b> .....	<b>7</b>
2.1.1	Pflanzenzellsuspensionskultur.....	7
2.1.2	Antikörper .....	7
2.1.3	Bakterienstämme und Vektoren .....	7
2.1.4	Chemikalien .....	10
2.1.5	Puffer und Lösungen .....	12
2.1.6	Filter und Membranen .....	14
2.1.7	Radiochemikalien.....	14
2.1.8	Fotomaterialien.....	14
2.1.9	Molekularbiologische Kits .....	14
2.1.10	Enzyme.....	15
2.1.11	Geräte .....	15
2.1.12	Software und Internet-Datenbank.....	16
<b>2.2</b>	<b>Methoden</b> .....	<b>16</b>
2.2.1	Anzucht und Ernte der Suspensionskulturzellen von <i>Chenopodium rubrum</i> .....	16
2.2.1.1	Photoautotrophe Zellkultur.....	16
2.2.1.2	Ernte der <i>Chenopodium rubrum</i> -Zellen.....	17
2.2.1.3	Behandlung der Zellkultur .....	17
2.2.2	Messung des zellinternen Auxinspiegels in einer Suspensions-Batchkultur von <i>Chenopodium rubrum</i> .....	17
2.2.2.1	Auxin-Extraktion.....	19
2.2.2.2	Herstellung von Diazomethan (De Boer und Backer 1954).....	19
2.2.2.3	Quantifizierung von Auxin mittels ELISA.....	21
2.2.2.4	Synthese von IES-AP .....	21
2.2.3	Molekularbiologische Methoden.....	22
2.2.3.1	Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	22

2.2.3.2	Ligation von DNA-Fragmenten mit T4-Ligase .....	22
2.2.3.3	T/A Klonierung.....	23
2.2.3.4	Transformation .....	23
2.2.3.5	Isolierung der Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> .....	24
2.2.3.6	Isolierung der Plasmid-DNA aus Agrobakterium .....	24
2.2.3.7	Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen vom Typ II .....	25
2.2.3.8	Agarosegelelektrophorese von DNA und Extraktion von Fragmenten aus den Gelen	25
2.2.3.9	Extraktion von Gesamt-RNA und mRNA aus den Zellen.....	25
2.2.3.10	RNA-Extraktion mit Hybaid RiboLyser Kit-Green.....	26
2.2.3.11	RNA Extraktion mit RNeasy Mini Kit .....	26
2.2.3.12	mRNA Extraktion mit mRNA Direct™ Micro Sample Kit .....	27
2.2.3.13	Differential Display von RNA.....	27
2.2.3.14	Herstellung einer <i>Chenopodium rubrum</i> cDNA-Bank und Screening nach DNA-Klonen .....	31
2.2.3.15	RACE-PCR („Rapid Amplification of cDNA Ends“) für das 5'-Ende .....	31
2.2.3.16	Allgemeines zum Gateway-Cloning-System.....	32
2.2.4	Charakterisierung von cDNA-Klonen.....	33
2.2.4.1	Protein-Analytik .....	33
2.2.4.2	Funktionsanalyse von Genen durch <i>Post-transcriptional gene silencing</i> (PTGS) .....	34
2.2.4.3	Transformation der <i>Chenopodium rubrum</i> -Zellen .....	35
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE UND DISKUSSION.....</b>	<b>38</b>
<b>3.1</b>	<b>Die Phasen der Kultur von photoautotrophen <i>Chenopodium rubrum</i> - Zellen.....</b>	<b>38</b>
<b>3.2</b>	<b>Endogenes Auxin und 2,4-D im Verlauf der Suspensions-Batchkultur von <i>Chenopodium rubrum</i> .....</b>	<b>40</b>
<b>3.3</b>	<b>Gene, deren Expression durch Auxin induziert wird.....</b>	<b>46</b>
3.3.1	Genexpression der Zellkultur in Abhängigkeit von natürlichem und künstlichem Auxin ..	47
<b>3.4</b>	<b>Isolierung, Amplifizierung und Klonierung des Fragmentes A1.1 .....</b>	<b>54</b>
3.4.1	Identifizierung des Gens A1.1 durch Vergleich mit Sequenzen der Gen-Bank .....	60
3.4.2	Durch Auxin induziertes Gencluster für rps2 und die ATPase SU IV .....	63
3.4.3	Induktion durch Auxin des ribosomalen Proteins S2 und der ATPase .....	65
<b>3.5</b>	<b>Isolierung des Volllängen-Klons des Fragmentes 18R10 aus der cDNA-Bank von <i>Chenopodium rubrum</i> .....</b>	<b>67</b>
3.5.1	Proteomics von 18R10VL .....	68
3.5.2	Induktion und Expression des Lipase-GDSL-Motiv-Transkriptes in <i>Chenopodium rubrum</i> .....	74

---

3.5.3	<i>In vitro</i> und <i>in vivo</i> Expression der GDSL-Lipase von <i>Chenopodium rubrum</i> .....	76
3.5.4	Lipase-Acylhydrolase mit GDSL-Motiv.....	78
3.5.5	Regulation der Expression von Lipasen durch Phytohormone .....	80
3.5.6	Antagonistische Wirkung des Auxins und des Cytokinins in der Molekularbiologie.....	81
3.5.7	Lipase und Seneszenz in der Wachstumsperiode.....	82
<b>3.6</b>	<b>Isolierung des Volllängen-Klons des Fragmentes Alt6m4 aus der cDNA-Bank von</b> <b><i>Chenopodium rubrum</i> .....</b>	<b>84</b>
3.6.1	Genomics und Proteomics von Alt6m4.....	86
3.6.2	Induktion der Expression des $\beta$ -Xylo-Glucosidase-Gens in <i>Chenopodium rubrum</i> - Kulturzellen .....	90
3.6.3	Genfunktionsanalyse durch Transformation mit Doppelstrang-RNA - vermittelte RNA- Interferenz (RNAi) von $\beta$ -Xylo-Glucosidase.....	91
3.6.4	Bestimmung einer optimalen Kanamycin-Konzentration zur Selektion transgener <i>Chenopodium rubrum</i> -Zellen .....	92
3.6.5	Transformation der <i>Chenopodium rubrum</i> -Zellkultur RNAi- $\beta$ -Xylo-Glucosidase mit Agrobakterium.....	93
3.6.6	Herstellung stabiler Transformanten durch Partikelbeschuss .....	95
3.6.7	Kontrolle der RNAi in Pflanzenzellen mittels PCR.....	96
3.6.8	Untersuchung des Phänotyps der XGRNAi-Mutante der <i>Chenopodium rubrum</i> -Zellkultur ..	97
3.6.9	$\beta$ -Xylo-Glucosidase von <i>Chenopodium rubrum</i> .....	100
3.6.10	$\beta$ -Xylo-Glucosidase-Expression in der <i>Chenopodium rubrum</i> -Zellkultur.....	102
3.6.11	Expression der $\beta$ -Xylo-Glucosidase von <i>Chenopodium rubrum</i> in der Seneszenzphase..	102
3.6.12	Transformation mit Hilfe des Partikelbeschusses von RNAi.....	103
<b>4</b>	<b>SCHLUSSBETRACHTUNG.....</b>	<b>106</b>
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>108</b>
<b>6</b>	<b>SUMMARY.....</b>	<b>111</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>114</b>
<b>8</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>127</b>
<b>9</b>	<b>ANHANG.....</b>	<b>129</b>

## 1 EINLEITUNG

Viele zellbiologischen Prozesse lassen sich an Einzelzellen besser studieren als in einem vielzelligen Organismus. So wurde der Weg des Kohlenstoffs bei der Photosynthese mit einzelligen Algen (*Scenedesmus*, *Chlorella*) aufgeklärt (Calvin und Benson 1948). Hefe- und Bakterienzellen sind viel verwendete Objekte für das Studium von komplizierten Biosynthesewegen und von intrazellulären Signaltransduktionswegen. Will man derartige Prozesse an Höheren Pflanzen studieren, bieten sich Zellkulturen, vor allem Flüssigkulturen pflanzlicher Zellen an, in denen man über das Medium schnellen Zugang zum intrazellulären Geschehen hat. In vielen Fällen werden derartige Zellkulturen zur Gewinnung pharmazeutisch interessanter pflanzlicher Sekundärstoffe verwendet, ein Verfahren, das unter der Bezeichnung „Biokonversion“ bekannt ist (Vanuden et al. 1995). Die allermeisten der bisher etablierten Suspensionszellkulturen Höherer Pflanzen sind jedoch heterotroph und benötigen ausreichend Kohlenstoffquellen im Medium. Dagegen sind photoautotrophe Zellkulturen eher selten, da sie wegen des vergleichsweise langsamen Wachstums und einer größeren Empfindlichkeit gegenüber den Kulturbedingungen industriell nicht genutzt werden. Sie sind jedoch für pflanzenphysiologische Untersuchungen besonders geeignet, da sie sich in gewissem Umfang als Modellsysteme, z.B. für Blätter verwenden lassen. Eine besonders gut photoautotroph wachsende Zellkultur ist die von *Chenopodium rubrum* (Hüsemann und Barz 1977), die auf rein anorganischem Medium unter einer CO<sub>2</sub> angereicherten Atmosphäre wächst, und in der Suspensions-Batchkultur eine einem Blatt vergleichbare Entwicklung durchläuft (Beck und Scheibe 2003). Diese Zellkultur wird am Lehrstuhl für Pflanzenphysiologie der Universität Bayreuth seit 1979 photoautotroph gezogen, wobei es auch möglich ist, sie durch wenige Passagen in eine chlorophyllfreie heterotrophe Kultur umzuwandeln. Für ein optimales photoautotrophes Wachstum benötigt die Kultur eine ganz geringe Konzentration des synthetischen Auxins 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (2,4-D), dessen physiologische Bedeutung für das Leben dieser Zellen völlig unbekannt ist. Weitere Phytohormone benötigt die Zellkultur nicht, da sie diese selbst in ausreichender Menge produziert. Vom 2,4-D ist bekannt, dass es wie ein Auxin wirkt, also sowohl einen Effekt auf das Streckenwachstum der Zellen als auch auf die Zellteilung hat. Nicht bekannt ist, ob 2,4-D als künstliches Phytohormon diese Prozesse direkt beeinflusst, oder ob seine Wirkung eine Wechselwirkung zwischen 2,4-D und dem natürlichen Auxin Indol-3-essigsäure (IES) zugrunde liegt. Da die Zellkultur mittlerweile in vieler Hinsicht gut charakterisiert ist (Hüsemann und Barz 1977; Peters et al. 2000), sollte in der vorliegenden Arbeit ihre

Abhängigkeit von 2,4-D genauer untersucht werden. Eine Möglichkeit hierzu bot sich neben der Wachstumsanalyse in der Methode des Differential Display, wo die Aktivierung von Genen z.B. durch Phytohormone auf der mRNA-Ebene eindeutig nachgewiesen werden kann.

### **1.1 *Chenopodium rubrum* eine photoautotrophe Zellkultur mit meristematischem Charakter**

Die Zellkultur von *Chenopodium rubrum* wächst in Form von Einzelzellen und Mikrokalli, die sich in Abhängigkeit von der Ressourcenlage und dem Alter teilen. Die Zellen weisen Ähnlichkeiten mit solchen aus jungen Blättern auf, die bereits photoautotroph leben, sich dabei aber auch noch teilen können. Werden die Zellen in einer Suspensions-Batchkultur gezogen, kann man in Analogie zum Wachstum einer Bakterienkultur eine lag-Phase, eine Teilungsphase, eine stationäre und eine Alterungsphase unterscheiden. Während der Teilungsphase und in den ersten vier Wochen der stationären Phase lassen sich die Zellen durch Übertragen in frisches, Auxin-haltiges Medium erneut zur Teilung anregen. In der Alterungsphase verlieren die Zellen ihre Teilungsfähigkeit. Es gibt also einen „Point of no return“ im Leben dieser Zellen.

Dieser „Point of no return“ markiert ein Entwicklungsstadium, bei dem der Eintritt in die degenerative Phase fixiert wird. Frühere Untersuchungen von Peters et al. (2000) und Fountain (2000) hatten gezeigt, dass bei der Suspensions-Batchkultur von *Chenopodium rubrum* - Suspensionszellen dieser „Point of no return“ bei einem Alter von ca. 60 Tagen nach der Subkultur lag. Auch durch die Zugabe von Phytohormonen kann die Teilungsfähigkeit der Zellen von diesem Punkt an nicht mehr regeneriert werden. Vor Erreichen dieses „Point of no return“, also in der stationären Phase, bedurfte es der Zugabe sowohl von Cytokinin (t-Zeatinribosid, ZR) als auch von 2,4-D um die Zellen aus der G0-Phase wieder in den Zellzyklus zurückzubringen. Der Zusatz von nur einem dieser Hormone war nicht ausreichend. (Peters et al. 2000).

Der Verlauf der Suspensions-Batchkultur wurde von der Zellteilungsphase über die ausgedehnte stationäre Phase bis hin zum Absterben der Zellen physiologisch gut charakterisiert. Es zeigte sich, dass die einzelnen Stadien von den physiologischen Vorgängen und von ihrer Dauer her gesehen, durchaus der Entwicklung eines Blattes entsprechen (Peters et al. 2000; Beck und Renner 1990).

Neben ihrem meristematischen Charakter haben die Zellen der Kultur von *Chenopodium rubrum* allerdings auch Ähnlichkeiten zu Mesophyllzellen: Sie besitzen ausdifferenzierte Chloroplasten und sind somit zur photoautotrophen Lebensweise befähigt. Interessanterweise kommt es beim Überschreiten des „Point of no return“ zu typischen Seneszenzerscheinungen, wie dem Abbau des Chlorophylls und einer Abnahme der photosynthetischen Leistung (Peters et al. 2000). Möglicherweise handelt es sich beim Altern der *Chenopodium rubrum* - Zellkultur um den Ablauf einer altersabhängigen Seneszenz, wie sie für Laubblätter in unseren Breiten beschrieben wurde (Yoshida 2003).

## 1.2 Auxin-Biosynthese und Metabolismus der Pflanze

Die Auxin-Biosynthese erfolgt auf zwei unterschiedlichen Wegen, in Abhängigkeit oder unabhängig von Tryptophan. Der Weg über das Tryptophan ist am verbreitetsten (Ljung 2002). Die Details in der Biosyntheseroute sind taxospezifisch und sollen hier nicht im Einzelnen erläutert werden. Interessant ist, dass beide Wege, der über Tryptophan und der über einen Indolkörper in der gleichen Pflanze nebeneinander vorkommen können, wie z.B. in *Arabidopsis thaliana* (Müller et al. 1998; Müller und Weiler 2000) und Mais (Wright et al. 1992).

Tryptophan – unabhängige IES – Biosynthesewege wurden in Protoplasten und Tabakspossen nachgewiesen (Sitbon et al. 2000). In diesem Fall schätzt man, dass die Tryptophan – abhängige IES ca. 25% der gesamten IES-Biosynthese der Pflanze beträgt. Die Entdeckung des Tryptophan–unabhängigen Weges warf die Frage über die relative Bedeutung der beiden Biosynthesewege auf, die bis heute nicht völlig geklärt ist. Einige Pflanzen, z.B. Bohnen sowie eine Zellkultur der Möhre, synthetisieren IES vorrangig über den Tryptophan–abhängigen Weg. Dennoch wechseln die Zellen am Beginn der Embryogenese zum Tryptophan–unabhängigen Weg, wenn das Medium kein 2,4-D mehr enthält (Michalczuk et al. 1992). Dieses Ergebnis zeigt, dass der für die Biosynthese der IES genutzte Weg mit der Entwicklungsphase in Beziehung steht. Bei einigen Pflanzen ist der Tryptophan–unabhängige Weg der vorrangige Weg bei der IES-Produktion.

In Pflanzengewebe liegt der größte Teil des natürlichen Auxins in konjugierter Form vor, die freie IES macht nur etwa 1% des gesamten Auxins aus (Park et al. 2001). In der konjugierten Form ist IES weitestgehend vor oxidativer Decarboxylierung oder Peroxidation geschützt und die Freisetzung aus den Konjugaten scheint zellphysiologisch keine großen Probleme zu bereiten (Cohen und Bandurski 1978). Nach Normanly (1997) stellen IES –



konjugierte Formen 90% der gesamten IES während des vegetativen Wachstums der Pflanzen dar.

### **1.3 Physiologische Wirkung des Auxins, der Genexpression durch Auxin und die Rolle des Auxin-Rezeptor**

Syntheseorte des Auxins sind die Meristeme hauptsächlich des Sprosses, weniger auch der Wurzel. Von dort wird es zu den Wirkorten transportiert, so dass ein starker Konzentrationsabfall entlang der Sproßachse resultiert.

Seit langem ist bekannt, dass Auxin das Streckungswachstum von Sprossen und Sprossteilen fördert, aber in höherer Konzentration besonders das Längenwachstum von Wurzeln und Achselknospen hemmt. Darüber hinaus ist es ein mitogenes Signal in Zellteilungszyklus.

Auf der molekularen Ebene ist die Frage nach dem Auxinrezeptor und einem IES-spezifischen Signaltransduktionsweg noch weitgehend offen.

ABP1 ist ein Auxin-Rezeptor (Jones 1994; Napier et al. 2002), der sich vor allem im Lumen des endoplasmatischen Reticulums (ER) befindet. Tian et al. (1995) wiesen auf zwei unterschiedlichen Wegen nach, dass ABP1 IES jedoch nicht im ER bindet. Obwohl die Hauptmenge des ABP1 dort lokalisiert ist, wurde es erwartungsgemäß auch an der Oberfläche der Plasmamembran nachgewiesen (Diekmann et al. 1995). Es konnte gezeigt werden, dass durch die Bindung von Auxin an ABP1 Protonen-ATPase der Plasmamembran aktiviert wird (Rück et al. 1993).

Nur für diejenige ATPase, die zur Gruppe der Plasmamembran  $H^+$ -ATPasen (PM  $H^+$ -ATPase) gehört und die im Kern codiert sind, konnte ein Einfluss des Auxins auf die Genexpression nachgewiesen werden. Es existieren 2 Theorien über die Ursachen dieses Prozesses (Macdonald 1997; Kim et al. 2001). Beide besagen, dass das Auxin-Bindungsprotein (ABP1) die Zunahme der ATPase Aktivität hervorruft.

Eine Vorstellung geht davon aus, daß das ABP unter dem Einfluss von IES eine Veränderung sowohl an der Hoch-Affinitätsseite als auch der Niedrig-Affinitätsseite erfährt. Im  $H^+$ -ATPase-Molekül gibt es eine Andock-Domäne ABP57-Docking-site (DS), die mit einer Inhibitor-domäne (ID) interagiert, wenn die DS durch das ABP besetzt ist. Als Ergebnis dieser Interaktion wird die ID von der katalytischen Seite entfernt (Kim et al. 2001).

---

Ein anderer vorgeschlagener Mechanismus: geht davon aus, daß nach der Bindung von IES an das ABP die Phospholipase A2 aktiviert wird (PLA – die Aktivierung dieses Proteins durch Auxin wird im Kapitel über die GDSL-Lipase diskutiert). Die PLA ihrerseits aktiviert eine Protein-Kinase, die letztendlich die ATPase aktiviert (Macdonald 1997).

Außer über ABP1 scheint Auxin auch über ABP1-unabhängigem Wege wirken zu können (Yamagami et al. (2004).

### **Problemstellung und Zielsetzung**

Aus dem dargestellten Zusammenhang ergab sich folgende Problemstellung für die Arbeit. Wie lässt sich der Zusammenhang zwischen Alterung und Zellteilung experimentell untersuchen? Welche Faktoren wirken auf die Mitose und/oder Cytokinese stimulierend oder hemmend und beeinflussen so möglicherweise die Alterung von Zellen? Oder anders gefragt: Gibt es exogene oder endogene Faktoren, die im Laufe des Lebens einer Zelle akkumulieren und letztlich zum Verlust der Zellteilungsfähigkeit führen?

Die Induktion der Genexpression durch Auxin ist ein wichtiger Bestandteil dieser Arbeit. Außerdem sollte die Genexpression durch Indolelessigsäure (natürliches Auxin) und 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (synthetisches Auxin) verglichen werden. Gibt es ein Gen – Spektrum, das nur durch eine der beiden Substanzen induzierbar ist? Dieses sollte im durchgeführten Differential Display geklärt werden. Ein weiterer Punkt, der in der vorliegenden Arbeit zu untersuchen war, ist die Aufnahme des exogenen Auxins durch die Zellen. Für beide Phänomene, die Gen-Induktion und Auxin-Aufnahme, sind verschiedene Mechanismen bekannt.

---

Zur Beantwortung dieser Fragen wurde die folgende experimentelle Strategie gewählt:

1. Ein Auxin-ELISA wurde etabliert, der den Nachweis geringster Mengen von endogener Indoleessigsäure bei gleichzeitigem Vorliegen von 2,4-D ermöglicht.
2. Das Genexpressionsmuster von „alten“ und „jungen“ Zellen sowie Zellen mit IES und 2,4-D-Behandlung wurde mit Hilfe der Methode des Differential Display analysiert. Es wurden Transkripte identifiziert, die spezifisch für ein bestimmtes Entwicklungsstadium der Zellen waren.
3. Eine cDNA-Bank von *Chenopodium rubrum* Zellen wurde angelegt. Aus dieser Bank wurden cDNA-Klone „gefischt“, die Volllängklone der zu den unter 3. gefundenen Transkripte repräsentieren. Diese cDNA-Klone wurden nach Sequenzierung näher charakterisiert.

## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Pflanzenzellsuspensionskultur

Versuchsobjekt war die photoautotrophe Suspensionszellkultur von *Chenopodium rubrum*, deren Entwicklung (bis ca. 90 Tage) durch 3 Phasen gekennzeichnet ist: Teilungsphase, stationäre Phase, Alterungsphase (Peters et al. 2000). Hierbei handelt es sich um eine ursprünglich aus Hypokotylgewebe gewonnene Zellkultur (Hüsemann und Barz 1977). Die Zellkultur wird seit 1979 am Lehrstuhl für Pflanzenphysiologie photoautotroph gezogen.

#### 2.1.2 Antikörper

Die folgenden Antikörper wurden verwendet:

Antimaus (Rb) - RAMIG (*rabbit anti-mouse immunoglobuline*), Sigma (Deisenhofen)  
*Anti-IAA antibody* 18-III-C3 (Antikörper gegen Methyl-IES aus Maus) Prof. Weiler (Universität Bochum).

*Anti-2,4-D antibody* E2/G2 (Monoklonaler Antikörper gegen 2,4-D aus Maus) Dr. Franek (Veterinärinstitut Brno).

#### 2.1.3 Bakterienstämme und Vektoren

Nachfolgend werden sämtliche verwendete Bakterienstämme mit ihren wichtigsten genetischen Eigenschaften aufgelistet:

*E. coli* TOP10

Clontech, Heidelberg

Genotyp:  $F' mcrA \Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC) \phi 80 lacZ \Delta M15 \Delta lacX74 recA1 deoR araD139 \Delta(ara-leu)7697 galU galK rpsL(StrR) endA1 nupG$

Dieser Stamm wurde von der Firma Clontech für die T/A Klonierung bezogen.

*E. coli* DH5 $\alpha$

Hanahan (1983) Stratagene, Heidelberg

Genotyp:  $supE44 \Delta lacU169 (\phi 80 lacZ \Delta M15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1$

Dieser Stamm der Firma Stratagene diente als Empfängerstamm.

*E. coli* XL1-Blue

Bullock et al. (1987)

Genotyp: *recA1, endA1, gyrA96, thi-1 hsdR17, supE44, relA1, lac* [F' *proAB, lacI<sup>q</sup>ZΔM15, Tn10 (Tet<sup>r</sup>)*]

Dieser Stamm der Firma Stratagene diente als Empfängerstamm für verschiedene Klonierungen.

*E. coli* XL1-Blue MRF'

Jerpseth et al. (1992), Stratagene, Heidelberg

Genotyp:  $\Delta(mcrA)183 \Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1, gyrA96 relA1 lac$ [F' *proAB, lacI<sup>q</sup>lacZΔM15, Tn10(Tet<sup>r</sup>)*]

Dieser Stamm der Firma Stratagene diente als Empfängerstamm für den Uni-ZAP-Vektor (cDNA-Bank). Weil dieser Stamm das F'-Episom enthält, wird er für die *In-vivo Excision* benötigt.

*E. coli* SOLR

Hay et al. (1992), Stratagene, Heidelberg

Genotyp: *e14<sup>(McrA)</sup> Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)171 sbcC recB recJ uvrC umuC :: Tn5(kan<sup>r</sup>) lac gyrA96 relA1 thi-1 endA1λ<sup>R</sup> F' [proAB<sup>+</sup> lacI<sup>q</sup> lacZΔM15] Su*

Dieser Stamm der Firma Stratagene ist notwendig für die Vermehrung des pBluescript Doppelstrang-Phagemids mit Hilfe von ExAssist™ Helferphagen.

*E. coli* M15 [pREP4]

Zamenhof und Villarero, (1972), Quiagen, Hilde

Genotyp: *Nal<sup>S</sup>, Str<sup>S</sup>, Rif<sup>S</sup>, Thi<sup>-</sup>, Lac<sup>-</sup>, Ara<sup>+</sup>, Gal<sup>+</sup>, Mtl<sup>-</sup>, F<sup>-</sup>, RecA<sup>+</sup>, Uvr<sup>+</sup>, Lon<sup>+</sup>*

Dieser Stamm diente als Wirtstamm für das Plasmid pQE-30 und wurde zur Überexpression der Proteine mit His6-tag (pQE-30) verwendet.

*E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIL

Grodberg und Dunn (1988), Stratagene, Heidelberg

Genotyp: *E. coli B F<sup>-</sup> ompT hsdS(r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) dcm<sup>+</sup> Tet<sup>r</sup> gal endA Hte [argU ileY leuW Cam<sup>r</sup>]*

Dieser Stamm diente als Wirtstamm für das Plasmid pCal-kc und wurde zur Überexpression der Fusionsproteine mit Calmodulin verwendet.

### Agrobakterienstämme

LBA 4404

(Hoekema et al. 1983) Invitrogen, Karlsruhe

LBA 4404 wurde auf dem Ach5-Hintergrund konstruiert und enthält das verkürzte Ti-Plasmid pAL 4404 (Deletion vom Octopin-Typ Plasmid pTiAch5), Sm<sub>r</sub>, Rif<sub>r</sub>.

### **Vektoren**

Nachfolgend werden sämtliche verwendeten Vektoren mit ihren Resistenz- und Selektionseigenschaften aufgelistet.

pT-Adv (3,9Kb)

Clontech, Heidelberg

pTAdv (Ampicillin Resistenz und Selektion lac Z') diente als Vektor zur direkten T/A-Klonierung von PCR-Produkten ohne vorherige Aufreinigung.

PBluescript II SK(+/-)

Short et al. (1988) Stratagene, Heidelberg

Das Plasmid Bluescript II SK(+/-) (Ampicillin Resistenz und Selektion lac Z') wurde für Klonierungen benutzt.

λ-Uni-ZAP-XR (pBluescript II SK(+/-) phagemid)

Short et al. (1988) Stratagene, Heidelberg

Der Vektor λ-Uni-ZAP-XR wurde zur Herstellung von cDNA-Banken benutzt.

pQE30

Bujard et al. (1987) Qiagen, Hilde

Die Expressionsvektoren pQE-30 ermöglichen die Überexpression von Proteinen im *E. coli* Stamm M15 [pREP4]. Dieser Vektor hat eine 6xHis Tag Affinitätsstelle für die Bindung mit Ni-NTA.

pCAL-kc

Simcox et al. (1995) Stratagene, Heidelberg

Der Expressions-Vektor pCAL-kc (Ampicillin Resistenz) ermöglicht die Überexpression von Proteinen im *E. coli* Stamm BL21. Dieser Vektor hat Calmodulin-Affinität für die Bindung an Calmodulin-Affinitäts-Harz, und eine Thrombin-Spaltstelle.

pHannibal (accession number AJ311872)

Wesley et al. (2001), Dr. Wesley (CSIRO Plant Industry Canberra)

Das Plasmid pHannibal (Ampicillin Resistenz) ermöglicht die Klonierung von RNAi Konstrukten.

pArt27 (accession number AJ311874)

Gleave (1992), Dr. Wesley (CSIRO Plant Industry Canberra)

Das Plasmid ist ein binärer Vektor, der die Klonierung des RNAi-Konstrukten von pHannibal ermöglicht; es wird für die Transformation von Agrobakterien verwendet.

**2.1.4 Chemikalien**

2,4 Dichlorphenoxyessigsäure		Sigma, Deisenhofen
Agarose		GibcoBRL, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat (APS)		Sigma Deisenhofen
Antibiotika	Ampicillin	Duchefa, Haarlem, Niederlande
	Cefotaxim	Sigma, Deisenhofen
	Chloramphenicol	Fluka, Steinheim
	Kanamycin	Sigma, Deisenhofen
	Rifampicin	Duchefa, Haarlem, Niederlande
	Spectinomycin	Duchefa, Haarlem, Niederlande
	Streptomycin	Duchefa, Haarlem, Niederlande
	Tetracyclin	Sigma, Deisenhofen
Borsäure		Merck, Darmstadt
Bromphenolblau		Serva, Heidelberg
BSA		Sigma, Deisenhofen
Chloroform		Merck, Darmstadt
Diethanolamin		Sigma, Deisenhofen
Dimethylformamid		Sigma, Deisenhofen
EDTA		Sigma, Deisenhofen
Ethanol		Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid		Roth, Karlsruhe
Glycin		Biomol, Hamburg

---

HYB-9 Hybridisierungslösung	BioZym, Oldendorf
Indolessigsäure	Sigma, Deisenhofen
Indolessigsäuremethylester	Sigma, Deisenhofen
IPTG	Roth, Karlsruhe
Methanol	Merck, Darmstadt
MOPS	Sigma, Deisenhofen
NaHCO <sub>3</sub>	Merck, Darmstadt
N-Nitroso-toluol-4-sulfomethylamid	Fluka, Neu-Ulm
Pepton (tryptisch verdaut)	GibcoBRL, Karlsruhe
Roti-Phenol/Chloroform (wassergesättigt)	Roth, Karlsruhe
SDS	AppliChem, Darmstadt
TEMED	Roth, Karlsruhe
Tris	ICN, Eschwege
X-Gal	Roth, Karlsruhe
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
p-Nitrophenyl-phosphat	Sigma, Deisenhofen

Hier nicht aufgeführte allgemeine Chemikalien wurden von den Firmen Roth (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), GibcoBRL (Karlsruhe), Fluka (Neu-Ulm) und Sigma (Deisenhofen) bezogen.



### 2.1.5 Puffer und Lösungen

10 X MOPS	0,2 M	MOPS
	0,05 M	Natriumacetat
	0,01 M	EDTA
	pH 7,0 mit 10 N NaOH	
20 x SSC	3,0 M	NaCl
	0,3 M	Natriumcitrat
	pH 7,0 mit HCl	
5 x TBE	0,45 M	Tris/HCl, pH 8,8
	0,45 M	Borsäure
	0,01 M	EDTA
Waschpuffer-1	2 x SSC / 0,5% (w/v) SDS	
Waschpuffer-2	0,5 x SSC / 0,1% (w/v) SDS	
Waschpuffer-3	0,2 x SSC / 0,1% (w/v) SDS	
20 x TBS + Tween Für Protein - Protokoll	1 M	Tris
	3 M	EDTA
	pH 7,8 mit HCl	
	1 %	Tween 20
TBS (für ELISA) Lagerung bei 4°C	50 mM	Tris-HCl
	150 mM	NaCl
	1 mM	MgCl <sub>2</sub>
	pH 7,8 mit 12 M HCl	
TBS + Tween (für ELISA)	0,05%	Tween 20

TBS-Gelatine (für ELISA) Lagerung bei 4°C	0,1 % (w/v)	Gelatine
	0,05%	NaN <sub>3</sub>
Diethanolamin-Puffer (DEA)	1 M	Diethanolamin
	0,5 mM	MgCl <sub>2</sub>
	pH 9,8 mit 12 M HCl	
Natriumcarbonat Puffer Lagerung bei 4°C	50 mM	NaHCO <sub>3</sub>
	pH 9,6 mit 12 M NaOH	
RNA-Denaturierungspuffer	1,78 ml	Formaldehyd (37%)
	5,0 ml	Formamid (deionisiert)
	0,5 ml	10 x MOPS
	2,72 ml	H <sub>2</sub> O deionisiert.
5 x Protein-Beladungspuffer für SDS-Gele	15 % (v/v)	β-Mercaptoethanol
	15 % (w/v)	SDS
	1,5 % (w/v)	Bromphenolblau
	50 % (v/v)	Glycerin
Laufpuffer für SDS-PAGE (pH 8,5)	0,025 M	Tris/HCl
	0,2 M	Glycin
	0,1 % (w/v)	SDS

### 2.1.6 Filter und Membranen

Hybond N <sup>+</sup>	Amersham Pharmacia, Freiburg
Whatman 3MM	Schleicher & Schuell, Dassel
Nylon Transfermembrane Biodyne A	Pall GmbH, Dreieich

### 2.1.7 Radiochemikalien

[ $\alpha$ - <sup>32</sup> P] d-ATP 3000 Ci/mmol, 10 mCi/ml	NEN, Köln
[ $\alpha$ - <sup>32</sup> P] d-ATP 800 Ci/mmol, 10 mCi/ml	NEN, Köln
[ $\gamma$ - <sup>32</sup> P] ATP, 6000 Ci/mmol, 10 mCi/ml	NEN, Köln
[ $\alpha$ - <sup>32</sup> P] d-CTP 3000 Ci/mmol, 10 mCi/ml	NEN, Köln
[2- <sup>14</sup> C] $\beta$ - Indoleessigsäure 40 Ci/mmol, 0,1mCi/ml	ARC, St. Louis (USA)
L-[ <sup>35</sup> S ] – Methionine 1175 Ci/mmol 10mCi/ml	NEN, Köln

### 2.1.8 Fotomaterialien

Hyperfilm <sup>TM</sup> MP 30x40 cm	Amersham, Freiburg
Hypercassette <sup>TM</sup> 30x40	Amersham, Freiburg
Hyperscreen <sup>TM</sup> 30x40	Amersham, Freiburg
BioMax Cassette 35x45	NEN, Köln
BioMax MS Film (Kodak)	NEN, Köln
BioMax TranScreen-HE (Kodak)	NEN, Köln
GBX Entwickler und Fixierer (Kodak)	Sigma, Deisenhofen

### 2.1.9 Molekularbiologische Kits

cDNA Synthesis Kit	Stratagene, Heidelberg
Affinity <sup>®</sup> Protein Expression and Purification System	Stratagene, Heidelberg
AdvanTAge <sup>TM</sup> PCR Cloning Kit	Clontech, Heidelberg
QIAprep <sup>®</sup> Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilde
HiSpeed <sup>TM</sup> Plasmid Midi Kit	Qiagen, Hilde
QIAquick <sup>®</sup> Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilde

Ni-NTA Spin Kit	Qiagen, Hilde
RNeasy <sup>®</sup> Plant Mini Kit	Qiagen, Hilde
Dynabeads <sup>®</sup> mRNA Purification Kit	Dynal, Hamburg
Hybaid Recovery <sup>™</sup> Rybolyser Kit- Green	Hybaid, Ulm
Serva Silver Staining Kit	Serva, Heidelberg
Radprimer DNA Labeling System Kit	GibcoBRL, Karlsruhe
Roth Random Primer Kit A	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Quantum Prep Freeze 'N Squeeze DNA	Bio-Rad, München
Smart <sup>™</sup> RACE cDNA Amplification Kit	Clontech, Heidelberg

### 2.1.10 Enzyme

T4 DNA Ligase (EC: 6.5.1.1)	MBI Fermentas, St.Leon-Rot
Alkalische Phosphatase (EC: 3.1.3.1)	Boehringer, Mannheim
DNase I (EC: 3.1.21.1)	Boehringer, Mannheim
Reverse Transkriptase (EC: 2.7.7.49)	Qiagen, Hilde Clontech, Heidelberg
Klenow-Polymerase	GibcoBRL, Karlsruhe
Lysozym	Boehringer, Mannheim
RNase A	Qiagen, Hilde
Taq DNA Polymerase (EC: 2.7.7.7)	Boehringer, Mannheim GibcoBRL, Karlsruhe Qiagen, Hilde
Restriktionsendonucleasen Typ II	MBI Fermentas, St.Leon-Rot NEB, Frankfurt am Main

### 2.1.11 Geräte

PCR Geräte – Thermocycler Modell PTC-100<sup>TR</sup>, NJ Research Waterhan, USA  
 Rybolyser, Hybaid, Ulm  
 ELISA Reader- Power Wave x 340 Bio-Tek Instruments, INC., USA

### 2.1.12 Software und Internet-Datenbank

BlastN, BlastP und BlastX (Altschul et al. 1990, 1997; Gish und States 1993; Madden et al. 1996; Zhang und Madden 1997); <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST>.

W<sup>2</sup>H (Version 4, 2001)

Die Entwicklung von W<sup>2</sup>H begann 1996 durch Martin Senger am DKFZ (Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg, Deutschland) und wird seit 1997 in einem gemeinschaftlichen Projekt zwischen DKFZ und EMBL-EBI von Peter Ernst und Martin Senger fortgeführt. Das W<sup>2</sup>H enthielt das Software-Paket der 'University of Wisconsin Genetics Computer Group' (GCG) Version 9.1 (Devereux et al. 1984), damit wurden die Sequenzen vorbereitet und analysiert

<http://www.cbs.dtu.dk/services/> Center for Biological Sequence Analysis

<http://www.expasy.ch/> Molecular Biology Server

<http://www.ebi.ac.uk/index.html> The European Bioinformatics Institute

KC4- Keneticalc for Windows ELISA-Readprogram

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Anzucht und Ernte der Suspensionskulturzellen von *Chenopodium rubrum*

#### 2.2.1.1 Photoautotrophe Zellkultur

Die Anzucht der Zellen erfolgte in einer Suspensions-Batchkultur in zweistöckigen Kolben (Abb. 48) im Kohlenhydrat-freien Murashige und Skoog-Medium (MS-Medium, Murashige und Skoog 1962). Dabei befindet sich das MS-Medium im oberen Teil und 50 ml Carbonat/ Hydrogencarbonatpuffer im unteren Teil des Doppelstöckers, um langfristig eine für die Photosynthese ausreichende CO<sub>2</sub>-Konzentration zu gewährleisten (Ziegler und Scheibe 1989; Peters et al. 2000).

Eine photoautotrophe Stammkultur von *Chenopodium rubrum L.*, wie von Hüsemann und Barz (1977) beschrieben, wuchs in einem von diesen Autoren verwendeten Murashige-Skoog-Nährmedium heran. 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (2,4-D / 0,1 µM) war das einzige Phytohormon, das dem Medium hinzugefügt wurde. Die Zellen wuchsen autotroph in Suspensions-Batchkulturen von 30 ml im oberen Sockwerk der Kolben, unter einer zu Beginn der Kultur 1%igen CO<sub>2</sub>-Atmosphäre.

Der Licht-Dunkelrhythmus betrug 16:8 Stunden. Belichtet wurde mit Weißlicht von Leuchtstoffröhren (Osram L40W/20S kühles Weiß) ( $160 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). Die Temperatur betrug am Tag  $28^\circ\text{C}$ , in der Dunkelphase  $25^\circ\text{C}$ . Für die Erhaltung und Vermehrung der Zellsuspension wurde alle 4 Wochen subkultiviert (2 ml Inoculum in 30 ml frisches Medium). Die Zellsuspension wurden auf einem Rotationsschüttler bei 110 U/min geschüttelt (Ziegler und Scheibe 1989; Peters et al. 2000).

### **2.2.1.2 Ernte der *Chenopodium rubrum*-Zellen**

Zur Ernte der Zellen wurden Glasfritten verwendet, wobei das Nährmedium vorsichtig mit der Wasserstrahlpumpe abgesaugt wurde; dann wurde 3 mal mit 10 ml bideionisiertem Wasser gewaschen. Verbleibendes Medium zwischen den Zellen wurde dadurch weitestgehend durch Wasser ersetzt. Nach dem vollständigen Abtropfen wurde noch 1 Minute lang weiter gesaugt und das Vakuum weitere 2 Minuten gehalten. Die gepackten Zellen wurden in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Entweder wurde das Material dann gleich weiter verarbeitet, oder bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert.

### **2.2.1.3 Behandlung der Zellkultur**

Für die Behandlung mit Phytohormonen wurde das Zellmaterial mehrerer gleich alter Suspensions-Batchkulturen vereinigt, gut vermischt und für die Experimente wieder portioniert.

## **2.2.2 Messung des zellinternen Auxinspiegels in einer Suspensions-Batchkultur von *Chenopodium rubrum***

Grundlage für die Bestimmung der IES-Konzentration war die ELISA-Methode nach Weiler (1986). Da bei diesem Verfahren bei der Extraktion der Auxine aber ein sehr hoher Verlust auftrat, wurde zunächst nach einer für die Suspensionskulturzellen effizienteren Extraktions- und Reinigungsmethode gesucht. Das optimierte Verfahren ist in Tabelle 1 dem Verfahren von Weiler (1986) gegenüber gestellt.

Zur Optimierung der Extraktionsschritte wurde die jeweilige Ausbeute mit markierter IES ( $[2\text{-}^{14}\text{C}] \beta\text{-Indolessigsäure } 40 \text{ Ci/mmol}, 0,1 \text{ mCi/ml}$ ) bestimmt.

Tabelle 1: Vergleich der IES-Bestimmungsverfahren mit *Chenopodium rubrum*-Suspensionskulturzellen nach der Methode von Weiler und nach Optimierung.

	Nach Weiler (1986)	Optimiertes Verfahren
1	Zermörsen des Zellmaterials (2 g FW) mit flüssigem Stickstoff, evtl. mit Quarzsand; mit 70%igem Methanol (ca. 20 ml) aufnehmen.	Zermörsen des Zellmaterials (2 g FW) mit flüssigem Stickstoff, evtl. mit Quarzsand; <b>mit 90%igem Methanol</b> (ca. 20 ml) aufnehmen.
2	4 Stunden bei 4°C im Dunkeln schütteln.	
3	Bei 25000g 30 min zentrifugieren	
4	Den Überstand auf eine C <sub>18</sub> -Kartusche (mit 70%igem Methanol vorequibriert) auftragen. Die Säule mit 1 ml 70%igem Methanol nachspülen und das Eluat mit dem Durchfluss vereinigen.	Den Überstand auf eine C <sub>18</sub> -Kartusche ( <b>mit 90%igem Methanol vorequibriert</b> ) auftragen. <b>Die Säule mit 1 ml 90%igem Methanol nachspülen und das Eluat mit dem Durchfluss vereinigen.</b>
5	Das vereinigte Eluat mit 2%iger Essigsäure verdünnen bis eine 30% methanolische Lösung vorliegt	<b>Das vereinigte Eluat bis zur wässrigen Phase einengen. Mit bideionisiertem Wasser aufnehmen und auf 0.8% Essigsäure einstellen</b>
6	Die Lösung erneut auf eine C <sub>18</sub> -Kartusche (mit 30%iger Methanol vorequibriert) auftragen; mit ca. 3 ml 30% Methanol nachwaschen.	<b>Die Lösung erneut auf eine C<sub>18</sub>-Kartusche (mit bideionisierte Wasser vorequibriert) auftragen; mit ca. 3 ml bideionisiertem Wasser nachwaschen</b>
7	Kartusche mit Methanol (ca. 3 ml 100%igen) und 6 ml Ethylacetat eluieren	<b>Kartusche mit ca. 3 ml 100%igem Methanol eluieren</b>
8	Eluat zur Trockne einengen	
9	Mit wenig Methanol (50-100µl) lösen, methylieren *(Diazomethan 100µl 20 min); anschließend bei max. 40°C zur Trockne einengen.	
10	Mit 100–200 µl Methanol (100%) lösen und mit TBS auf 1ml auffüllen.	
<b>Ausbeute</b>	30%	<b>91%</b>

\*IES wird in seinen Methylester umgewandelt, und dadurch für die Reaktion mit dem Antikörper stabilisiert.

Tabelle 2: Wiederfindungsrate von [2-<sup>14</sup>C] β-Indolessigsäure beim ursprünglichen und optimierten Ansatz

Extraktionsschritt	Wiederfindungsrate in %		
	Nach Weiler (1986) Extraktion mit 70% Methanol	Optimiertes Verfahren Extraktion mit 70% Methanol	Optimiertes Verfahren Extraktion mit <b>90%</b> Methanol
Extraktion	98	98	98
Erste Säulenchromatographie*	68	89	<b>97</b>
Zweite Säulenchromatographie**	34	82	<b>94</b>
Ausbeute	30	73	<b>91</b>

\*Die erste Säulenchromatographie wird mit Methanol der gleichen Konzentration, wie zur Extraktion verwendet, durchgeführt.

\*\*Für die zweite Säulenchromatographie wird die Säule nach Weiler mit 30% Methanol, im optimierten Verfahren aber nur mit H<sub>2</sub>O equilibriert.

### 2.2.2.1 Auxin-Extraktion

Die geernteten *Chenopodium rubrum*-Zellen (2 g Frischgewicht) wurden in flüssigem Stickstoff unter Zusatz von etwas Quarzsand im Mörser zerkleinert. Das Material wurde in 20 ml 90% Methanol aufgenommen und im Dunkeln bei 4°C 4 h lang auf einem Schüttler extrahiert. Danach wurde 30 Minuten lang bei 25000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde auf eine mit 90%igem Methanol vorequilibrierten C18-Kartusche aufgetragen (Baker spe Octadecyl 7020-07), und mit 1 ml 90% Methanol eluiert. Das Methanol wurde am Rotationsverdampfer abgezogen und der Rückstand in 0,8% Essigsäure gelöst. Aus dieser Lösung wurde das Auxin durch Passieren einer weiteren mit bideionisiertem Wasser equilibrierten C18 Kartusche extrahiert. Nach der Elution mit 3 ml absolutem Methanol wurde der Rückstand am Rotationsverdampfer getrocknet, in 100 µl absolutem Methanol aufgenommen und bei 20°C 20 Minuten lang mit 100 µl Diazomethan methyliert (siehe 2.2.2.2). Die Lösung wurde bei 40°C im Rotationsverdampfer getrocknet, der Rückstand in 200 µl absolutem Methanol gelöst und mit 800 µl TBS verdünnt. Die interne Standardisierung des gesamten Extraktionsverfahrens mit authentischem <sup>14</sup>C-markierten Auxin ergab eine Wiederfindungsrate von 91%.

### 2.2.2.2 Herstellung von Diazomethan (De Boer und Backer 1954)

Zur Methylierung der IES wurde etherische Diazomethanlösung verwendet.



Diazomethan ist ein leichtflüchtiges, hochreaktives Gas, das selbst hergestellt wurde (Abb. 1). Ein 500 ml Kolben mit 50 ml Ethanol, 10 g KOH und 15 ml H<sub>2</sub>O (Lösung B) wurde bei 60°C in einem Wasserbad temperiert und mit N<sub>2</sub> begast. Eine Lösung von 43g N-Nitroso-toluol-4-sulfomethylamid in 250 ml Ether (Lösung A) wurde langsam durch einen Tropftrichter in den Kolben gegeben. Das entstandene Diazomethan wurde über eine gekühlte Destillationsbrücke in einem Eis gekühlten Kolben in 100 ml Ether (Lösung C) aufgefangen. (Abb. 1). Nicht im Ether absorbiertes Diazomethan wurde in einem weiteren gekühlten Kolben mit Ether (Lösung D) und schließlich in einem weiteren Gefäß mit H<sub>2</sub>O und Essigsäure (Lösung E) aufgefangen. Zum verbleibenden Reaktionsansatz wurde Essigsäure hinzuge tropft, um das restliche Reagenz zu Methylacetat umzusetzen. Dadurch wurde die Reaktion gestoppt und noch vorhandenes Diazomethan abreagiert.

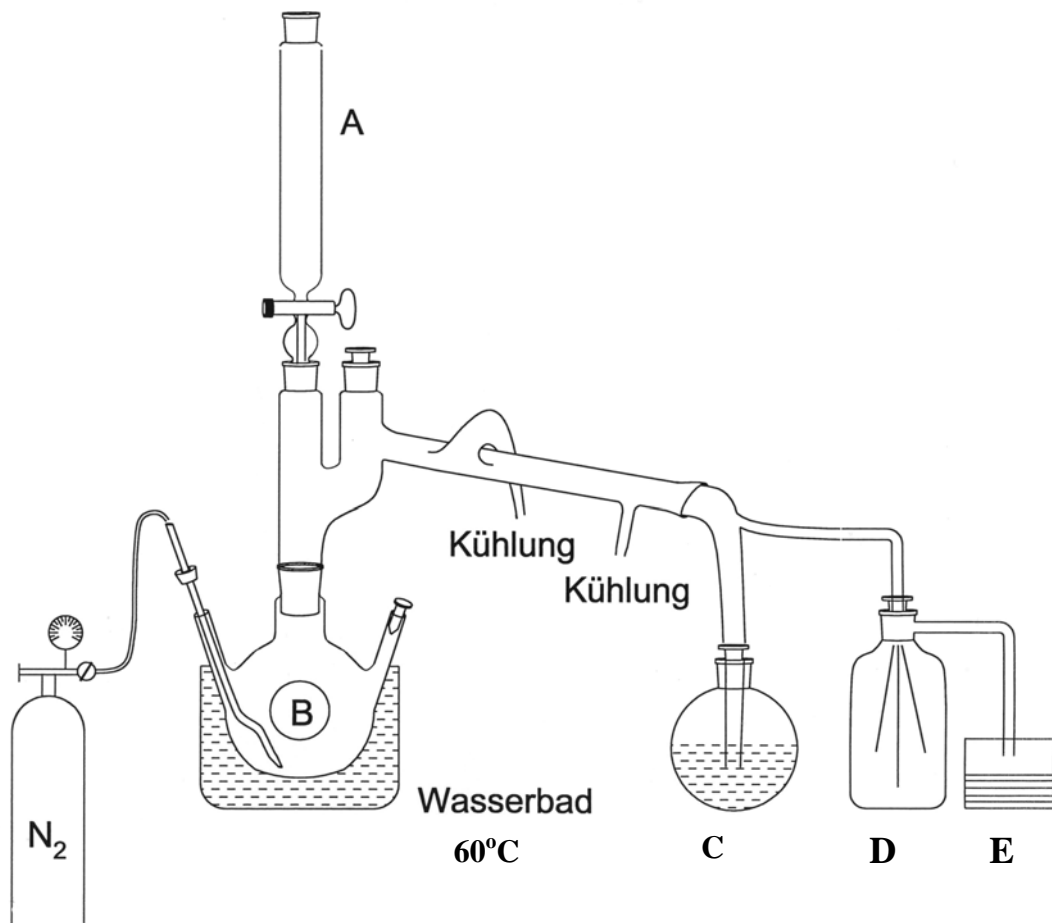


Abb. 1: Schema für die Herstellung der etherischen Diazomethanlösung.

### 2.2.2.3 Quantifizierung von Auxin mittels ELISA

Methyliertes Auxin wurde in einem ELISA mit monoclonalen Antikörpern Anti-IAA-*Antibody* 18-III-C3 (Mertens et al. 1985) (Primärantikörper) bestimmt. Dazu wurde die Mikrotiterplatte zuerst mit dem Sekundärantikörper (Kaninchen-*antimouse* 0,025 mg/ml in Natriumcarbonat Puffer) 16 h lang bei 4°C beschichtet, mit 0,05% TBS-Tween 20 gewaschen und mit BSA (0,5 mg/ml BSA in TBS) 1 h lang bei Raumtemperatur blockiert. Die Mikrotiterplatte wurde noch einmal mit TBS-Tween 20 gewaschen und dann mit Primärantikörpern (0,05 mg/ml Natriumcarbonatpuffer) 24 h lang bei 4°C beschichtet. Nach dem Waschen mit TBS-Tween wurden 100 µl der Probe oder Standardlösung und 100 µl Antigen-Enzym-Komplex (IES-AP-Konjugat siehe 2.2.2.4) IES-AP TBS-0,1%Gelatine in eine Verdünnung 1:2000 mit Hilfe der Transferplatte hinzugefügt und 4 h lang bei 4°C inkubiert. Nach dem Waschen wurde das gebundene IES-AP mit p-Nitrophenyl-phosphat (1mg/ml DEA) detektiert. Nach 1 bis 1,5 h bei Raumtemperatur wurde die Absorption bei 405 nm gemessen. Alle Schritte wurden im Dunkeln durchgeführt.

### 2.2.2.4 Synthese von IES-AP

Die Kopplung der IES an die alkalische Phosphatase (AP) erfolgte mittels der Carbodiimid-Methode (Weiler et al. 1981). Dabei wird die IES über ihre Carboxyl-Gruppe an Amino-Reste des Enzyms gebunden. Für die Synthese von IES-AP wurden folgende Lösungen benötigt:

#### 1-. IES-EDC Lösung

IES (5,71 µmol) wurde in 0,25 ml Dimethylformamid (DMF) gelöst und mit einer Lösung von 1 mg 1-Ethyl-3-(3 Dimethylaminopropyl) Carbodiimide (EDC) in 0,25 ml 0,2 M Trispuffer (pH 5,5) versetzt. Das Gemisch wurde 10-15 Minuten lang bei Raumtemperatur gerührt.

#### 2-. AP-Tris Lösung

50 µl Alkalische Phosphatase (AP für ELISA, Boehringer Mannheim) wurden mit 0,25 ml Trispuffer (0,2 M pH 5,5) verdünnt.

Die IES-EDC Lösung wurde in drei 100 µl Portionen in Intervallen von 10-15 Minuten zur AP-Tris Lösung hinzugegeben und danach 4 h lang bei Raumtemperatur gerührt.

Nach der Synthese wurde die AP-IES-Lösung mit Centricon YM-50-Filtern konzentriert und 6 mal mit TBS-Puffer nachgewaschen. 1 µl AP-IES wurde in 20 µl 50 mM

NaHCO<sub>3</sub> pipettiert und 10 µl davon auf 1 ml mit NaHCO<sub>3</sub> verdünnt. Daraus wurden in 10er Schritten mit jeweils 100 µl 4 weitere Verdünnungen hergestellt. Bei jedem Verdünnungsschritt wurden 100 µl zu 0,5 ml Phosphatasesubstrat Diethanolamin-Puffer (DEA) (pNPP 1 mg/ ml) gegeben. Die Aktivität der AP wurde bei 405 nm gemessen. IES-AP wurde mit Glycerin 1:1 verdünnt und bei -20°C aufbewahrt.

### Transferplatte

Die Transferplatte ist eine Mikrotiterplatte in U-Form mit einer Gummi-Dichtung. Alle Komponenten von der Transferplatte werden durch Schleudern auf die mit Antikörpern beschichtete Mikrotiterplatte übertragen.

## 2.2.3 Molekularbiologische Methoden

### 2.2.3.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Als Standard wurde folgender Reaktionsansatz benutzt:

x µl	DNA-Matrize (Template 1 - 10 ng)
5,0 µl	10x PCR-Puffer
1,0 µl	dNTPs [10 µM]
1,0 µl	<i>sense</i> Primer (+Strang) [10 pmol]
1,0 µl	<i>antisense</i> Primer (- Strang) [10 pmol]
0,1 bis 1 U/50 µl	<i>Taq-DNA</i> Polymerase
H <sub>2</sub> O ad 50 µl	

Das Aufschmelzen der DNA erfolgte bei 94°C (anfänglich 1-3 Minuten lang, im Zyklus jeweils 1 Minute lang). Die Anlagerung der Primer erfolgte nach dem Abkühlen (2 Minuten) bei X°C (X ist die optimale Temperatur für die Primerbindung) und noch einmal nach weiteren 1,5 Minuten bei 72°C für die Verlängerung der DNA durch die Aktivität der *Taq-DNA* Polymerase. Jeder Zyklus dauerte 4,5 bis 5 Minuten. Am Ende der Reaktion wurde die Temperatur von 72°C 10 Minuten lang gehalten, um die Syntheseschritte abzuschließen.

### 2.2.3.2 Ligation von DNA-Fragmenten mit T4-Ligase

Zur Ligation von DNA-Fragmenten in geeignete Vektoren wurde gewöhnlich der folgende Ansatz benutzt.

---

x $\mu$ l	DNA-Insert (150 ng)
1,0 $\mu$ l	Vektor (50 ng)
1,0 $\mu$ l	T4-DNA-Ligase
1,0 $\mu$ l	10x Ligations-Puffer
H <sub>2</sub> O ad 10 $\mu$ l	

Bei der Ligation eines Vektors mit einer Insert-DNA sollte das molare Verhältnis 1:3 (Vektor zu DNA) betragen.

Die Ligation erfolgte über Nacht bei 16°C, danach wurde sie 1 Stunde bei Raumtemperatur und anschließend 1 Stunde bei 37°C fortgesetzt, um die Aktivität der Ligase zu erhöhen.

### 2.2.3.3 T/A Klonierung

Die T/A Klonierung ist die Verknüpfung des Vektors pT-Adv mit einem PCR-Produkt.

Die direkte Ligation ist möglich, weil während der PCR durch die *Terminale Transferase*-Aktivität der Taq-Polymerase ein einzelnes Desoxyadenosin an das 3'-Ende aller Amplifikate angehängt wird. Unter Verwendung der 3'-Thymidin-Überhänge des Vektors pT-Adv konnte die Ligation ohne weitere Zwischenschritte durchgeführt werden.

### 2.2.3.4 Transformation

#### **Transformation von *E. coli* mit Plasmid-DNA**

Für eine Transformation wurden 100–150  $\mu$ l einer chemokompetenten Bakteriensuspension im Eis aufgetaut. Vom Ligationsansatz wurden 1-10  $\mu$ l mit den Bakterienzellen vermischt und 30 Minuten lang auf Eis inkubiert. Anschließend unterwarf man die Zellen für 60-90 s einem Hitzeschock bei 42°C und brachte sie dann wieder für 2 Minuten auf Eis. Nach Zugabe des 250  $\mu$ l LB-Mediums wurde der Transformationsansatz eine Stunde lang bei 37°C geschüttelt (225 rpm) und dann auf entsprechende Antibiotikahaltige Platten ausplattiert (z. B. LB-Amp., X-Gal-IPTG-Agarplatten). Die Platten wurden über Nacht im Brutschrank bei 37°C inkubiert.

## **Transformation von Agrobakterium**

Die Transformation von Agrobakterien erfolgte nach der Vorschrift von Höfgen und Willmitzer (1988). Zu den auf Eis aufgetauten transformationskompetenten Agrobakterium-Zellen (250 µl) wurde 0,5-1 µg Plasmid-DNA gegeben, 5 Minuten auf Eis inkubiert, danach wieder 5 Minuten in flüssigem Stickstoff (-196°C) eingefroren und anschließend bei 37°C inkubiert.

### **2.2.3.5 Isolierung der Plasmid-DNA aus *E. coli***

Zur Überprüfung der Klonierung, zur Sequenzierung und zur Sondenherstellung wurden Plasmide mit Hilfe des QIAprep<sup>®</sup> Spin Miniprep Kit in 3 ml Bakterienkultur (mit dem entsprechenden Antibiotikum) kloniert und dann, wie im Protokoll von QIAGEN beschrieben, isoliert.

### **2.2.3.6 Isolierung der Plasmid-DNA aus Agrobakterium**

Die Agrobakterien wurden in 3 ml YEB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum 36 Stunden lang bei 28°C angezogen und dann abzentrifugiert. Die Bakterien wurden in 100 µl Resuspendierungspuffer (50 mM Glucose; 25 mM Tris-HCl, pH 8,0; 10 mM Na<sub>2</sub>EDTA) aufgenommen. Die Zellwände wurden durch Zugabe von 20 µl Lysozymlösung (20 mg / ml frisch hergestellt) und nach 30minütiger Inkubation bei 37°C aufgebrochen. Die vollständige Lyse der Bakterienzellen erfolgte dann durch Zugabe von 200 µl alkalischer SDS-Lösung (0,2 N NaOH; 1 % (w/v) SDS). Nach einer Inkubationszeit von 5 Minuten bei 25°C wurden Proteine und Zellbruchstücke nach Zugabe von 50 µl Phenollösung (vorequilibriert mit 2 Volumina Lysierungspuffer) und 200 µl Neutralisierungspuffer (Natriumacetat 3 M, pH 5,2) ausgefällt und abzentrifugiert (5 min; 21000g). Zur DNA-Reinigung wurde die wässrige Phase mit Chloroform extrahiert, bevor die DNA durch Zugabe von 0,7 Vol. Isopropanol 15 Minuten lang präzipitiert wurde. Das Präzipitat wurde durch Zentrifugation bei 21000 g (40 Minuten bei 18°C) gesammelt, mit 70%igem Ethanol gewaschen und in 30 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen. Da im Agrobakterium nur eine geringe Menge von Plasmid-DNA gebildet wird und es sehr schwierig ist, diese nachzuweisen, wurde die Plasmid-DNA wiederum in *E. coli*-Zellen transformiert und konnte nun nachgewiesen werden.

### 2.2.3.7 Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen vom Typ II

Die gezielte Spaltung von DNA wurde für die Klonierung und Kontrolle verschiedener Klonierungsschritte eingesetzt. Die Effizienz einer Restriktionsspaltung ist abhängig von den Reaktionsbedingungen. Für jede Restriktionsendonuklease gibt es eine optimale Temperatur und einen entsprechenden Puffer.

Routinemäßig wurde folgender Restriktionsansatz mit einem Volumen von 20  $\mu$ l benutzt:

x $\mu$ l	DNA-Template (< 2,0 $\mu$ g)
1 $\mu$ l	von jeder notwendigen Restriktionsendonuklease vom Typ II (2U/ $\mu$ g DNA)
2 $\mu$ l	Puffer (manchmal war die doppelte Salzkonzentration, also 4 $\mu$ l notwendig)
H <sub>2</sub> O ad 20 $\mu$ l	

Der Verdau wurde bei entsprechender Temperatur 1 Stunde lang durchgeführt und die Reaktion durch Agarosegelelektrophorese kontrolliert.

### 2.2.3.8 Agarosegelelektrophorese von DNA und Extraktion von Fragmenten aus den Gelen

Agarosegelelektrophoresen wurden in Flachbettkammern mit Volumina zwischen 50 ml und 100 ml durchgeführt. Die Konzentration der Gele lag je nach Größe der zu trennenden DNA-Fragmente zwischen 0,8% und 2,0% Agarose. Zur Herstellung des Agarosegels wurde Agarose in 1xTBS bei 100°C gelöst und dann langsam abgekühlt. Bei einer Temperatur von ca. 55°C wurde Ethidiumbromid (Endkonzentration 1  $\mu$ g/ml) dazugegeben, die Gellösung in die Kammer gegossen und aushärtengelassen.

Als DNA-Marker wurden GeneRuler™ 100bp und 1kb DNA Ladder (MBI Fermentas, St.Leon-Rot) verwendet. Nach der Elektrophorese (bei 70-100 V, 1 bis 2 Stunde lang) wurde die gewünschte Bande aus dem Gel ausgeschnitten und je nach weiterer Verwendung entsprechend dem Protokoll der Hersteller mit QIAquick® Gel Extraction Kit oder mit Quantum Prep® Freeze 'N Squeeze DNA extrahiert.

### 2.2.3.9 Extraktion von Gesamt-RNA und mRNA aus den Zellen

#### Gesamt-RNA

Die Extraktion der Gesamt-RNA wurde je nach Verwendungszweck der RNA nach zwei verschiedenen Methoden durchgeführt.

### 2.2.3.10 RNA-Extraktion mit Hybaid RiboLyser Kit-Green

Der Kit enthielt folgende Komponenten:

Hybaid RiboLyser Matrix (die Matrix besteht aus Silikat und Keramik)

Reagenz A (Chaotropic RNA Stabilising, (eine Änderung des Reagenz von Cheung et al. 1994)

Reagenz B (Phenol Acid Reagent GREEN)

Reagenz C (Chloroform-Isoamyl-Alcohol GREEN)

Reagenz D (DEPC- *treated* Isopropanol *Precipitation Solution* GREEN)

Reagenz E (*Salt/Ethanol Wash Solution* GREEN)

Durch das Ribolyser Gerät ist die Extraktion des Materials ohne Mörsern möglich. Die mitgelieferte Hybaid RiboLyser Matrix (die die vollständige Lyse der Zellen in 20 bis 120 Sekunden ermöglicht) wurde nach Zugabe von Reagenz A, B und C 10 Minuten lang im Eis gekühlt. Danach wurde das Zellmaterial (500 mg) im RiboLyser 40 Sekunden lang auf Stufe 6 behandelt und anschließend wieder 10 Minuten gekühlt. Nach der Zentrifugation (16000 x g 15 Minuten, 4°C) wurde die obere Phase vorsichtig in ein steriles 1,5 ml Mikroreaktionsgefäß überführt und 300 µl Reagenz C zugegeben. Nach gründlicher Durchmischung wurde die Probe 5 Minuten lang auf Eis gestellt und anschließend bei maximaler Geschwindigkeit 2 Minuten lang zentrifugiert. Durch Zusatz von Reagenz D wurde die RNA aus dem Überstand präzipitiert. Der durch Zentrifugation gewonnene Niederschlag wurde 2 mal mit Reagenz E gewaschen und in 100 µl DEPC Wasser gelöst.

### 2.2.3.11 RNA Extraktion mit RNeasy Mini Kit

Der Kit enthält folgende Komponenten:

Puffer RLT (Lysispuffer)

Puffer RW1 (Waschpuffer)

Puffer RPE (Waschpuffer)

RNeasy-Säule Rneasy-QIAshredder Spinsäule

Das RNeasy Verfahren ist eine neuere Methode zur Isolierung von RNA. Sie kombiniert die selektiven Bindungseigenschaften einer Silicagel-Membran mit der Mikrozentrifugationstechnik. Das spezielle Hochsalz-Puffersystem ermöglicht die Bindung

von bis zu 100 µg RNA an die RNeasy Silicagel-Membran. Die Isolierung wurde nach der Vorschrift der Hersteller durchgeführt.

#### **2.2.3.12 mRNA Extraktion mit mRNA Direct™ Micro Sample Kit**

Die Methode basiert auf mit Oligo (dT)<sub>25</sub> magnetisch geladenen Partikeln von DYNABEADS. Die mRNA wurde aus der Gesamt-RNA unter Verwendung des "DYNABEADS® mRNA Purification Kits" isoliert. Die Gesamt-RNA-Lösung wurde 2 Minuten lang bei 65°C erhitzt und zu 1 mg (200 µl Original Suspension) Dynabeads® Oligo (dT)<sub>25</sub> Partikeln (in 2 x Bindepuffer vorequilibriert) gegeben. Dann wurde bei Raumtemperatur 4 Minuten lang hybridisiert. Der Ansatz wurde in einen magnetischen Reaktionsgefäßständer gestellt und der sich bildende Überstand entfernt. Die mit der mRNA beladenen magnetischen Partikel wurden anschließend zweimal mit je 200 µl Waschpuffer gewaschene, mit 10 µl Elutionspuffer versetzt und 2 Minuten lang auf 65°C erhitzt. Die abgetrennte mRNA-Lösung konnte abpipettiert werden.

Die Northern Blot-Hybridisierung wurde nach dem Protokoll des Kit Radprimer DNA Labeling Systems GibcoBRL (Karlsruhe) mit [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] d-ATP und [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] d-CTP durchgeführt.

#### **2.2.3.13 Differential Display von RNA**

Das Differential Display (DD) ist ein Verfahren für die Identifizierung der Gen-Expression (meist in Abhängigkeit von einer spezifischen Behandlung), und wurde von Liang und Pardee (1992) erstmalig beschrieben. Das gesamte Verfahren teilt sich in zwei umfangreiche Teile: 1. Identifizierung und 2. Anreicherung (Amplifizierung).

##### **Auffinden der exprimierten Gene**

##### **Reverse Transkription der RNA für Differential Display**

Die RNA für die reverse Transkription wurde nach dem RNeasy-Protokoll gewonnen. Zusätzlich wurde eine DNaseI-Behandlung durchgeführt. Dieser Schritt ist notwendig, um alle Spuren von DNA von der Transkription zu entfernen. Für die reverse Transkription wurden 0,4 µg RNA von jeder Probe entnommen und die Reaktion, wie unten beschrieben, durchgeführt.

Reaktionsansatz für die reverse Transkription



0,4 µg	RNA
1,0 µl	Oligo dT <sub>11</sub> VN [20 µM]
2,0 µl	dNTPs [200 µM]
4,0 µl	5x Reaktionspuffer
2,0 µl	DTT [0,1 M]
H <sub>2</sub> O ad 19 µl	

Der Reaktionsansatz wurde 5 Minuten lang bei 65°C und dann 60 Minuten lang bei 37°C inkubiert und nach weiteren 10 Minuten bei 37°C wurden 0,5 µl reverse Transkriptase (200 U/µl) und 0,5µl RNA-Guard-Ribonuklease Inhibitor (GibcoBRL, Karlsruhe) dazugegeben. Zum Schluss wurde der Ansatz 5 Minuten lang zur Inaktivierung der Transkriptase auf 95°C erhitzt.

### Differential Display-PCR

Die DD-PCR ist für die Markierung ([<sup>32</sup>P-]) und spätere Differenzierung von verschiedenen Genfragmenten notwendig. Die PCR wurde mit folgendem Reaktionsansatz durchgeführt.

2,0 µl	cDNA (aus der reversen Transkription)
2,0 µl	10x PCR-Puffer
2,0 µl	dNTPs [40 µM]
2,0 µl	<i>Arbitrary</i> -Primer [2 µM]
0,75 µl	Oligo-dT-Primer [20µM]
0,625 µl	[ <sup>32</sup> P-]Oligo-dT-Primer (2,2 µCi) (siehe Herstellung des [ <sup>32</sup> P-]Oligo-dT-Primers)
9,125 µl	DEPC-H <sub>2</sub> O
1,5 µl	Taq-DNA Polymerase (10 U/µl)

#### *Arbitrary*-Primer

A01	5' CAGGCCCTTC 3'
A2	5' TGCCGAGCTG 3'
A3	5' AGTCAGCCAC 3'

#### Oligo-dT-pRIMER

dT11VC	5' TTTTTTTTTT (GCA) C 3'
--------	--------------------------

Der Reaktionsansatz wurde gut gemischt und in das PCR-Gerät gestellt. Die Reaktion wurde 30 Sekunden lang bei 95°C (für die Denaturierung), 2 Minuten bei 40°C (für die Primerbindung) und nochmals 30 Sekunden bei 72°C (für die Primerextension) durchgeführt. Diese Schritte wurden unter gleichen Bedingungen 40 mal wiederholt. Abschließend erfolgte eine 5-minütige Inkubation bei 72°C.

### **Herstellung des [<sup>32</sup>P]-Oligo-dT-Primers**

Zum radioautographischen Nachweis der unterschiedlichen cDNA-Fragmente wurde der Oligo-dT-Primer mit Hilfe der T4-Polynukleotidkinase (T4-PNK MBI Fermentas) radioaktiv markiert. Die Markierung wurde mit einem Reaktionsansatz für 16 Reaktionen, wie weiter unten beschrieben, durchgeführt.

2,0 µl	Oligo-dT-Primer [40µM]
3,5 µl	[γ- <sup>32</sup> P] ATP 10 mCi/ml
2,0 µl	5x PNK-Puffer
1,5 µl	DEPC-H <sub>2</sub> O
1,0 µl	T4-PNK [15 U/µl]

Die Markierung wurde 45 Minuten lang bei 37°C durchgeführt und dann durch Abkühlen des Reaktionsgemisches auf 4°C gestoppt.

### **Elektrophorese in Polyacrylamid-Harnstoff-Gelen**

Die cDNA-Fragmente wurden in einem 0,2 mm dicken denaturierenden Polyacrylamid-Harnstoff-Gel (38x30) elektrophoretisch getrennt. Die Glasplatten wurden gründlich mit Spülmittel gewaschen und dann mit Aceton abgerieben oder über Nacht in 2 M NaOH gelegt. Die Innenseite der kleinen Platte wurde mit Sigmacote (Sigma) beschichtet. Die beiden Platten wurden durch Abstandhalter von 0,2 mm Dicke getrennt und mit Klebeband zusammengehalten. Für das denaturierende Gel wurden 40,4 g Harnstoff, 19 ml H<sub>2</sub>O, 16 ml 5xTBE und 16,8 ml 40%iges Acrylamid/Bisacrylamid (Verhältnis 19:1) gemischt, leicht erwärmt und dann bei Raumtemperatur abfiltriert. Zu der Mischung wurden 25 µl TEMED und 700 µl APS hinzugegeben. Die Mischung wurde sofort zwischen die Glasplatten gegossen und mindestens 1 Stunde lang polymerisieren gelassen.

Das fertige Gel wurde in die Elektrophoreseapparatur (Sequencing System Model S2 Gibco BRL) eingespannt und 45 Minuten lang in 1x TBE-Puffer bei 60W vor der Auftragung der Proben elektrophoretisch getrennt.

Für die Auftragung wurden von der DD-PCR 3,5  $\mu\text{l}$  der Reaktion mit 2,0  $\mu\text{l}$  Auftragspuffer für die DD gemischt, 2 Minuten bei 80°C inkubiert und dann auf Eis abgekühlt. Die Probe wurde mit einer sehr langen Pipettenspitze direkt auf die dafür vorgesehene Position des Gels aufgetragen und bei 60 W ca. 3 Stunden lang getrennt.

Nach der Trennung wurde das Gel auf Whatman Papier übertragen, mit einer sehr dünnen Folie bedeckt und 4 Stunden bei 40°C im Vakuum getrocknet. Dann konnte das Gel radioautographiert werden.

Die cDNA-Fragmente wurden aus dem Polyacrylamidgel eluiert, indem der Gelstreifen zunächst in 100  $\mu\text{l}$  H<sub>2</sub>O bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend 15 Minuten lang gekocht und 1 Minute lang bei 21000 g abzentrifugiert wurde. Durch Zusatz von 0,1 Volumen Kaliumacetat [3M] und 2,5 Volumina Ethanol konnte die DNA bei -20°C über Nacht präzipitiert werden. Der Niederschlag wurde durch 20-minütige Zentrifugation bei 21000 g gewonnen und in 10  $\mu\text{l}$  H<sub>2</sub>O aufgenommen.

#### **Anreicherung, Reinigung und Klonierung der cDNA-Fragmente**

Die gewonnenen cDNA-Fragmente wurden mit der PCR amplifiziert. Für die Reaktion wurde die gleiche Primerkombination wie in der DD verwendet, mit folgendem Reaktionsansatz:

4,0 $\mu\text{l}$	cDNA
2,0 $\mu\text{l}$	10x PCR-Puffer
4,0 $\mu\text{l}$	dNTPs [200 $\mu\text{M}$ ]
4,0 $\mu\text{l}$	Arbitrary-Primer [2 $\mu\text{M}$ ]
2,0 $\mu\text{l}$	Oligo dT-Primer [20 $\mu\text{M}$ ]
20,0 $\mu\text{l}$	H <sub>2</sub> O bideionisiertem
1,5 $\mu\text{l}$	Taq-Polymerase (10 U/ $\mu\text{l}$ )

Weil die Auftrennung im DD kein sehr scharfes Bandenmuster ergeben hatte, musste zur Analyse ein größeres Gelstück verwendet werden. Eine bessere Trennung wurde bei Verwendung von 6,0%igen Polyacrylamid-Gelen erzielt. Das Gel wurde mit Ethidium-Bromid gefärbt. Der gewünschte Gelbereich wurde ausgeschnitten und über Nacht bei 37°C in steril-filtrierte Elutionspuffer (0,5 M Ammoniumacetat, 10 mM Magnesiumacetat, 1 mM EDTA und 0,1% SDS) geschüttelt, dann bei 21000 g 10 Minuten lang zentrifugiert und der Überstand in ein frisches Gefäß übertragen. Das Gel wurde mit 200  $\mu\text{l}$  Elutionspuffer bei

37°C 10 Minuten lang erneut eluiert. Um eine höher konzentrierte DNA-Lösung zu erhalten, wurde die DNA aus dem Ansatz präzipitiert. Dazu wurde zum Überstand 0,1 Volumenteile Kaliumacetat [3 M] und 2,5 Volumenteile Ethanol hinzugegeben und der Niederschlag bei 21000 g (4°C, 20 Minuten) zentrifugiert und in 5 bis 10 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen. Die auf diese Weise gewonnene DNA wurde in den Vektor pT-Adv ligiert und dann kloniert.

#### **2.2.3.14 Herstellung einer *Chenopodium rubrum* cDNA-Bank und Screening nach DNA-Klonen**

Die cDNA-Bank wurde aus mRNA hergestellt, die aus einer 35 Tage alten, mit Auxin vorbehandelten *Chenopodium rubrum*-Suspensionskultur gewonnen wurde. Die mRNA wurde, wie im Protokoll von Stratagene (*Instruction Manual ZAP-cDNA<sup>®</sup> Synthesis Kit*) vorgeschrieben, in cDNA umgeschrieben. Nach der Trennung der cDNA's in verschiedene Größenklassen wurde eine Konzentrationsbestimmung durchgeführt. Die Fraktionen 6 bis 12 enthielten DNA. Die Fraktionen 11 und 12 wurden erneut über eine Säule SizeSep<sup>™</sup> 400 (Pharmacia, Uppsala, Schweden) gegeben, um DNA unter 400 bp abzutrennen. Vor der Klonierung und der Verpackung wurden jeweils die Fraktionen 6 bis 8 (cDNA-F1) und 9 bis 12 (cDNA-F2) wieder zusammengemischt. Die beiden so entstandenen cDNA-Banken wurden durch Zählung auf ihren Anteil an Insert-haltigen Klonen untersucht, danach wurden beide vereinigt, um eine repräsentative Bank für cDNA's zu erhalten. Diese cDNA-Bank hatte ca.  $2 \times 10^6$  Klone.

Die cDNA-Bank wurde mit verschiedenen DNA-Fragmenten, die entsprechend den Instruktionen des Manuals von Stratagen radioaktiv markiert worden waren, gescreent. Die Identifizierung der cDNA-Klone wurde mit der *In-Vivo-Excision* und anschließenden späteren Sequenzierung abgeschlossen.

#### **2.2.3.15 RACE-PCR („Rapid Amplification of cDNA Ends“) für das 5'-Ende**

Zur Herstellung vollständiger cDNA-Klone, denen ein Teil des 5'-Endes fehlte, wurde die RACE-PCR-Methode für das 5'-Ende (Smart<sup>™</sup> RACE cDNA Amplification Kit von Clontech) verwendet. Bei dieser Reaktion muss an das 5'-Ende der cDNA noch eine bekannte

Sequenz mit Hilfe der Reversen Transkriptase mit Endonuclease Aktivität fusioniert werden, ein sogenanntes Adapter SMART II A Oligonucleotid

5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACGCGGG-3'. Es resultiert eine cDNA mit dem natürlichen 5'-Ende und 3'-Ende, so dass eine Amplifizierung des zwischen diesen Abschnitten liegenden unbekanntem Sequenzanteils mittels PCR möglich wird (Abb. 2).

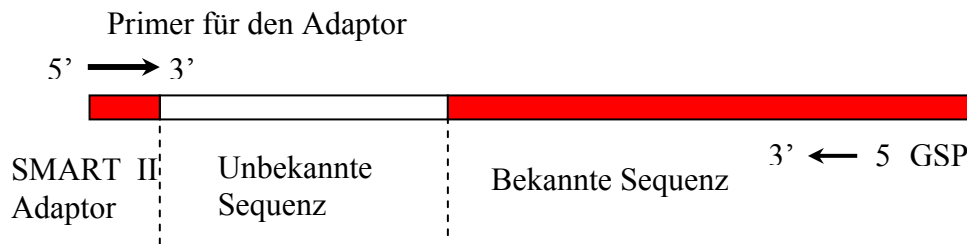


Abb. 2: Schematische Darstellung der RACE-PCR

In Abwandlung der Instruktionen zum Kit schloss sich erneut eine PCR an, die es ermöglichte, die gesamten cDNA zu klonieren. Dazu wurde das Gateway-Cloning-System verwendet.

### 2.2.3.16 Allgemeines zum Gateway-Cloning-System

Die Gateway-Technologie basiert auf einem ortsspezifischen Rekombinationssystem des Bakteriophagen Lambda, welches die Integration der Lambda-DNA in das *E. coli*-Chromosom und den Übergang vom lysogenen in den lytischen Vermehrungszyklus erleichtert (Ptashne 1992). Im Gateway-System sind die Lambda-spezifischen Komponenten modifiziert, um eine erhöhte Spezifität und Effizienz des Vorgangs erzielen zu können.

Letztendlich macht sich die Gateway-Technologie das Lambda-Rekombinationssystem zunutze, um den Transfer von die att-Bereiche flankierenden DNA-Sequenzen zwischen Vektoren zu vereinfachen.

Die BP-Reaktion: Sie erleichtert die Rekombination eines attB-Substrates (meist ein attB-PCR-Produkt oder ein linearisierter attB-Expressions-Klon) mit einem attP-Substrat (meist der Donor-Vektor). Es entsteht ein attL-haltiger Eingangsklon. Diese Reaktion wird durch den BP-Clonase-Mix katalysiert:

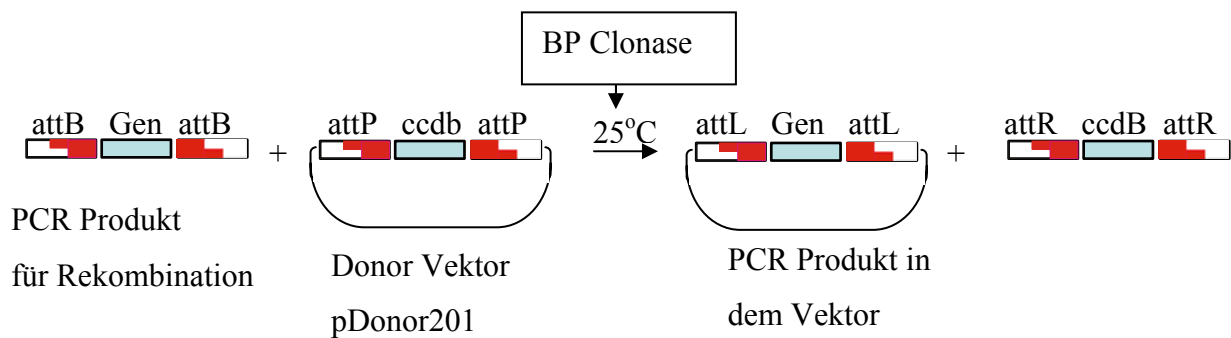


Abb. 3: Schematische Rekombinationsreaktion zwischen einem *attB*-PCR-Produkt und einem Donor-Vektor

## 2.2.4 Charakterisierung von cDNA-Klonen

### 2.2.4.1 Protein-Analytik

#### 1. Gekoppelte *In-Vitro*-Transkription/ Translation in Weizenkeimlingen

Die *In-Vitro*-Translation in Weizenkeimlingen wurde nach dem Protokoll von Promega (Mannheim) mit L-[<sup>35</sup>S]-Methionine durchgeführt.

Zur gekoppelten *In-Vitro*-Transkription/Translation wurde 1 µg DNA des entsprechenden Plasmids, das die zu transkribierende cDNA-Sequenz enthielt, eingesetzt. Die Transkription erfolgte mit Hilfe der T<sub>3</sub>-RNA-Polymerase entsprechend der Anweisung von Promega.

Zur Identifizierung der radioaktiv markierten Translationsprodukte wurden die Proben auf einem 12,5% SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Dann wurden die Gele bei 80°C in einem Vakuum-Geltrockner getrocknet und radioautographiert.

#### 2. Überexpression in *E. coli* Stratagene mit dem Vektor pCal-kc und dem *E. coli* Stamm *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIL

Nach Erprobung beider Systeme wurde für die Protein-Überexpression das „*Affinity protein expression and purification*“-System der Firma Stratagene benutzt. Dieses eröffnet die Möglichkeit, das überexprimierte Protein als Fusionsprotein mit Hilfe des Calmodulin-Bindungs-Peptid-Sektors (CBP) aus einem *E. coli*-Extrakt zu gewinnen. Durch eine Thrombin-Schnittstelle kann der CBP-Tag anschließend vom Zielprotein entfernt werden.

### 2.2.4.2 Funktionsanalyse von Genen durch *Post-transcriptional gene silencing* (PTGS)

#### Die Herstellung der PTGS-Konstrukte

Die Herstellung der PTGS-Konstrukte (bzw. RNAi-Konstrukte) erfolgte mit Hilfe des Vektors pHannibal. Dieser Vektor verfügt über eine Sequenz, die dem Intron der Pyruvat-Orthosphat-Dikinase aus *Flaveria trinervia* (Rosche et al. 1990, 1994) entspricht und die sich in der multiplen Klonierungsstelle befindet. Der Vektor hat außerdem die geeigneten Schnittstellen, um eine anschließende Klonierung in den binären Vektor pArt 27 zu ermöglichen.

Mit der entsprechenden Primerkombination (siehe unten) wurde ein Konstrukt, das die codierende Sequenz in Sense- und Antisense-Orientierung enthielt, durch PCR hergestellt.


Forward Primer	5'-C TCTAGA CTCGAG -3'	
Reverse Primer	5'-CC ATCGAT GGTACC-3'	
PCR Produkt nach dieser Primerkombination		
XbaI, XhoI		KpnI, ClaI

Abb. 4: Primerkombination für die Klonierung in pHannibal

Zuerst wurde mit Hilfe der Schnittstellen (XhoI und KpnI) die erste Klonierung (*Sense-Teil*) durchgeführt. Nach Bestätigung durch eine Kontrolle konnte dann der Antisense-Teil mit den externen Schnittstellen kloniert werden. Abb. 5 zeigt eine Grafik dieser Klonierung.

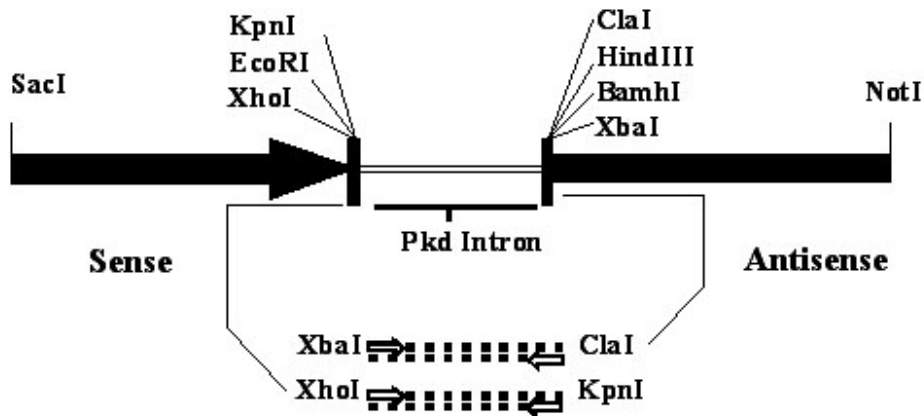


Abb. 5: Klonierungsschema von RNAi-Konstrukten mit dem pHannibal-Vektor (Wesley et al. 2001)

Der Vektor pHannibal mit der cDNA in Sense-Antisense-Orientierung wurde geschnitten und in den Vektor pArt27 kloniert. Dieser besitzt den notwendigen restlichen Teil für die T-DNA und ist folgendermaßen aufgebaut:

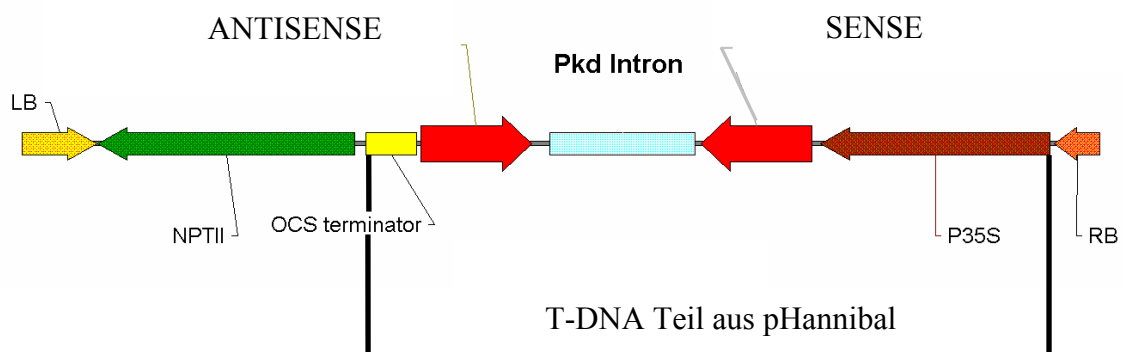


Abb. 6: Schematische Darstellung des T-DNA-Teils des Sense-Antisense-Konstrukts.

Dieses Konstrukt wurde in Agrobakterien des Stammes LBA4404 transferiert, die später für die Transformation der Zellkultur dienen sollten.

### 2.2.4.3 Transformation der *Chenopodium rubrum*-Zellen

#### Transformation mittels Agrobakterien (LBA4404) in Zellkulturen

Für die Transformation der Zellkultur von *Chenopodium rubrum* wurde zuerst eine Agrobakteriumkultur (LBA4404) unter Einfluss der Antibiotika Spectinomycin und Streptomycin bei 30° wachengelassen. Diese Kultur enthielt das kointegrative Plasmid pArt27+T-DNA für die RNAi aus pHannibal. Danach wurden die Agrobakterien 10 Minuten lang bei 4000 rpm abzentrifugiert, in MS-Medium aufgenommen und die OD<sub>600</sub> auf 1,0



eingestellt. Mit 4 ml dieser Suspension wurde die Zellkultur mit Hilfe von Acetosyringon (100 mM) infiziert.

Transformiert wurden verschieden alte Zellkulturen (autotrophe Zellkultur: 7, 14 und 21 Tage alt, heterotrophe Zellkultur: 7d alt). Um die Agrobakterien abzutöten, wurde nach 4 bis 5 Tagen Cefotaxim zugegeben. Nach weiteren 4 Tagen wurde Kanamycin in das MS-Medium gegeben, um die transformierten Zellen zu selektieren. Alternativ wurde ein Teil des Ansatzes auf Agarplatten mit Glucose und Kanamycin übertragen.

### **Transformation mittels Partikelbeschuss von *Chenopodium rubrum*-Kalli.**

Mikrokallus von *Chenopodium rubrum* wurde auf eine MS-Agarplatte mit Glucose übertragen und eine Woche lang wachengelassen. Dann wurde mittels Partikelbeschusses transformiert (Klein et al. 1987).

### **Beschichten der Goldsuspension**

Der Hersteller der Beschusskanone (Biorad, Modell PDS-1000/He) empfiehlt in seiner Gebrauchsanweisung folgendes Vorgehen:

Zur Herstellung der Goldlösung wiegt man 60 mg Gold (BioRAD; München) ab und wäscht das Material 10 Minuten lang in 70%igem Ethanol. Anschließend zentrifugiert man die Partikel in der Eppendorffzentrifuge kurz ab und wäscht diese dreimal mit sterilem, bidestilliertem Wasser, bevor man sie schließlich in 1 ml einer 50%igen Glycerinlösung (625 µl Glycerin und 375 µl Wasser) aufnimmt.

12,5 µl der Goldsuspension „1,0“ (1 µm Durchmesser) werden in einem Eppendorffgefäß gut durchgemischt, bevor 1 µg der zu transformierenden DNA am Rand des Gefäßes zugegeben werden. Den Ansatz mischt man eine Minute lang gründlich, wobei die DNA an das Goldmaterial bindet. Nach der getrennten Zugabe von 5 µl Spermidin und 12,5 µl 2,5 M CaCl<sub>2</sub> wird wiederum 3 Minuten lang gemischt und kurz in der Eppendorff-Zentrifuge sedimentiert. Den Überstand entfernt man, während der Niederschlag zweimal mit je 250 µl 70%igem Ethanol gewaschen wird. Abschließend wurde das Sediment in 72µl 98%igem Ethanol aufgenommen.

12 µl der Suspension wurden auf einen bereits sterilisierten Makro-Träger mittig aufgebracht. Nachdem der Alkohol verdunstet ist, kann der Träger für den Beschuss eingesetzt werden.

### **Beschuss**

Zur Vorbereitung werden die benötigten Stopping-Screen-Gitter und Rupture-Disk-Plättchen in 70%igem Ethanol mindestens 15 Minuten lang gewaschen und anschließend an der Luft getrocknet. Die Vakuumpumpe wird eingeschaltet, und ein Heliumdruck von mindestens 1300 psi eingestellt. Man legt ein Rupture-Disk in das obere Drehteil der Beschusskanone ein und schraubt dieses mit dem Drehmomentschlüssel fest. In die Metallhalterung des Schubteils wird ein Stopping-Screen eingelegt, bevor darauf der Makro-Träger-Halter mit dem mit Gold-DNA versehenen Makro-Träger geschraubt wird. Das komplette Schubteil wird in die erste Leiste eingeführt, eine geöffnete MS-haltige Petrischale mit Kallus in die dritte. So ergibt sich eine Flugstrecke der Goldpartikel von etwa 6 Zentimetern.

Nach dem Schließen der Plexiglastür wird durch die Pumpe evakuiert. Sobald der Luftdruck innerhalb der Kanone auf unter 27 mm Hg gesunken ist, wird der Druck konstant gehalten, und der Schuss durch Heliumgas eingeleitet: erreicht der Heliumdruck innerhalb der Kammer einen Wert von mehr als 1300 psi, so wird die Rupture-Disk durchbrochen, und die DNA-behafteten Goldpartikel fliegen auf das zu beschießende Material (Fettig 1998).

### **Selektion transformierter *Chenopodium rubrum*-Zellen**

Die Selektion der Kallus-Kulturen auf Agar geschieht durch Überimpfen der noch vitalen Kalli auf eine Kanamycin-haltige MS-Platte (25 µg Kanamycin/ml Medium). Da auf diesem Selektionsmedium nur erfolgreich transformierte Zellen wachsen, steigt der Anteil an Transformanten nach jeder Subkultur bis zur vollständigen Selektion an.

Danach werden die Kalli in eine Suspensions-Batchkultur gegeben, so wie auch die Anzucht bei Vorhandensein einer Kanamycinkonzentration von 7,5 µg/ml erfolgt (siehe 2.2.1.1).

### 3 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

#### 3.1 Die Phasen der Kultur von photoautotrophen *Chenopodium rubrum* - Zellen

In der vorliegenden Arbeit wurde eine photoautotrophe, weitestgehend phytohormon- autonome Suspensionskultur von *Chenopodium rubrum* L. verwendet. Sie kann einerseits bei kontinuierlicher Kultur im Bioreaktor immer in Teilung gehalten werden (Peters, pers. Mitteilung), andererseits aber auch als Suspensions-Batchkultur einen Entwicklungsprozess ähnlich einem Blatt durchlaufen. Damit lassen sich die Zusammenhänge zwischen Zellteilung und Verjüngung, sowie zwischen stationärem Zustand und Altern studieren. Physiologisch wurde diese Zellkultur bereits gut charakterisiert. Zahlreiche Untersuchungen der Wirkung einzelner Phytohormone, des endogenen Cytokininspektrums und des Kohlenstoff- und Stickstoffmetabolismus wurden mit dieser Zellkultur durchgeführt, so dass sie ein bereits gut charakterisiertes System darstellt (Ziegler und Scheibe 1989; Schäfer et al. 1992; Beck und Renner 1990; Peters et al. 2000).

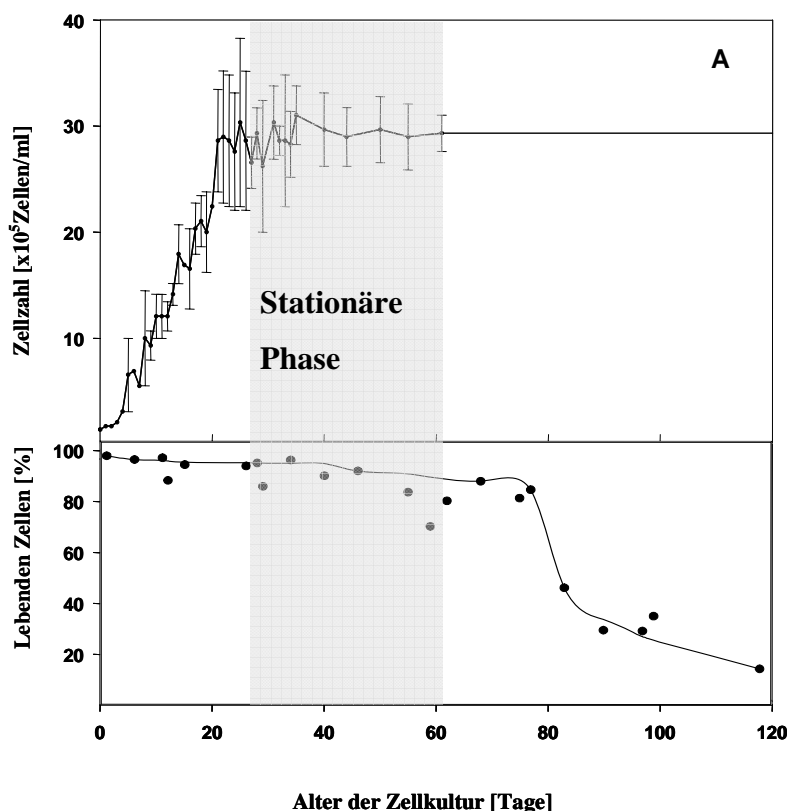


Abb. 7: Entwicklung einer *Chenopodium rubrum*-Suspensions-Zellkultur

Die photoautotrophen Zellen von *Chenopodium rubrum* können ohne Subkultivierung ca. 100 Tage als Suspensions-Batchkultur unter Langtagbedingungen (16:8 h, Licht/Dunkel)

---

gehalten werden. Das aktive Teilungswachstum der Zellen hört nach 4 Wochen auf und die Zellen gehen in eine stationäre Phase über (Abb. 7a).

Während der stationären Phase (Tag 28 – 63) nimmt aber die Biomasse noch bis zum Tag 60 zu (Beck und Renner 1990). Der Anteil der lebenden Zellen nimmt bis dahin kaum ab, verringert sich aber schnell in der anschließenden Alterungsphase. In Kulturen, die älter als 100 Tage sind, werden kaum noch lebende Zellen nachgewiesen. Die Zeitspanne von ca. 15 Wochen ohne Subkultivierung liegt im Bereich der Lebensspanne von Blättern vor allem von krautigen Pflanzen. Somit könnten Untersuchungen der Wachstums- und Alterungsvorgänge der Zellkultur Gemeinsamkeiten aber auch Unterschiede zum Lebensablauf eines Blattes erkennen lassen.

Abb. 7b zeigt das Verhalten von *Chenopodium rubrum* in Bezug auf die Anzahl der lebenden Zellen innerhalb von 120 Tagen. Dieser Kurvenverlauf wird in der Arbeit zur Korrektur der erzielten Daten herangezogen, sowohl für die Auxinbestimmung als auch für die Interpretation der Gen-Expression.

### 3.2 Endogenes Auxin und 2,4-D im Verlauf der Suspensions-Batchkultur von *Chenopodium rubrum*

Die vorliegende Arbeit wurde mit der Erarbeitung einer Methode zur Bestimmung des endogenen Auxinspiegels in der Zellkultur von *Chenopodium rubrum* begonnen. Grundlage für die Bestimmung der IES-Konzentration war die ELISA-Methode von Weiler (1986). Da bei dieser Methode bei der Extraktion der Auxine aus den Kulturzellen ein sehr hoher Verlust auftrat, wurde zunächst nach einer effizienteren Extraktions- und Reinigungstechnik gesucht.

Zur Optimierung der Extraktion und Vorreinigung wurde die Ausbeute mit markierter IES ( $[2-^{14}\text{C}] \beta$ -Indolessigsäure 40 Ci/mmol, 0.1mCi/ml) bestimmt.

Die einzelnen Schritte des optimierten Verfahrens sind in Tabelle 1 (Seite 18) der Methode von Weiler (1986) gegenüber gestellt. Hier sollen nur die einzelnen Schritte erwähnt werden: Die Zellen werden mit 90% Methanol extrahiert und der Extrakt über eine mit 90% Methanol equilibrierte C18-Säule gereinigt. Ein zweiter Reinigungsschritt geschieht an einer mit Wasser equilibrierten C18-Säule, von der das Auxin mit Methanol eluiert wird. Durch diese Modifikation der Extraktion und Reinigung konnte eine Ausbeute von 91% erreicht werden.

Als weiterer Schritt wurde geprüft, ob die verwendeten Antikörper eine Kreuzreaktivität mit 2,4-D, dem für die Entwicklung der Zellkultur essentiellen Auxin, aufwiesen. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Mertens et al. (1985) wurde eine solche Kreuzreaktivität nicht nachgewiesen. Somit konnte die IES ohne Störung in der Zellkultur quantifiziert werden.

Die Entwicklung der untersuchten Zellkultur von *Chenopodium rubrum* ist in der Anfangsphase nur mit synthetischem Auxin 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (2,4-D) möglich, nicht jedoch mit natürlichem Auxin 3-Indolessigsäure (IES). Die Zugabe von beiden Phytohormonen ermöglicht eine Entwicklung der Zellkultur. Bei einer IES-Konzentrationen, die höher ist als  $10^{-4}$  M, kommt es jedoch zu einem sofortigen Absterben der Zellen. Dem gegenüber wurde in Pflanzenzellen ein schnelles Wachstum bei einer IES-Konzentration zwischen  $10^{-7}$  und  $10^{-3}$  M beobachtet (Yang et al. 1993). Nach der lag-Phase konnte nach Zugabe von IES in der oben genannten Konzentration ( $10^{-7}$  und  $10^{-3}$  M) kein negativer Einfluss an die Lebensfähigkeit der Zellkultur beobachtet werden.

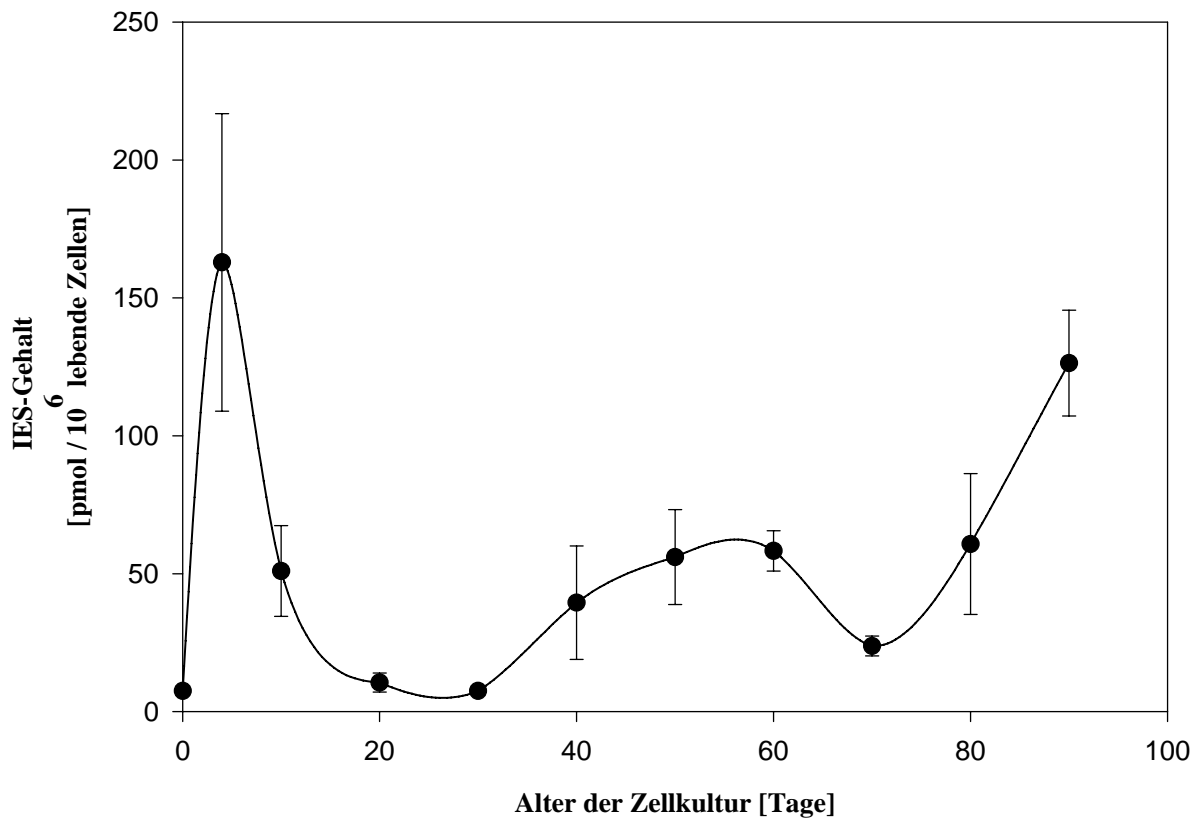


Abb. 8: Endogener Auxingehalt der Suspensionskulturzellen von *Chenopodium rubrum* im Verlaufe der Entwicklung der Zellkultur (n = 6)

Die Abb. 8 zeigt, dass der Gehalt an IES in der Anfangsphase (Tage 1-4) deutlich ansteigt, danach aber noch während der späteren Teilungsphase wieder auf den Anfangswert zurückfällt. In der stationären Phase nimmt die Auxinkonzentration vorübergehend nochmals zu, fällt zum Beginn der Seneszenz wieder ab, steigt aber in der Schlussphase erneut deutlich an. Wie die nachfolgenden Untersuchungen zeigen, steht der endogene Auxingehalt offensichtlich unter der Kontrolle von 2,4-D, wie dies auch von der Interaktion zwischen 2,4-D und dem Phytohormon Ethylen bekannt ist (Peters et al. 2000 für *Chenopodium rubrum*, Gamborg und LaRue 1971 für *Ruta graveolens* und *Rosa sp*). Auch andere synthetische Auxine zeigen einen derartigen Effekt (Morgan et al. 1962; 1970; Maxie et al. 1967; Ashton und Crafts 1981; Hall et al. 1985).

Um einen potentiellen Einfluß von 2,4-D auf den endogenen Auxingehalt festzustellen, wurde zum einen die Konzentration des künstlichen Auxins im Verlauf der Zellkultur gemessen, zum anderen die Wirkung unterschiedlicher 2,4-D-Konzentrationen auf

das Wachstum der Zellen und den endogenen Auxingehalt untersucht (Tabelle 3). Ohne den Zusatz von 2,4-D ist die *Chenopodium rubrum*-Zellkultur („Bayreuther Linie“) nicht lebensfähig. Die zum Wachstum notwendige Minimalkonzentration ist 0,016  $\mu\text{M}$ . Es konnten aber neue Linien der Zellkultur von *Chenopodium rubrum* erhalten werden, die mit geringeren 2,4-D Konzentrationen als das Originalrezept angibt, stabil bleiben (Tabelle 3). Stabil sind die neuen Zellkultur-Linien, wenn sie das gleiche Wachstumsverhalten, d.h. die gleiche Zellzahl und Biomasse, wie die Originallinie von *Chenopodium rubrum* aufwies.

Tabelle 3: Erzeugung und Charakterisierung verschiedener 2,4-D bedürftiger Linien der Zellkultur von *Chenopodium rubrum*

Zellkultur - Linie	End-Konzentration von 2,4D [ $\mu\text{M}$ ]	Stabilität
<i>Ch.R</i>	0.1	Stabil
<i>Ch.R 200</i>	0.06	Stabil
<i>Ch.R 100</i>	0.033	Stabil nach 3 Generationen: Adaptation
<i>Ch.R 80</i>	0.026	Stabil nach 3 Generationen: Adaptation
<i>Ch.R 50</i>	0.016	Stabil nach 7 Generationen: Adaptation
<i>Ch.R 25</i>	0.0083	Nicht stabil
<i>Ch.R 0</i>	0	Nicht lebensfähig

Diese neuen Linien der Zellkultur ermöglichten die Untersuchung des Effektes von 2,4-D auf den endogenen IES-Spiegel (Abb. 9).

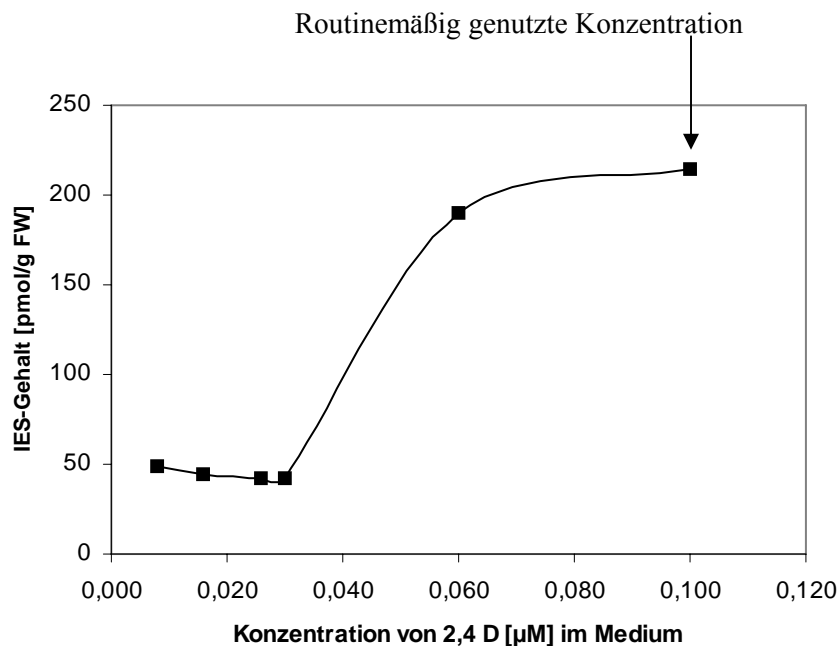


Abb. 9: Wirkung verschiedener 2,4-D-Konzentrationen auf den Auxingehalt von *Chenopodium rubrum*-Zellkulturen. Der Auxingehalt wurde mit 28 Tage alten Kulturzellen

ermittelt (also im Stadium der minimalen endogenen Konzentration), die mit verschiedenen Konzentrationen von 2,4-D angezogen worden waren.

Bis zur 2,4-D-Konzentration von 0,0083  $\mu\text{M}$  ergaben sich nach 28 Tagen keine Veränderungen des geringen endogenen Auxinspiegels. Eine Erhöhung der 2,4-D-Konzentration über diesen Wert hinaus führte aber zu einer drastischen Zunahme.

Ein Problem bestand darin zu klären, warum die Linie Ch. R 25 (Tabelle 3) trotz des eindeutig nachweisbaren Auxingehalts nicht stabil war. Möglicherweise lag dies am 2,4D-Gehalt des *Inoculums*, welcher den ersten Subkultivierungszyklus ermöglicht, bei folgenden Subkultivierungen dann aber so stark verdünnt wird, dass die Zellen absterben.

Abb. 10 zeigt die Abhängigkeit des endogenen IES Spiegels von 2,4-D selbst in seneszierenden Zellen: 2,4-D wurde an 60, 67 und 74 Tage alten Zellkulturen appliziert (0,1  $\mu\text{M}$  Endkonzentration) und der IES-Gehalt der Zellen 3 Tage später bestimmt. Es ergab sich eine deutliche Zunahme des endogenen Auxinsgehalts gegenüber der Kontrolle (ohne 2,4-D).

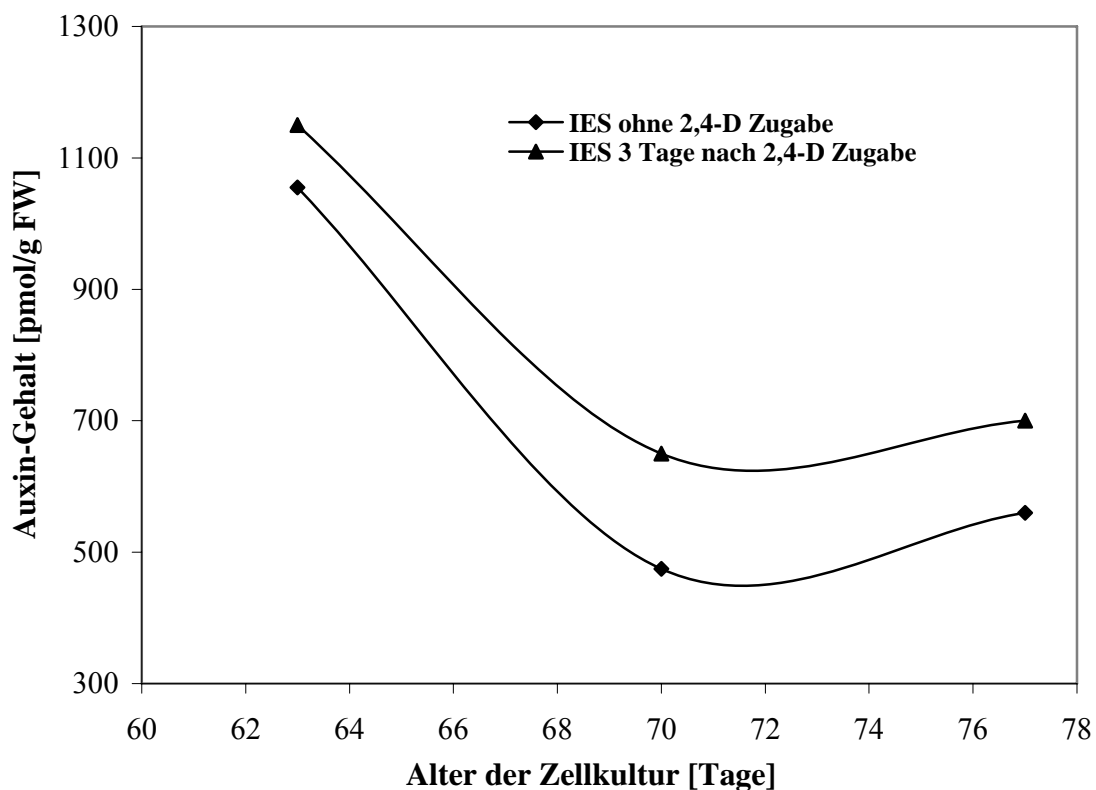


Abb. 10: Auxingehalt von alternden (63, 70, 77 Tage) *Chenopodium rubrum*-Kulturzellen 3 Tage nach Zugabe von 2,4-D (0,1  $\mu\text{M}$  Endkonzentration)



Eine stimulierende Wirkung von 2,4-D auf den IES-Gehalt der Zellen läßt sich also sowohl bei jungen (Abb. 9) als auch bei alten Zellen feststellen. Interessanterweise wächst die Zellkultur, die uns von Prof Dr. T. Roitsch (Würzburg) überlassen wurde, ohne Zusatz von 2,4-D. Beide Zellkulturlinien zeigen eine ähnliche Wachstumskurve der Zellzahl. In beiden Kulturtypen wurde der Auxingehalt verglichen. Bei der Würzburger Zelllinie wurde eine Konstanz des Auxingehaltes auf niedrigem Niveau während der gesamten Lebensdauer der Zellkultur beobachtet (Abb. 11). Der anfängliche Anstieg unterblieb. Die Konzentration des endogenen Auxins blieb während der gesamten Lebenszeit der Kultur etwa auf dem minimalen Niveau der mit 2,4-D behandelten Bayreuther Linie der Zellkultur im Alter von 30 Tagen.

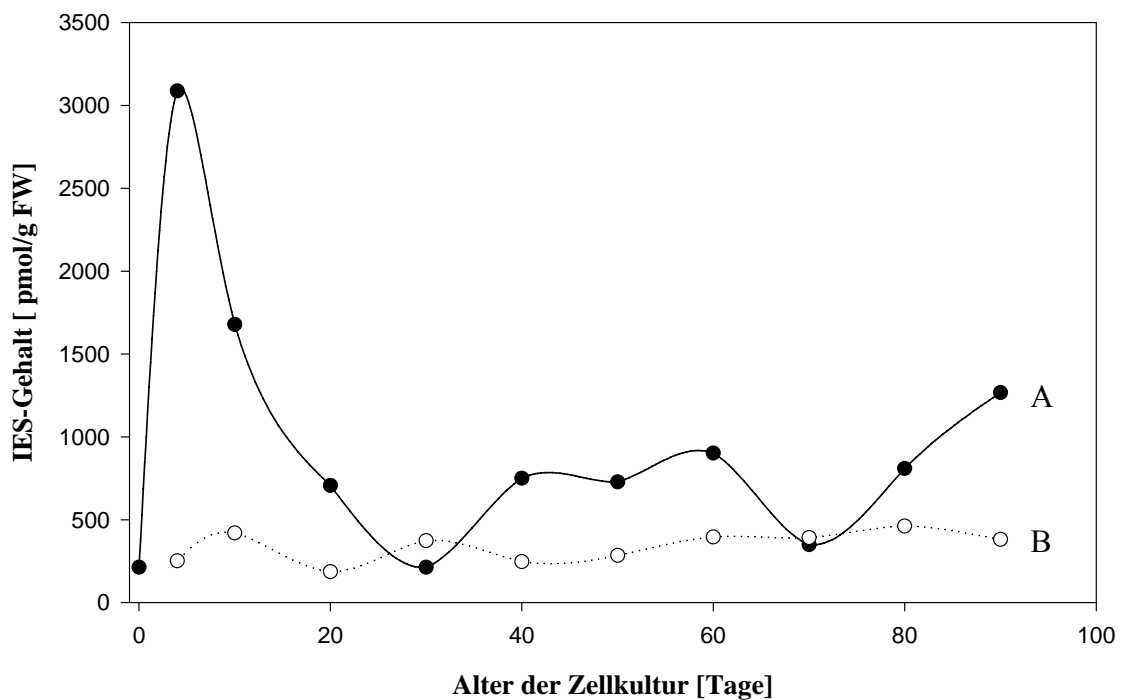


Abb. 11: Endogener Auxingehalt zweier Linien von *Chenopodium rubrum*-Kulturzellen im Laufe der Entwicklung der Zellkultur.

A- Bayreuther Linie (mit 0,1 $\mu$ M 2,4-D)

B- Würzburger Linie (ohne 2,4-D)

Die Abb. 12 zeigt die Konzentration von 2,4-D im Medium der Suspensionskulturzellen von *Chenopodium rubrum* im Verlaufe der Zellkultur. Während der ersten 5 Tage sinkt die Konzentration des 2,4-D auf ca. 10% des Anfangsgehaltes ab und nach 20 Tagen war kein 2,4-D mehr im Medium nachweisbar. Ein geringfügiger Anstieg ergab sich in der späten stationären Phase (Tag 40 - 50) und im Verlauf der Alterungsphase (Tag 70 –

90). Damit entspricht diese Kinetik tendenziell der Kinetik des Auxingehaltes der Zellen. Ähnliche Beobachtungen wurden von einer der Zellkulturen von Möhren berichtet (Michalczuk et al. 1992).

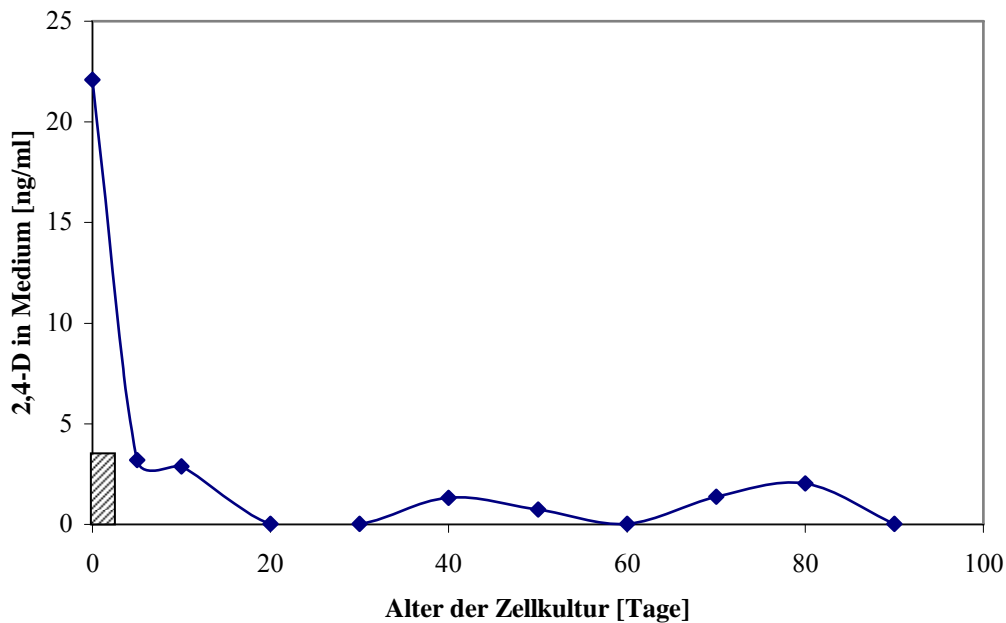


Abb. 12: Konzentration von 2,4-D im Kultur-Medium der Suspensionskulturzellen von *Chenopodium rubrum* im Verlaufe der Entwicklung der Zellkultur. ▨ Die zum Wachstum notwendige Minimalkonzentration von 2,4-D in der Anfangsphase.

Die Induktion der endogenen Auxinsynthese durch 2,4-D wurde bereits 1953 postuliert (Crafts 1953) und in einer Zellkultur von *Daucus carota* nachgewiesen (Michalczuk et al. 1992). Sie führt gewöhnlich zu Wachstumsaberrationen, auf denen die herbizide Wirkung von 2,4-D beruht.

Interessant sind auch die Schlussfolgerungen von Gamborg und LaRue (1971) in denen 2,4-D als Auxin klassifiziert wird, das sich deutlich von anderen Auxinen in seinen Auswirkungen auf die Zellteilung und Differenzierung unterscheidet. Ware (1994) berichtete, dass die Phenoxy-carboxyl-Säuren die Zellteilung der Pflanzen und den aktiven Phosphat – Metabolismus beeinflussen, und dass sie als Konsequenz daraus auch den Nukleinsäure – Metabolismus modifizieren. Dieses könnte die Resultate von Gamborg und LaRue (1971) erklären.

Dagegen gingen Ashton und Crafts (1981) in ihrer Interpretation der Wirkung des 2,4-D von der Ähnlichkeit der Moleküle aus: IES und 2,4-D haben sehr ähnliche Strukturen, so dass die Pflanze möglicherweise keinen Unterschied erkennt. Exogenes 2,4-D soll somit wie endogene IES wirken. Gegen diese Annahme spricht die Abhängigkeit der IES-Synthese von der 2,4-D Konzentration wie sie in Abb. 9 gezeigt ist. Weiter unten wird außerdem eine unterschiedliche Genexpression durch 2,4-D und IES beschrieben, welche die unterschiedlichen Wirkungen beider Wachstumsstoffe beweist. Es ist zu vermuten, dass 2,4-D in die Vakuole sequestriert und dort eventuell akkumuliert wird.

### 3.3 Gene, deren Expression durch Auxin induziert wird

Um den Einfluss von IES auf die Genexpression in *Chenopodium rubrum* Zellen untersuchen zu können, mussten sowohl der physiologisch richtige Zeitpunkt der Auxinzugabe als auch die Aufnahmegeschwindigkeit des Phytohormons durch die Zellen bestimmt werden. Wie in Abb. 8 gezeigt, wiesen 28-35 Tage alte Zellkulturen den niedrigsten endogenen IES-Gehalt auf (Abb. 8). Die Zugabe von 2,4-D in diesem Zeitraum sollte deshalb den größten Effekt auf Zellteilung und Wachstum (Peters et al. 2000; Fountain et al. 2003) und somit auch auf die Genexpression haben.

Zunächst war zu klären, wie schnell die Zellen exogenes Auxin aufnehmen, um die optimale Applikationszeit festzulegen. Mit <sup>14</sup>C-markierter IES wurde die Aufnahme aus dem Medium gemessen (Abb. 13) Bereits 3 Minuten nach Zugabe war die Konzentration im Medium auf 10% abgesunken. Eine ähnlich schnelle Aufnahme berichtete Delbarre et al. (1996) mit Zellkulturen von *Nicotiana tabacum*, bei denen nach 15 Minuten 25 – 30 % der radioaktiven IES absorbiert waren. Allerdings waren die Experimente von Delbarre et al. (1996) mit Zellen der exponentiellen Teilungsphase durchgeführt worden, während hier stationäre Zellen verwendet wurden, die einen besonders niedrigen Auxinspiegel aufweisen (17% der exogenen Konzentration).

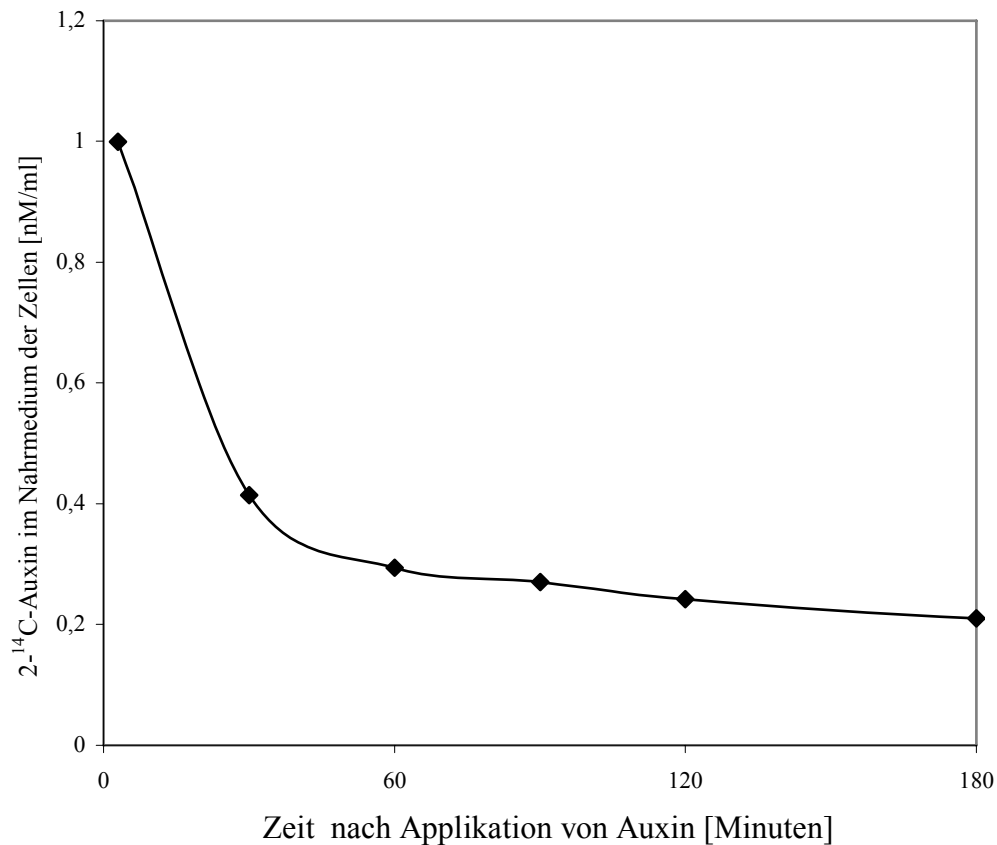


Abb. 13: Zeitkinetik des Verschwindens von (exogenen) 2-<sup>14</sup>C-markiertem Auxin aus dem Nährmedium der Kulturzellen

### 3.3.1 Genexpression der Zellkultur in Abhängigkeit von natürlichem und künstlichem Auxin

Auxin-induzierte Genexpression wurde durch Differential Display untersucht. Zu einer fünfunddreißig Tage alten Zellkultur von *Chenopodium rubrum* wurde IES oder 2,4-D gegeben, mRNA isoliert und in radioaktiv markierte cDNA „umgeschrieben“. Die cDNA wurde gelektrophoretisch aufgetrennt und radioautographisch detektiert. Abb. 14 zeigt ein Radioautogramm, das die cDNA-Bruchstücke nach zweistündiger Inkubation der Zellen mit IES, 2,4-D sowie eine entsprechende Kontrolle zeigt.

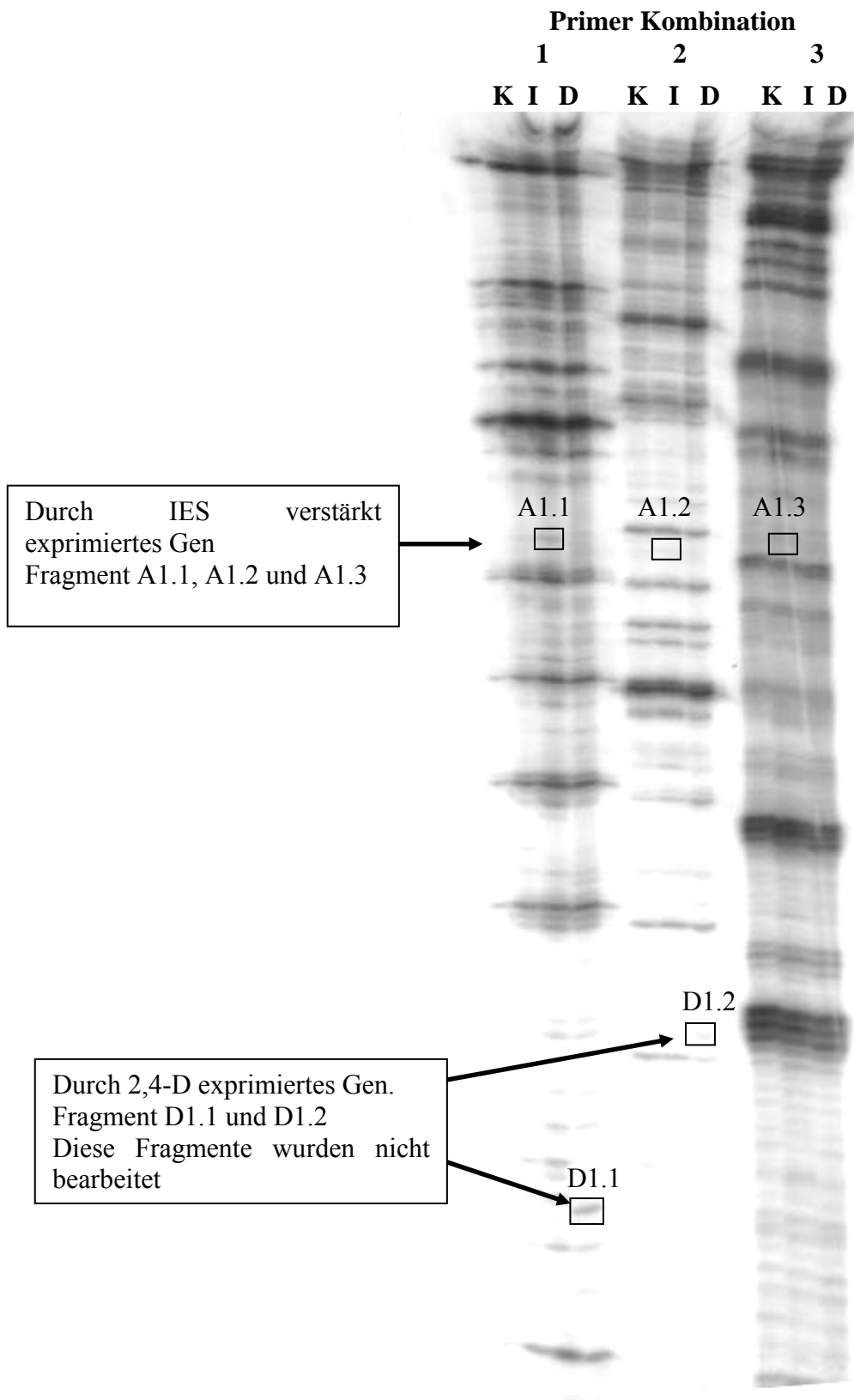


Abb. 14: Differential Display (cDNA) von 35 Tage alten Zellen nach zweistündiger Behandlung mit IES oder 2,4-D. Detektion mit 3 verschiedenen Primer-Kombinationen (Material und Methoden Seite 28) 1.- A1-dT11VC, 2.- A2-dT11VC, 3.- A3-dT11VC. K- Kontrolle; I-IES; D- 2,4-D

Bereits die 1. Elektrophorese zeigte unterschiedliche Genexpression nach Zugabe von IES und 2,4-D. Die Unterschiede im Genexpressionsmuster erhärten die zuvor aufgestellte Hypothese, dass 2,4-D und IES verschiedene physiologische Effekte in Zellen von *Chenopodium rubrum* auslösen, obwohl beide Phytohormone als Auxin klassifiziert werden.

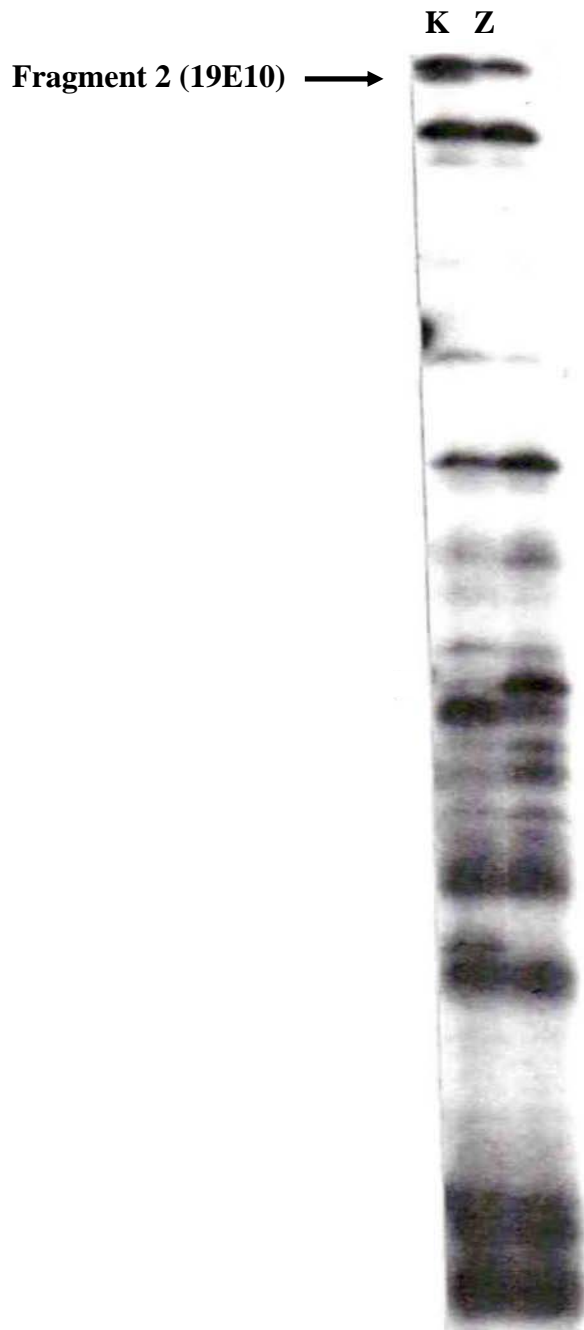


Abb. 15: Differential Display (cDNA) von *Chenopodium rubrum*-Zellen in der stationären Phase nach zweistündiger Behandlung mit Zeatinribosid. Detektion mit Primer-Kombinationen dT11 Vg als Oligo dT Primer und AAYGATTWTGG als *Arbitrary*-Primer. K- Kontrolle; Z- Zeatinribosid (Peters und Zenkel 1999).

Im Folgenden wird die Isolierung und Identifizierung der nur durch IES induzierten Gene beschrieben, denen die 3 cDNA-Fragmente entstammen. Die Fragmente 2 und 3 wurden bereits von Peters in früheren Untersuchungen gefunden.

1. **Fragment 1 (A1.1)** wurde nach Behandlung mit IES erhalten; es wird nicht durch 2,4-D induziert.
2. **Fragment 2 (18R10)** (Peters und Zenkel 1999) wurde nach Behandlung der Zellen mit Cytokininen isoliert. Es wird durch das Zeatinribosid reprimiert (Abb. 15).
3. **Fragment 3 (Alt6m4)** Das Gen von Fragment 3 wird durch IES induziert. Bei einem Vergleich 10 und 35 Tage alter Zellen zeigte sich, daß das Fragment 3 nur in den Zellen der stationären Phase auftrat.

Für das Auffinden der entsprechenden Volllängklone wurden zwei cDNA-Banken von *Chenopodium rubrum* gescreent. Für jedes Fragment wurden ca.  $1 \times 10^6$  Klone untersucht.

Nach wiederholter Hybridisierung erhaltene potentielle Volllängklone wurden zunächst als Sonden für die Analyse von Northern Blots eingesetzt, um zu prüfen, ob sich das im Differential Display gefundene Induktionsmuster bestätigen ließ.

Für die Northern Blots wurde die 35 Tage alte Zellkultur 2 Stunden lang, wie in Tabelle 4 zusammengestellt, behandelt.

Tabelle 4: Behandlung einer 35 Tage alten Zellkultur zur Analyse der Phytohormon-abhängigen Genexpression

Behandlung	Zusatz	Endkonzentration
Kontrolle	300 µl Wasser	-
IES	300 µl IES	0.1 µM
ZR	300 µl ZR	1.0 µM
2,4-D	300 µl 2,4-D	0.1 µM
ZR + IES	300 µl ZR 300µl IES	1.0 µM 0.1 µM

Zur Quantifizierung der Genexpression mit Hilfe der Northern Blot-Technik benötigt man aussagekräftige Kontrollproben. Ein Kontrollansatz ist z.B. der Vergleich mit der RNA-Menge von Genen, deren Expression stark und weitgehend konstant ist, wie z.B. RubisCO, Actin oder das ribosomale S2-Protein-Gen (rps2, Hoffman et al. 1998). Jedoch reicht dies nicht immer aus, wenn z. B. verschiedene Gewebe verglichen oder wenn, wie im Fall von

*rps2*, dieses selbst ein durch Auxin induzierbares Gen ist. Eine andere, von solchen Faktoren unabhängige Methode ist der Bezug auf die Gesamtmenge an (m)RNA, oder, wenn dies aus anderen Gründen problematisch ist, auf die Gesamtmenge an Zellen. Beim Vergleich von Zellen unterschiedlichen Alters (Siebert et al. 1999), besteht das Problem darin, zu entscheiden, auf welche Kontrolle bezogen werden soll. Da es kein Gen gibt, welches während der gesamten Lebensdauer der Zellen konstant exprimiert wird, treten bei der Quantifizierung der Transkripte Probleme beim Vergleich der Genexpression verschiedener Altersstadien mittels Northern Blot-Technik auf, da diese unterschiedliche Mengen an mRNA enthalten. In dieser Arbeit wurde die Zahl lebender Zellen als Bezugsbasis für die Genexpression gewählt.

Zunächst wurde die Altersabhängigkeit des Gesamt-RNA-Gehaltes der lebenden Zellen von *Chenopodium rubrum* untersucht (Abb. 16). Erwartungsgemäß zeigte sich eine dramatische Abnahme des RNA-Gehaltes der Zellen während der 90-tägigen Kultur. Der RNA-Gehalt 5 Tage alter Zellen betrug ungefähr das 6-fache von dem 50 Tage alter Zellen. In 80 Tage alten Zellen konnte kaum mehr RNA nachgewiesen werden. Für die Analyse der Genexpression war darüber hinaus der Anteil der spezifischen mRNA an der Gesamt-RNA wichtig.

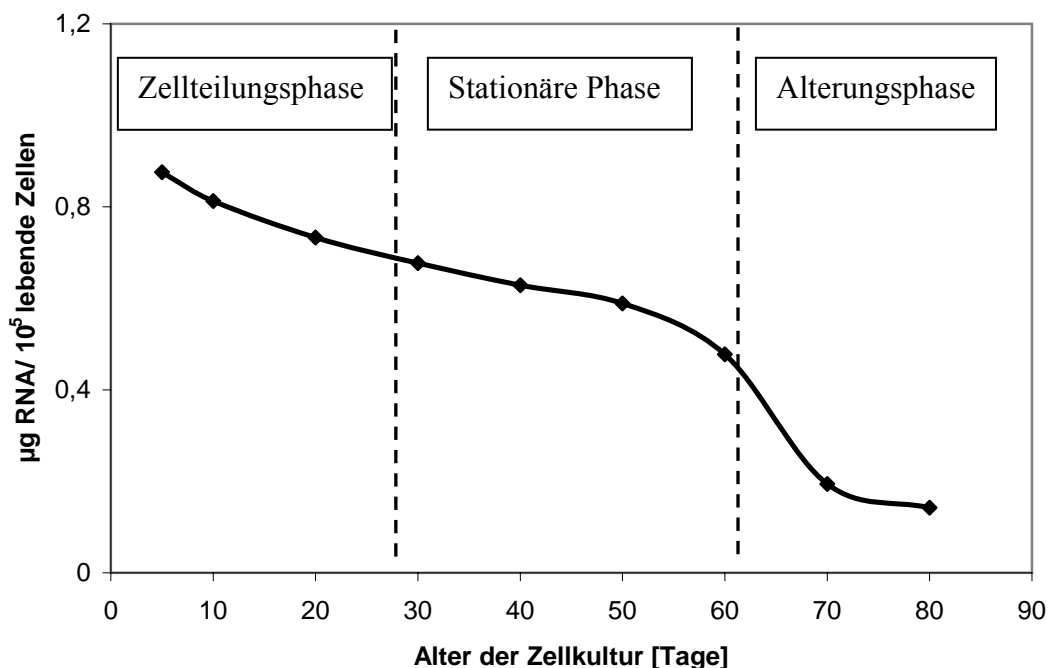


Abb. 16: Gesamt-RNA-Gehalt der Zellen im Verlauf der Zellkultur von *Chenopodium rubrum*



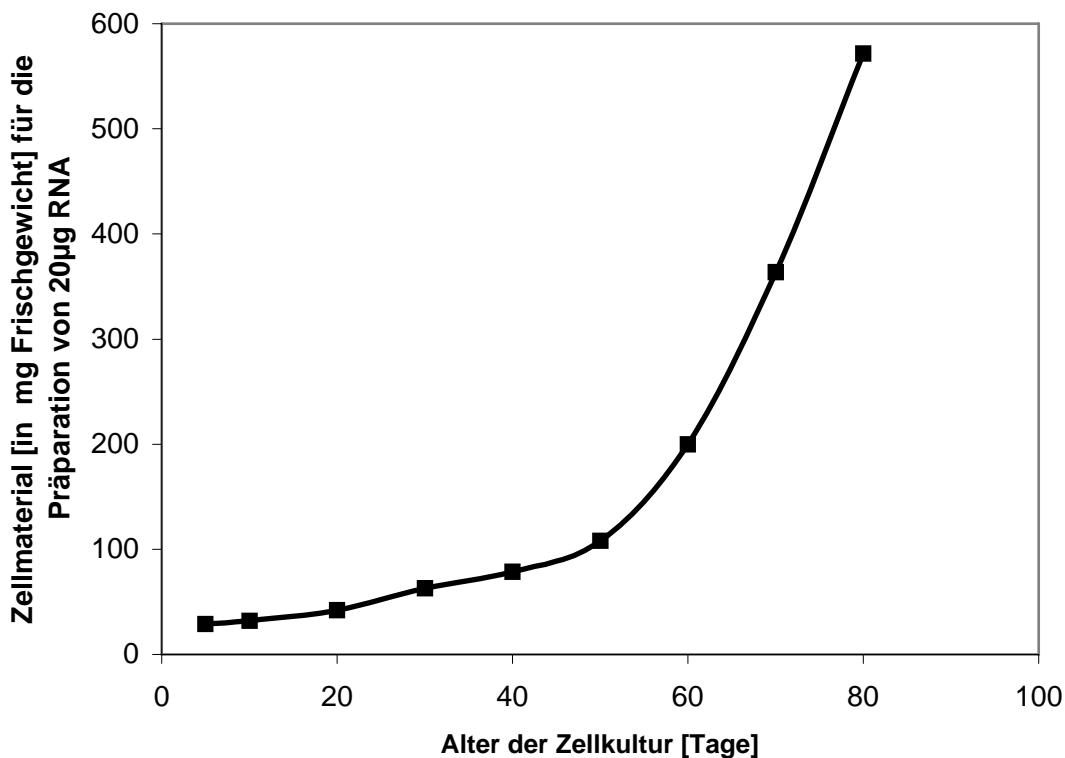


Abb. 17: Benötigte Zellmasse unterschiedlich alter Zellen von *Chenopodium rubrum* für den Erhalt von 20 µg RNA

In Abb. 17 ist entsprechend die Menge an Zellen dargestellt, die notwendig ist, um in den unterschiedlich alten Proben 20 µg RNA für die Gelelektrophorese zu erhalten. Im Alter von 80 Tagen braucht man dafür rund 13 mal mehr Material als von 10 Tage alten Zellen. Würde man jeweils gleiche Mengen an RNA auf das Gel auftragen, so würde die Genexpression junger und alter Zellen nicht vergleichbar sein.

In Abb. 18 wird die relative Expression der CDKB, dargestellt in der üblichen Form, d.h. bezogen auf 20 µg RNA-Menge je Bande, der Expression bei Normierung auf die Menge an Zellen (jeweils 47 mg Zellen) gegenübergestellt.

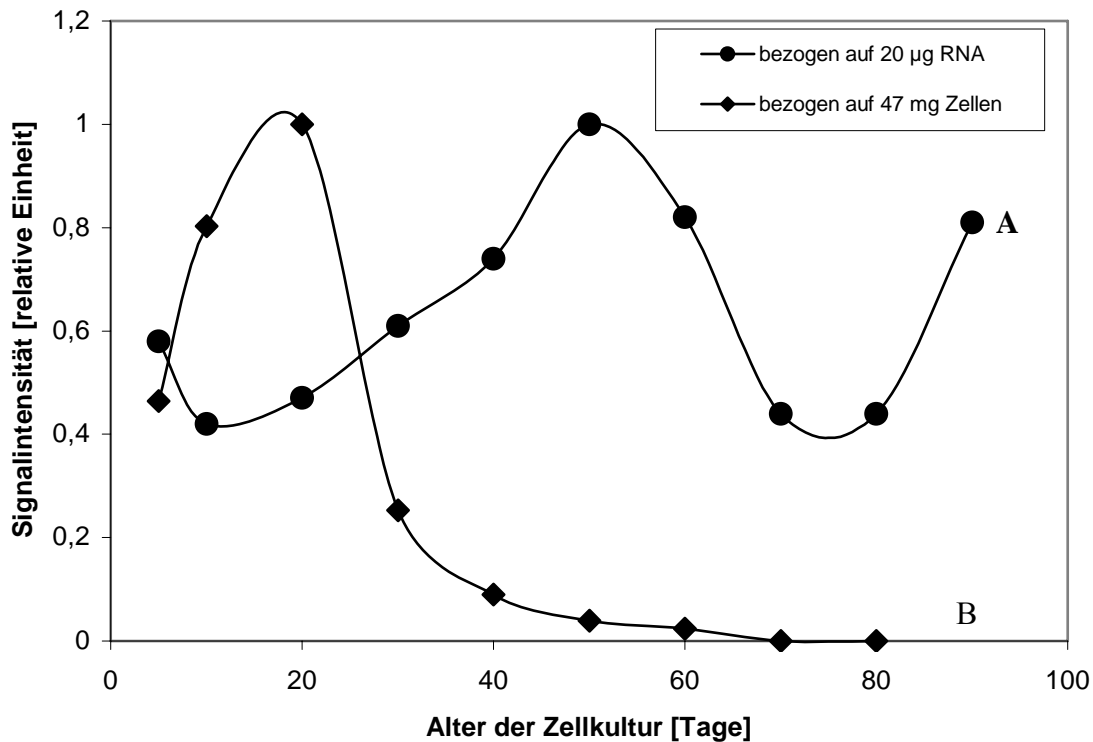


Abb. 18: Expression eines Transkripts (CDKB) aus *Chenopodium rubrum* im Northern Blot, normiert auf 20 µg RNA (A) bzw. auf 47 mg Zell-Frischgewicht (B)

Normiert man auf 20µg RNA, so würde die Expression des CDKB ab dem 30. Tag ansteigen und ihr Maximum bei 50 Tagen erreichen. Im Alter von 90 Tagen wäre die relative Expression wieder höher als in der Wachstumsphase. Wenn man auf die extrahierte Zellmasse normiert, beobachtet man einen Anstieg der Expression bis zum 20. Tag (Abb. 18B), einen steilen Abfall zum Beginn der stationäre Phase und schließlich ein fast völliges Verschwinden in der Alterungsphase. Es ist offensichtlich, daß nur der Bezug auf die Zellmasse physiologisch sinnvoll ist.

### 3.4 Isolierung, Amplifizierung und Klonierung des Fragmentes A1.1

Das Fragment A1.1 des differentiell exprimierten Gens wurde durch Elution der radioaktiv markierten Bande und anschließende PCR gewonnen (Abb. 19). Da die Trennung der Fragmente im Polyacrylamid-Harnstoff-Gel möglicherweise unvollständig ist, dh. in der Bande auch andere DNA-Fragmente enthalten sein könnten, die mit den Primern reagieren, war es notwendig, das PCR-Produkt durch eine weitere PAGE zu reinigen (Abb. 20).

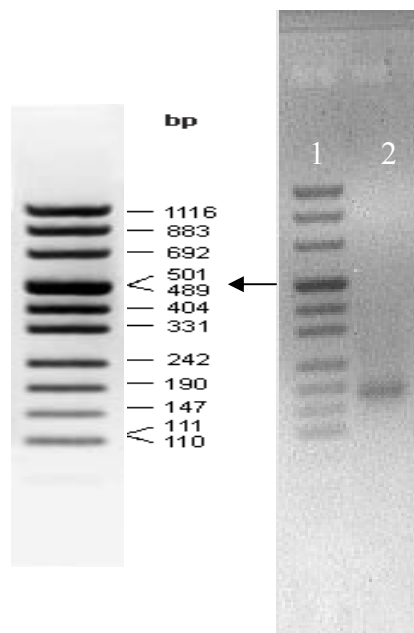


Abb. 19: Gelelektrophorese der durch PCR aus den isolierten Banden des Differential Display gewonnenen Produkte. In Bande 1:- pUC Marker 8; Bande 2:- PCR-Produkt von Fragment A1.1. Detektiert wurde mit IES

Abb. 20 zeigt, dass die radioaktiv markierte Bande tatsächlich weitere Fragmente enthielt, die mit den verwendeten Primern amplifiziert worden waren. Unter der DD-Bande, die das radioaktive Signal enthielt, waren also noch weitere Genprodukte vorhanden, die nicht radioaktiv markiert waren, aber in der PCR bevorzugt amplifiziert worden waren.

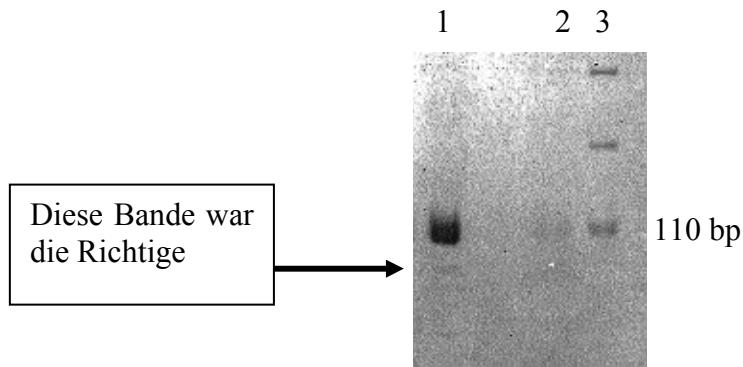


Abb. 20: Polyacrylamid-Gel vom PCR Produkt von DD. Bande 1: IES Behandlung ( $0,1\mu\text{M}$ ), Bande 2: Kontrolle ( $\text{H}_2\text{O}$ ), Bande 3: DNA Marker pUC 8

Ein weiterer Grund für die Trennung war, dass in der Hybridisierung in den Northern Blots mit der Gesamt-RNA zunächst keine Induktion durch Auxin nachweisbar war oder sich noch andere Banden ergaben (Abb. 21). Die spätere Sequenzierung zeigte, dass es sich um ein Gencluster (aus dem Plastom) handelt, wodurch das Vorhandensein mehrerer unspezifischer Banden verständlich wird. Hudson et al. (1987) fanden in Spinat ein Gencluster, das 5 verschiedene Proteine codiert.

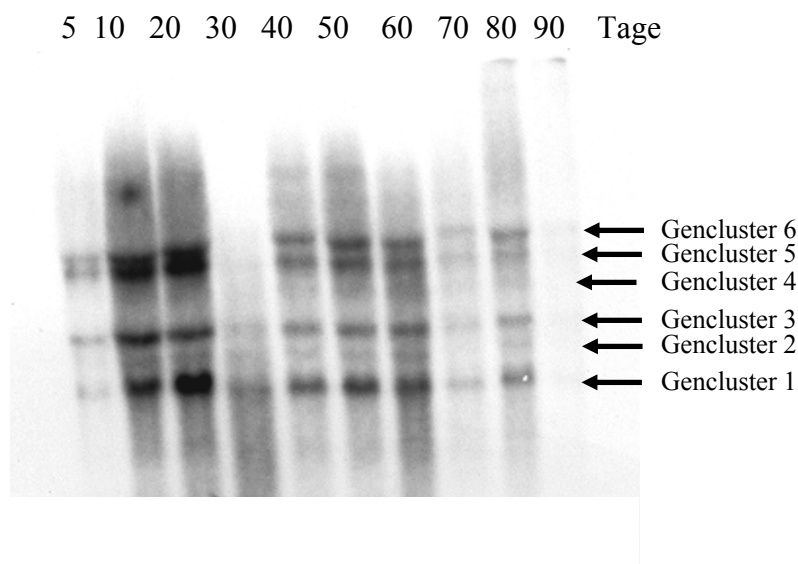


Abb. 21: Hybridisierungssignal des Fragments A1.1 im Northern Blot mit Gesamt-RNA, während der gesamten Wachstumsperiode (5-90 Tage)

Mittels der Hybridisierungsexperimente und durch Sequenz-Vergleich konnte gezeigt werden, dass die vom Fragments A1.1 hergestellte Sonde ein Gencluster abdeckt.

Nach der PAGE (Abb. 20) konnte man sicher sein, dass die Gen-Fragmente aus einer Bande der ersten Elektrophorese stammten. Klone, welche ein spezifisches, jedoch nicht durch Auxin induziertes Hybridisierungssignal enthielten, wurden verworfen. Es blieb nur noch der Klon, dessen Hybridisierungssignal unspezifisch war. Um sicher zu stellen, dass es sich um das durch das Hormon induzierte Gen handelte, wurde eine Northernhybridisierung mit mRNA (Abb. 22) durchgeführt. Damit konnte das spezifische Fragment nachgewiesen werden, dessen Gen durch IES induziert worden war; außerdem zeigte sich noch eine weitere, schwächere Bande. Die Abb. 22 zeigt die Entsprechung der Banden aus der PAGE und dem DD. Als Auftragskontrolle wurde die SSU der RubisCO verwendet. Sie zeigt eine einigermaßen gleichmäßige Auftragung.

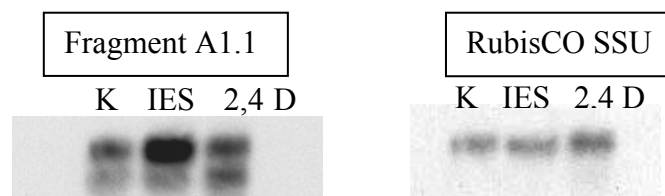


Abb. 22: Northern Blot-Analyse der mRNA von 35 Tage alten *Chenopodium rubrum* Suspensionskulturzellen mit der Sonde von Fragment A1.1 und RubisCO SSU. K-Kontrolle (H<sub>2</sub>O), IES Behandlung (0,1 μM), 2,4-D Behandlung (0,1 μM)

Nachdem der durch IES induzierbare Klon gefunden war, wurde die Sequenzierung des Fragments A1.1 durch die Firma MWG (Ebersberg) durchgeführt (Abb. 23).

#### Primer A1

**CAGGCCCTTC**GAGAATGTATTACTTTGGGAATTC**CAACGATTTGTTTAATCGATACAAAT**  
 TGTGACCCGGATCCTGCAGATATTT**CGATTCCC****GCAAAAAAAAAAAAA**  
 dT<sub>11</sub>VC

Abb. 23: Nukleotidsequenz vom Differential Display-Fragment A1.1 (die für DD benutzten Primer sind fett gedruckt) der *Chenopodium rubrum*-Zellkultur

Die Sequenz zeigt, dass es sich um den nichttranslatierten Bereich am 3'Ende des Gens handelte, wie es für das DD typisch ist, denn der Anker-Primer bindet an das Poly-A-Ende der mRNA.

Die Sequenz des Fragments A1.1 warf das Problem auf, dass eine derartige Sequenz in *Chenopodium rubrum*-cDNA-Banken, die aus 7 bzw. 35 Tage alten Zellkulturen gewonnen worden waren, nicht aufzufinden war. Deshalb wurde eine neue cDNA-Bank mit mRNA aus

Zellkulturen, die 2 Stunden mit IES behandelt wurden, hergestellt, für das ursprüngliche Stratagene-Protokoll modifiziert wurde (siehe Kapitel: Material und Methoden Seite 31). Die neue cDNA-Bank mit ca. 2 Millionen Klonen enthielt auch den gesuchten Vollängenklon des Fragments A1.1.

Die *in vivo-Excision* von 5 verschiedenen hybridisierten Plaques ergab bei allen das gleiche Schnittmuster mit EcoRI und XhoI. Dann wurde das neu isolierte Gen überprüft. Mit Hilfe des QIAprep<sup>®</sup> Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilde) wurde der Klon A1.1 amplifiziert. Es wurden verschiedene Restriktionsverdau mit anderen Enzymen durchgeführt. Aufgrund einer internen Schnittstelle von EcoRI im Insert ergab der für die cDNA-Bank klassische Verdau (EcoRI und XhoI) 2 Banden. Als die komplette Sequenz bekannt war, konnte diese Schnittstelle bestätigt werden. In Abb. 24 ist ein Restriktionsverdau mit verschiedenen Enzymen dargestellt, der ein Insert von ca. 2700bp enthält.

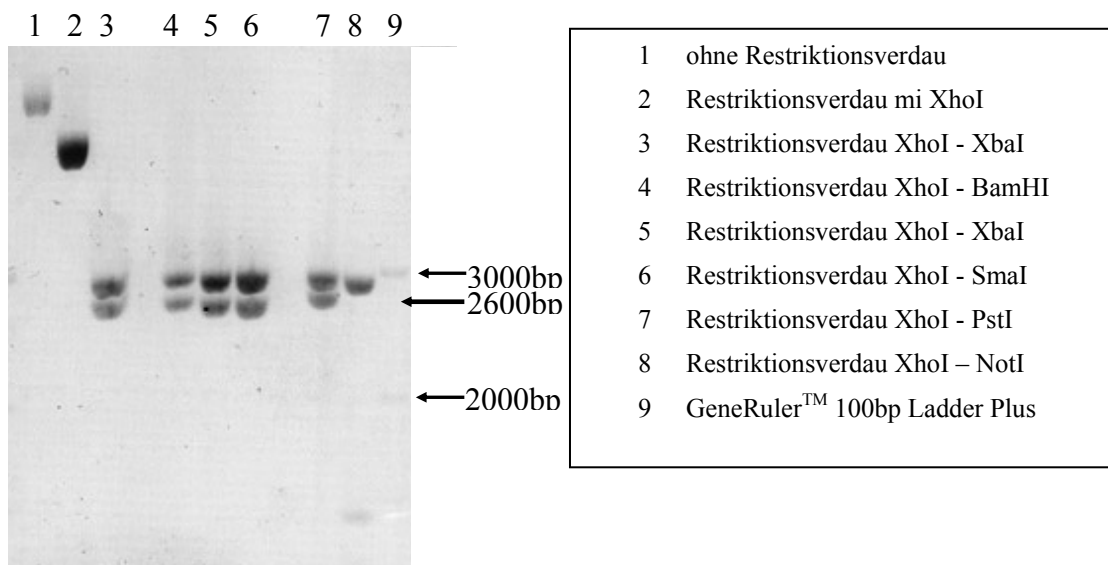


Abb. 24: Gelelektrophorese des Restriktionsverdaus des isolierten Gens A1.1 mit verschiedenen Restriktionsenzymen

Mit dem Insert des Vollängenklons wurde eine Northern-Hybridisierung durchgeführt, wobei sich bestätigte, dass dieser Klon das gleiche Expressionsmuster aufwies, wie das Ausgangsfragment (Abb. 25). In den mit IES behandelten Zellen wurde eine deutlich stärkere Gen-Expression festgestellt als in den mit 2,4-D behandelten.



Abb. 25: Hybridisierungssignal in mRNA-Northern Blot mit dem Vollängenklon (A1.1) vom Genfragment A1.1 als Sonde. K-Kontrolle, IES-Behandlung (0,1 $\mu$ M zwei Stunden), 2,4-D-Behandlung (0,1  $\mu$ M zwei Stunden). Als Kontrolle ist der Northern Blot mit der RubisCO SSU als Sonde dargestellt

Die Nukleotid- und die abgeleitete Aminosäuresequenz des cDNA-Inserts A1.1 sind in Abb. 26 dargestellt. Das cDNA-Insert ist 2711 bp lang, mit zwei offenen Leserastern (503-1213 für RPS2 und 1411-2154 für ATPase) und codiert zwei Proteine von 236 und 247 Aminosäuren. Die Molekularmasse, abgeleitet von der Aminosäuresequenz, beträgt 26 kDa und 27 kDa.

```

1  TTTTAGCAAAAGCGGCTCTCCGGGGCCGTATCGATTGGTTGCAAGGATTAAGAAAACG
61  TTGTTCTGGGGGGGATGATACCCGTTGGTACTGGATTCAAAGGATTCGTACATCATTCAA
121  GTCAACATAAGGACATTCCCTTGAAAACAAAAAAGAATCTATTCGAGAGAGAAATGG
181  GAGATATTTTGTTTTACCACAGAGAATTAATTGATTCTTGTCTTTCAAAGAATTTCTGTG
241  ATAGCTCAAACAACAATCATTTTTGGGGTTAATAGAATAAATTCATCTTTTTTATCTTT
301  TATGTATTTGTTAGGGTTATTTAATTTAGTAATAAAATAAAGAAATTAAGAAAAAGTAA
361  CGAATAGAACGGAATTAATGATTTGGGTTGCATATTAATGGCCAATCCGCGGTAGAAAAG
421  AAGGTTCCGTTGGAACAATTTTTTTATTTTCAGAATACTTCATCTCTTTAATGAAAAAAA
481  AAAAGAGAAAGCGTGGGGAGAAATGACAAGAAGATATTGGAACATCAATTTGGAAGAGAT
      M T R R Y W N I N L E E M
541  GATGGAAGCGGGAGTTCATTTTGGTCACGGTACTAGGAAATGGAATCCTAGAATGTCGCC
      M E A G V H F G H G T R K W N P R M S P
601  TTATATCTCTGCAAAATGTAAAGGTATTCATATTATAAATCTTACTAGAACTGCTCGTTT
      Y I S A K C K G I H I I N L T R T A R F
661  TTTATCGGAGGCTTGCGATTTAGTTTTTGACGCATCAAGTAGAGGAAAACAATTTTAAT
      L S E A C D L V F D A S S R G K Q F L I
721  TGTTGGGACAAAAATAAAGCAGCTGATTCAGTAGCACGGGCTGCAATAAGGGCTCGCTG
      V G T K N K A A D S V A R A A I R A R C
781  TCATTATGTTAATAAAAAAGTGGCTTGGGGGTATGTTAACGAATTGGTCCACGACAGAAAC
      H Y V N K K W L G G M L T N W S T T E T
841  GAGACTTTATAAATACAGGGACTTGAGAATGGAACAAACGGCAGGGAGACTCGCTCGTCT

```

R L Y K Y R D L R M E Q T A G R L A R L  
901 CCCAAAGAGAGATGCAGCGGTGGTGAAGAGACAGTTATCTCACTTGCAAACATATCTGGG  
P K R D A A V V K R Q L S H L Q T Y L G  
961 TGGGATCAAATATATGACAGGGTTACCAGATATTGTAATCATCGTTGATCAACACGAAGA  
G I K Y M T G L P D I V I I V D Q H E E  
1021 ATATACGGCCCTTCGAGAATGTATTACTTTGGGAATTCCAACGATTTGTTTAATCGATAC  
Y T A L R E C I T L G I P T I C L I D T  
1081 **AAATTGTGACCCGGATCTTGCAGATATTTCGATTCCCGCAAACGATGACGCTATAGCTTC**  
N C D P D L A D I S I P A N D D A I A S  
1141 AATTTCGATTAATTCTTACCAAATTAGTATTTGCAATTTGTGAAGGCCGCTCTAGCTATAC  
I R L I L T K L V F A I C E G R S S Y T  
1201 AAGAAATCCCTGATTACATAATAAAATCAAAAATTGACTTCCTAAACTCTATATTGTTTAC  
R N P \*  
  
1261 TAGATTTTGAATCTCAAAAAGTAGTTAAAAATAACAAGGGATATTATGTAATTAATTGGT  
1321 ATTCAAAATAGAAAAATAAATTTAAAGTAGACAAAAGAGCTCGTTGAATCAAATCATTTT  
  
1381 TTTTAAGTTATATTTATGTCAGAGGACAATATGAATGTTCTATCATATTCAATCAACCCG  
M N V L S Y S I N P  
1441 CTAAAGGGATTATATGATATATCTGGTGTGGAAGTAGGTCAACATTTCTATTGGCAAATA  
L K G L Y D I S G V E V G Q H F Y W Q I  
1501 GGAGGTTTCCAAATCCATGGACAGGTACTTATAACTTCTTGGGTTGTAATTGCTATCTTA  
G G F Q I H G Q V L I T S W V V I A I L  
1561 TTAGGTTTCAGCTGCTATAGCTGTTCCGAGTCCACAAACGATTCCAACCTGGGGGTCAAAT  
L G S A A I A V R S P Q T I P T G G Q N  
1621 TTTTTTGAATATGTCCTTGAATTCATCCGAGACGTGAGCAAACCCAAATTGGAGAAGAA  
F F E Y V L E F I R D V S K T Q I G E E  
1681 TACCGCCCTTGGGTTCCCTTTATTGGGACTATGTTTCTATTTATTTTGTTCCTAATTGG  
Y R P W V P F I G T M F L F I F V S N W  
1741 TCAGGGGCTCTTTTGCCTTGGAAAATCATAAGTTACCTCACGGGGAGTTAGCCGCACCC  
S G A L L P W K I I Q L P H G E L A A P  
1801 ACGAATGATATAAATACTACTGTTGCTTTAGCTTTACTCACGTCCGTAGCCTATTTCTAT  
T N D I N T T V A L A L L T S V A Y F Y  
1961 GCGGGTCTTACAAAAAAGGATTAGGTTATTTTGGTAAATACATTCAACCAACTCCAATT  
A G L T K K G L G Y F G K Y I Q P T P I  
1921 CTTTTACCCATTAACATCTTAGAAGATTTACAAAACCTCTATCACTTAGTTTTCGACTT  
L L P I N I L E D F T K P L S L S F R L



```

1981  TTCGGAAATATATTAGCCGATGAATTAGTAGTTGTTGTTCTTGTTCCTTTAGTACCTTTA
      F  G  N  I  L  A  D  E  L  V  V  V  V  L  V  S  L  V  P  L
2041  GTGGTTCCTATACCTGTCATGTTTCTTGGATTATTTACAAGTGGTATTCAGGCTCTTATT
      V  V  P  I  P  V  M  F  L  G  L  F  T  S  G  I  Q  A  L  I
2101  TTTGCAACTTTAGCCGCAGCTTATATAGGCGAATCCCTGGAAGGTCATCATTAAATTCGTC
      F  A  T  L  A  A  A  Y  I  G  E  S  L  E  G  H  H  *

2161  TTAGTAAGAGTCTATCTCTTAGTTTATAGATCTAGGTAATATATGTGTATGTGTGGCTCAAG
2221  ATACTCTATCAAGATCTTTTATCAAGACAATCGATTTTATAGTTTATTTAGAGCATAGAAAT
2281  AGACAAATACATACAGTCTAGCGGTAATAGAAAAACGATATTCGAAAAGTGTAATAA
2341  AAAGACGTTGGTTAGTCGAGAGGGAGTGCCTCAAGTATATGGAATCTAATTACTATTTAC
2401  TATAAGATAATTCTTCCAGATTAGATGTTTCGAAGAATGATTCAAAAATCCGATTGACTT
2461  AAAAATAAAAAGGCGGTTTACGTTATGTAAGAAACCCATGTATATTTTATATTAGATATT
2521  GCCAAGTTAGATATGAACTAATATTTAATTTGCCCTACTTGAATTCGATAGAGATACCA
2581  ACCGACGAAGTCCTTCAGTTTGGTTTATGACTGCGAATTGAATGAATAACCAGACAAAAT
2641  AAAGAAAAAGATGAAGTCTTTCTAATGATCTAATGATTTAATAATATTATTATTCAATT
2701  TTCAATTCGGC

```

Abb. 26: Nukleotid-Sequenz (1-2711) und abgeleitete Aminosäure-Sequenz des Klons A1.1 aus *Chenopodium rubrum*-Zellkulturen (die Sequenz des DD-Fragmentes wurde fett gedruckt) (*Accession Number* AY299195). 1-503 – nicht translatierter Bereich, 504-1213 offenes Leseraster für Protein RPS2, 1214-1410 nicht translatierter Bereich, und 1411-2154 offenes Leseraster für das Protein ATPase subunit IV, 2155-2711 nicht translatierter Bereich, welcher ein auxin response element besitzt (die Sequenz des cis-Elements wurde unterstrichen)

### 3.4.1 Identifizierung des Gens A1.1 durch Vergleich mit Sequenzen der Gen-Bank

Das Ergebnis der Sequenz war überraschend, denn es wurde eine kerncodierte mRNA mit Poly-A-Ende erwartet. Durch den Sequenzvergleich des Vollängen-Klons aus *Chenopodium rubrum* mit Daten der Genbank wurde auf DNA-Ebene eine Identität von 85, 93 und 95% mit einem Abschnitt plastomischen Sequenz von *Spinacia oleracea* (*Accession Number* AJ400848) Hudson et al. 1987) festgestellt.

Tabelle 5: Vergleich des Klons A1.1 mit der Gensequenz des Chloroplasten von *Spinacia oleracea* (AJ400848)

Teilsequenz <i>Spinacia oleracea</i>	Sequenz von <i>Chenopodium rubrum</i>	Übereinstimmungen	Protein
15592-15114	1-470	85%	-
	471-484	-	-
15099-14230	485-1354	95%	rps2
	1355-1384	-	-
14192-13351	1385-2235	93%	ATPase-Untereinheit
	2234-2262	-	-
13346-12965	2263-2650	87%	-
	2651-2711	-	-

In der Tabelle 5 ist die Sequenz von *Chenopodium rubrum* Teilsequenzen von *Spinacia oleracea* der Datenbank (*National Center for Biotechnology* - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) gegenübergestellt. Aus der großen Homologie mit anderen bekannten Sequenzen kann man schließen, dass es sich um einen konservierten Bereich handelt. Es gibt viele andere Sequenzen, die diese Homologie mit den in dieser Arbeit untersuchten aufweisen.

In Abb. 27 sind chloroplastische Sequenzen verschiedener Pflanzenarten mit der größten Ähnlichkeit zu AAP55715 aus *Chenopodium rubrum* gezeigt, bei denen eine sich auf fast die gesamte Sequenz erstreckende sehr stabile Domäne erkennbar wird. Ähnliche Resultate wurden mit dem zweiten in A1.1 enthaltenen Gen bzw Protein ATPase erzielt.

	1				50
np_114252	MTRRYWNINL	KEMIEAGVHF	GHGIKKWNPK	MAPYISAKRK	GTHIINLART
np_043018	MTRRYWNINL	KEMIEAGVHF	GHGIKKWNPK	MAPYISAKRK	GTHITNLART
app54727	MTRRYWNINL	KEMIEAGVHF	GHGIKKWNPK	MAPYISAKRK	GTHITNLART
np_084799	MTKRYWNITF	EEMMEAGVHF	GHGTRKWNPK	MAPYISMKRK	GIHIINLTRT
rr2_pea	MTKRYWNITF	EEMMEAGVHF	GHGTRKWNPK	MAPFISAKRK	GIHITNLTKT
np_054921	MTRRYWNINL	EEMMEAGVHF	GHGTRKWNPK	MSPYISAKCK	GIHIINLTRT
<b>AAP55715</b>	MTRRYWNINL	EEMMEAGVHF	GHGTRKWNPK	MSPYISAKCK	GIHIINLTRT
bab72234	MTIRYWNINL	EEMLEAGVHF	GHGTRKWNPK	MAPYISAKRK	GIHIINLTRT
bab72235	MTIRYWNIDL	EEMLEAGVHF	GHGTRKWNPK	MAPYISAKRK	GIHITNLTRT
bab72238	MTIRYWNINL	EEMLEAGVHF	GHGIRKWNPK	IAPYISAKRK	GIHITNLTRT
np_054485	MTRRYWNINL	EEMMEAGVHF	GHGTRKWNPK	MAPYISAKRK	GIHITNLTRT
np_051048	MTKRYWNIDL	EEMRAGVHF	GHGTRKWNPK	MAPYISAKRK	GIHIINLTRT
np_084689	MTRRYWNINL	EEMMEAGVYF	GHGIKKWNPK	MAPYIYANRK	GIHITNLTKT
np_054377	MTRRYWNIDL	EEMIGAGVSF	GHGTRKWNPK	MAPYISVKEK	GIHITNLTKT
np_039278	MKQKSWNIHL	EEMMEAGVHF	GHQARKWNPK	MAPYIFTERK	GIHIINLTKT

	51				100
np_114252	ARFLSEACDL	VFDAASQGKS	FLIVGTTKRA	TDLVASAAIR	ARCHYVNKKW
np_043018	ARFLSEACDL	VFDAASQGKS	FLIVGTTKRA	ADLVASAAIR	SRCHYVNKKW
app54727	TRFLSEACDL	VFDAASQGKS	FLIVGTTKRA	ADLVASAAIR	ARCHYVNKKW
np_084799	ARFLSEACDL	VFDAASRGKR	FLIVGTTKKA	ADLVARAAIR	ARCHYVNKKW
rr2_pea	ARFLSEACDL	AFDAASKGKQ	FLIVGTTKKA	ADSVTRAAIR	ARCHYVNKKW
np_054921	ARFLSEACDL	VFDASSRGKQ	FLIVGTTKNA	ADSVARAAIR	ARCHYVNKKW
<b>AAP55715</b>	ARFLSEACDL	VFDASSRGKQ	FLIVGTTKNA	ADSVARAAIR	ARCHYVNKKW
bab72234	ARFLSEACDL	VFDAASRGKQ	FLIVGTTKNA	ADSVAWAAIK	ARCHYVNKKW
bab72235	ARFLSEACNL	VFDAASRGKQ	FLIVGTTKNA	ADSVAWAAIK	ARCHYVNKKW
bab72238	ARFLFEACNL	VFDAASRGKQ	FLIVGTTKNA	ADSVAWAAIK	ARCHYVNKKW
np_054485	ARFLSEACDL	VFDAASRGKQ	FLIVGTTKNA	ADSVWAAAIR	ARCHYVNKKW
np_051048	ARFLSEACDL	VFDAASRGKQ	FLIVGTTKNA	ADLVSRAAIR	ARCHYVNKKW
np_084689	ARFLAKACDL	VFDAASRGGQ	FLIVGTTKQA	AALVARAAIK	ARGHYVNKKW
np_054377	ARFLSEACDL	VFYAASRGKQ	FLIVDTKNKA	ADSAAWAAIK	ARCHCVNKKW
np_039278	ARFLSEACDL	VANASSKGKQ	FLIVGTTKYQA	ADLTIESSALK	ARCHYVNQKW

	101				150
np_114252	FSGMLTNWSI	TKTRLSQFRD	LRAEEKMGKF	HHLPKRDVAI	LKRKLSLTLQR
np_043018	FSGMLTNWSI	TKTRLSQFRD	LRAEEKMGKF	HHLPKRDAAI	LKRKLSLTLQR
app54727	FSGMLTNWSI	TKTRLSQFRD	LRAEEKMEKF	HHLPKRDVAI	LKRKLSLTLQR
np_084799	LGGMLTNWYT	TETRLRKFRE	LRTEQKTGKL	NCLPKRDAAI	LKRQLSHLET
rr2_pea	LRGMLTNWYT	TETRLGKFRD	LRTEQKTGKL	NSLPKRDAAM	LKRQLSHFET
np_054921	LGGMLTNWST	TETRLHKFRD	LRMEQTAGRL	ARLPKRDAAV	VKRQLSHLQT
<b>AAP55715</b>	LGGMLTNWST	TETRLYKYRD	LRMEQTAGRL	ARLPKRDAAV	VKRQLSHLQT
bab72234	LGGMLTNWST	TEMRLHKFRD	LRMEQKMGRE	NRLPKRDAAV	VKRQLSRLQT
bab72235	LGGMLTNWST	TEMRLHKFRD	LRMEQKMGRE	NRLPKRDAAV	VKRQLSRLQT
bab72238	LGGMLTNWST	TETRLHRFRD	LRMEQKMGRL	NRLPRRDSAV	VKRQLYRLQT
np_054485	LGGMLTNWST	TETRLHKFRD	LRMEQKTGRL	NRLPKRDAAM	LKRQLSRLQT
np_051048	LGGMLTNWST	TEKRLHKFRD	LRTEQKTEGF	NRLPKRDAAV	LKRQLSRLET
np_084689	LGGMLTNWST	TETRLHQFRD	LRTEQKTGRL	NRLPKRDAAI	LKRQLSHLQT
np_054377	PGGMLTNWST	TETRLHKLRL	LIMEQKAGRL	NRLKKKDEAA	VKRQLARLQT
np_039278	LGGMLTNWST	IETRLQKFKD	LENKKKTGTI	NRLPKKEAAN	LKRQLDHLQK

	151				200
np_114252	YLGGIKYMTR	LPDIVIIVDQ	QKEYIALREC	AILGIPTISL	VDTNCDPDLA
np_043018	YLGGIKYMTR	LPDIVIIVDQ	QKEYIALQEC	AILGIPTISL	VDTNCDPDLA
app54727	YLGGIKYMTR	LPDIVIIVDQ	QKEYIALREC	AILGIPTISL	ADTNCDPDLA
np_084799	YLGGIKYMTR	LPDIVIIVDQ	QEEYALREC	ITLGIPTICL	IDTNCDPDLA
rr2_pea	YLGGIKYMTR	LPDIVIIVDQ	QKEYALQEC	ITLGIPTICL	IDTNCDPDLA
np_054921	YLGGIKYMTR	LPDIVIIVDQ	QEEYALREC	ITLGIPTICL	IDTNCNPDLA
<b>AAP55715</b>	YLGGIKYMTR	LPDIVIIVDQ	HEEYALREC	ITLGIPTICL	IDTNCNPDLA
bab72234	YLGGIKYMTR	LPDIVIIVDQ	HEEYALREC	ITLGIPTICL	IDTNCNPDLA
bab72235	YLGGIKYMTR	LPDIVIIVDQ	HEEYALREC	ITLGIPTICL	IDTNCNPDLA
bab72238	YLGGIKYMTR	LPDIVIIVDQ	HEEYALREC	ITLGIPTICL	IDTNCNPDLA
np_054485	YLGGIKYMTR	VPDIVIIVDQ	HEEYALREC	ITLGIPTICL	TDTNCDPDLA
np_051048	YLGGIKYMTR	LPDIVIIVDQ	QEEYALREC	ITLGIPTISL	IDTNCNPDLA
np_084689	YLGGIKYMTR	LPDILIIILDQ	HEEYALREC	ITLGIPTICL	IDTDCDPDLA
np_054377	YLGGIKYMTR	LPDIVIIVDQ	HEEYALHEC	ITLGIPTIGL	IDTNCNPDLA
np_039278	YLGGIKYMTR	LPDIVIIVDQ	QKEFTAIQEC	ITLGIPTICL	VDTDCDPDMT

	201				245
np_114252	NISIPANDDT	MTSIRLILNK	LVFSICEGRS	LYIRNR~~~~	~~~~~
np_043018	NISIPANDDT	MTSIRLILNK	LVFAISEGRS	LYIRNR~~~~	~~~~~
app54727	NISIPANDDT	MTSIRLILNK	LVFAICEGRS	LYIRNH~~~~	~~~~~
np_084799	DISIPANDDA	IASIRLILNK	LVFAICEGHS	SYIRNF~~~~	~~~~~
rr2_pea	DMSIPANDDA	IASIRLILNK	LVFAICEGRS	SSIRNY~~~~	~~~~~
np_054921	DISIPANDDA	IASIRLILTK	LVFAICEGR.	...SSYIRNP	~~~~~
<b>AAP55715</b>	DISIPANDDA	IASIRLILTK	LVFAICEGR.	...SSYTRNP	~~~~~
bab72234	DISIPANDDA	ISSIRLILNK	LVFAICEGRS	SYSSSYIRNP	GLIIR
bab72235	DISIPANDDA	ISSIRLILNK	LVFAICEGRS	SYSSSYIRNP	GLIIR
bab72238	DISIPANDDA	ISSIRLILNK	LVFAICEGRF	SYSSSYIKNP	~~~~~
np_054485	DISIPANDDA	ISSIRLILNK	LVFAICEGR.	...SSYIRNP	~~~~~
np_051048	DISIPANDDA	IASIRFILNK	LVFAICEGR.	...SSYIQNS	~~~~~
np_084689	DLPIPANDDA	MASIRLILNK	LVFAICEGR.	...SSSTRNP	~~~~~
np_054377	DISIPANDDA	ISSIRLILNK	LVFAICEGRS	GYIINKT~~~~	~~~~~
np_039278	DIPIPANDDA	RASIRWILNK	LTLAICEGRY	NSIKN~~~~~	~~~~~

Abb. 27: Vergleich (pileUp) der abgeleiteten Aminosäuresequenzen bekannter pflanzlicher ribosomaler Proteine des Typs S2. **Blau**: Identische Aminosäuren, **Rot**: mehr als 50% der Aminosäuren in einer Spalte besitzen starke Ähnlichkeit in ihrer funktionellen Gruppe, **Orange**: mehr als 50% der Aminosäuren einer Spalte besitzen schwache Ähnlichkeit in ihren funktionellen Gruppen. Accession Number der genutzten RPS2 Proteine und Pflanzenarten: np\_114252- *Triticum aestivum*, np\_043018- *Zea mays*, app54727- *Oryza sativa*, np\_084799- *Lotus japonicus*, rr2\_pea- *Pisum sativum*, np\_054921- *Spinacia oleracea*, **AAP55715**- *Chenopodium rubrum*, bab72234- *Cistanche deserticola*, bab72235- *Cistanche salsa*, bab72238- *Cistanche tubulosa*, np\_054485- *Nicotiana tabacum*, np\_051048- *Arabidopsis thaliana*, np\_084689- *Oenothera elata subsp. Hookeri*, np\_054377- *Epifagus virginiana*, np\_039278- *Marchantia polymorpha*

### 3.4.2 Durch Auxin induziertes Gencluster für rps2 und die ATPase SU IV

Beim Sequenzvergleich auf der Proteinebene wurde festgestellt, dass das Gen einen Komplex von 2 Proteinen codiert – das ribosomale Protein S2 und die Untereinheit IV der ATPase. Dieser Komplex stimmt mit einem Proteinkomplex von Spinat überein, welcher von Hudson et al. (1987) als Gencluster beschrieben wurde. Stahl et al. (1990, 1993) fanden im Mais ein entsprechendes Gencluster, mit den Proteinen rpoC2, rps2, atp1 und atpH. Aus Tabak isolierten Miyagi et al. (1998) die cDNA der Proteine rps2, atpI/H/F/A eines entsprechenden Gencluster. Das zeigt, dass in Pflanzen verschiedene Gencluster-Gene mit der Sequenz, die die oben genannten Proteine codieren, existieren.

Das von Hudson et al. (1988) charakterisierte ribosomale Protein S2 ist ein Protein der 30S-Untereinheit des chloroplastischen Ribosoms, das eine hoch konservierte Region enthält. Das trifft jedoch nicht nur auf das Chloroplastenribosom, sondern auch auf die mitochondrialen Ribosomen der tierischen Organismen zu. Abb. 27 zeigt die große Ähnlichkeit der *Chenopodium rubrum* - Sequenz (AAP55715) mit solchen aus verschiedenen anderen Pflanzen. Die ribosomalen Proteine S2 von *Chenopodium rubrum* und von *Spinacia oleracea* haben eine Identität von 98% und eine Homologie von 100%.

Für die Interpretation der Ergebnisse mit dem Fragment A1.1 sind folgende Befunde ausschlaggebend:

1. Ein Teil (Fragment A1.1) aus dem translatierten Bereich von der RPS2 wurde isoliert, das zum Cluster aus RPS2 und ATPase korrespondiert. Dieses Cluster kommt nur im Plastom vor und besitzt ein auxin response element (Ainley et al. 1988).
2. Die mRNA (der ATPase) wurde über die Wechselwirkung vom Oligo dT mit dem Poly-A-Schwanz isoliert. Da plastidische mRNA keinen Poly-A-Schwanz besitzt, muss die mRNA vom Kerngenom transkribiert worden sein.
3. Da die mRNA nach Induktion mit Auxin verstärkt gebildet wurde, muss das entsprechende (ATPase)-Gen ebenfalls über ein Auxinelement verfügen.
4. Im Kerngenom existiert kein Clusters aus RPS2 und ATPase, da (in *Arabidopsis thaliana*) das RPS2-Gen auf dem Chromosom 2 liegt, während die ATPase Bestandteil des Chromosom 3 ist.
5. Die Identifizierung des Gencluster erfolgte durch Sequenzierung des Volllängenkons, die Identifizierung der mRNA durch Hybridisierung mit einer spezifischen Sonde aus dem ATPase-Gen des Clusters.
6. Das Vorkommen sehr ähnlicher ATPase-Gene im Plastom und Genom ist von *Arabidopsis thaliana* bekannt, wo die Identität 96% beträgt.
7. Für die Annahme eines vergleichbaren Falles bei *Chenopodium rubrum* spricht auch, dass die (plastidische) ATPase 87% Identität mit dem chloroplastischen Gen von *Arabidopsis thaliana* hat.

8. Der Umstand, dass die genomische ATPase nicht im Differential Display gefunden wurde, obwohl sie durch Auxin induziert wird, ist darauf zurückzuführen, dass beim Screenen der cDNA-Bank eine Sonde für die Verbindungssequenz des Clusters, aber nicht unmittelbar für die ATPase verwendet worden war.

### 3.4.3 Induktion durch Auxin des ribosomalen Proteins S2 und der ATPase

#### Das ribosomale Protein S2

Das ribosomale Protein S2 befindet sich im oberen Teil der kleinen Untereinheit des 30S-Ribosoms (Abb. 28), Wimberly et al. 2000.

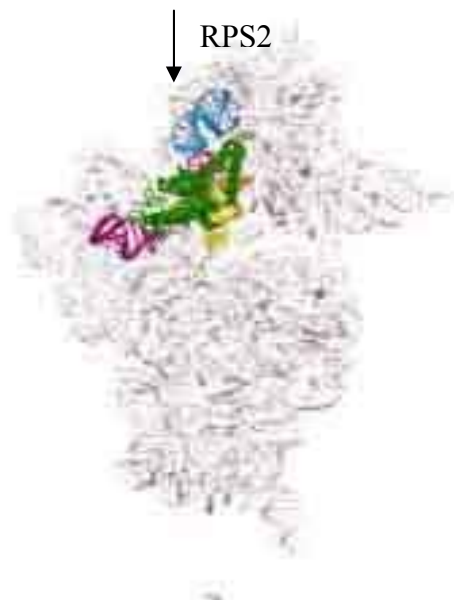


Abb. 28: Struktur des ribosomalen Proteins S2 und Lokalisation in der 30S Untereinheit (Wimberly et al. 2000)

Die genaue Funktion des Ribosomalproteins ist noch aufzuklären, es gibt jedoch bereits Hinweise auf eine mögliche Funktion bei der Translation der *leaderless* mRNA (Moll et al. 2002).

Der Nachweis der Induktion des ribosomalen Proteins S2 durch IES ist neu, wohl aber ist die hormon-abhängige Expression anderer ribosomaler Proteine bekannt. Die Synthese der ribosomalen Proteine L25 und L34 von Tabak (Gao et al. 1994) wird durch 2,4-D induziert, das ribosomale Protein L16 von *Arabidopsis thaliana* wird durch IES induziert (Williams und Sussex 1995). In der kleineren 40S Untereinheit ist es das ribosomale Protein S6, welches durch IES induziert wird (Beltran-Pena et al. 2002). Gantt und Key (1985) beschrieben für

Sojabohne, dass 9 ribosomale Proteine, 7 aus der großen (L6, L7, L13, L15, L17, L21 und L35), und 2 aus der kleinen Untereinheit (S16 und S32) durch 2,4-D induziert wurden.

Gleichzeitig berichten die Autoren jedoch ein Ansteigen der ribosomalen Protein-mRNA eine Stunde nachdem die Behandlung der Pflanze mit 2,4-D erfolgte. Aber das stellt noch keine direkten Auswirkungen des Auxins auf die Genexpression des ribosomalen Proteins her. Möglicherweise sind die erhöhten Niveaus der ribosomalen mRNA Teil einer biosynthetischen Reaktion, die nach der Zugabe von 2,4-D einsetzte, und die 15-20 Stunden nach der Behandlung zur Teilung und zum Zellwachstum führte. Das könnte man mit dem schon vorher dargestellten Einfluss der 2,4-D auf das endogene Auxin erklären.

### **ATPase**

Die ATPase-Untereinheit IV (E.C.Nr. 3.6.3.14) gehört zum membranintegralen CF<sub>o</sub>, der seinerseits aus verschiedenen Proteinen zusammengesetzt ist.

Die Induktion einer ATPase durch Auxin wurde mehrfach beschrieben. Jedoch handelte es sich dabei um die kerncodierte Plasmamembran H<sup>+</sup>-ATPase (Frias et al. 1996, Coenen et al. 2002, Kim et al. 1997, Peltier und Rossignol 1996, Laporte und Rossignol 1997). Dagegen wurde bislang noch keine Induktion der Expression von FH<sup>+</sup>-ATPase-Genen durch Auxin beschrieben. Interessant sind die Ergebnisse von Arend et al. (2002), dass innerhalb von einigen Tagen nach der Zugabe von Auxin zu *Dormanz*-Pflanzen die Bildung von Plasmamembran H<sup>+</sup>ATPase ausgelöst wurde und dass bereits nach ein paar Stunden ein Anstieg der Proteinmengen zu verzeichnen war. Es existieren 2 Theorien über die Ursachen dieses Prozesses (Macdonald 1997; Kim et al. 2001). Beide besagen, dass das Auxin-Bindungs-Protein (ABP1) die Zunahme der Plasmamembran H<sup>+</sup>ATPase hervorruft.

### 3.5 Isolierung des Vollängen-Klons des Fragmentes 18R10 aus der cDNA-Bank von *Chenopodium rubrum*

Das Fragment 18R10 fiel im Differential Display (DD) auf und wurde von Peters und Zenkel (1999) isoliert. In DD hatte sich gezeigt, dass die Expression von 18R10 durch Cytokinin (Zeatinribosid) reprimiert, durch Auxin (IES) aber induziert wird. 2,4-D hat dagegen keinen Einfluss auf seine Expression. Zur Isolierung des Vollängen-Klons wurde ein Screening der cDNA-Bank von *Chenopodium rubrum* durchgeführt. Nach der *in vivo*-Excision wurde ein Vollängen-Klon (18R10VL) von knapp 1600 bp Länge gefunden.

Die Nukleotid- und die abgeleitete Aminosäuresequenz des cDNA-Inserts 18R10VL ist in Abb. 29 dargestellt. Das cDNA-Insert ist 1583 bp lang, mit einem offenen Leseraster zwischen 122-1225; es codiert ein Protein von 367 Aminosäuren. Die Molekularmasse, abgeleitet von der Aminosäuresequenz, beträgt 41 kDa.

```

1  AATTCGGCACGAGAAAAGCAAATAATTAAGACCAACACAAAAGCTGGTCTGGGTTTTGGT
61  TGCACAGAAATAAAAATTTAAACCAACCCAAAACCTTCACTTCTTCTATTACCACTCCC
121  CCCTCACATGGCAAAGATCACACCCAAAACCTACCAAAATGCTCCCTACATTGGCGCTCTT
      M A K I T P K T T K M L P T L A L F -
181  TGCAGCTATACTCTTCCCTCTCTCTATCCCCCTCCAATGCCCAATACAAGCCTCCTCTCTT
      A A I L F L S L S P S N A Q Y K P P L F -
241  CGTCTTCGGCGATTCCCTTTACGACGATGGTATGACTTTACACAACGGTGTAAAGGCGC
      V F G D S L Y D D G M T L H N G V K G A -
301  TGGTGCCGAGTTTTGGCCTTACGGCGAAACTTATTTAAGAAACCAGCTGGCCGATACTC
      G A E F W P Y G E T Y F K K P A G R Y S -
361  AGATGGTTCGCCTTATTCTGATTTTCATTGTCCAGTTTGCGGGGTTGCCTTTTTTTGCAACC
      D G R L I P D F I V Q F A G L P F L Q P -
421  CTATTTATTACCGGGGATTAAGATTTCACTAAGGGAATCAATTTTGCTTCTGCTGGTGC
      Y L L P G I K D F T K G I N F A S A G A -
481  TTGTGTTCTTGTGAAACTCGTCCTCAAACGATAAATTTGAAGAGCAAGTGGATTATTT
      C V L V E T R P Q T I N L K R Q V D Y F -
541  TCTCCAAATGGTGCAAAAATTGAAGCAACAAGTTGGAGATGCACAAGCTAATCAGCTGTT
      L Q M V Q K L K Q Q V G D A Q A N Q L L -
601  ATCCGAAGCTGTATACTTGTTTAACATTGCAGGAAATGACTATGTAACCCTTCTACAGAA
      S E A V Y L F N I A G N D Y V T L L Q K -
661  GAATGTCAAAAAGCTTCCACTCTCCAATTTCAAAAAGGAACCGTCAGATGAATATGATTCT
      N V K K L P L S N F K R N R Q M N M I L -
721  TGGCAACCTCACCATACACATTA AAACTATCTATAACCAAGGAGGTAGGAAATTCGCATT

```



```

      G N L T I H I K T I Y N Q G G R K F A F -
781 CCAAAACCTTGGTCCTCTTGGGTGCATGCCATCAATGAAGTACATGCTAGCATATAAAGG
      Q N L G P L G C M P S M K Y M L A Y K G -
841 AACTTGCGCGCCCGAGCCACAAGAGCTAGCCAAGATGCACAACGCTAAGTTTGCTGCACT
      T C A P E P Q E L A K M H N A K F A A L -
901 AGCCAAGAGATTGCAAAGCAACCTACCAGGGTTCAAATACTCAATATACGACTTCTACAC
      A K R L Q S N L P G F K Y S I Y D F Y T -
961 CTCCTTATACCTCCGTGTTTTATATGGAAGTAGATATGGTTTTAGGGAAAGCCAAACAGC
      S L Y L R V L Y G S R Y G F R E S Q T A -
1021 TTGCTGTGGAAGTGGATCCTACAATGGTGACTTCACTTGCCAAAAGAAAGACCAGAGCTT
      C C G S G S Y N G D F T C Q K K D Q S F -
1081 CTCTGTTTGCAGTAATCCGAATGAGTACTTGTGGTTCGACGCCGCGCATCCCaCGGACAA
      S V C S N P N E Y L W F D A A H P T D K -
1141 GGCTAACCAGGCCTTCTCTAAAGAGTTCTGGAGTGGAGGATCTAACCTTGTGTCTCCTTA
      A N Q A F S K E F W S G G S N L V S P Y -
1201 CAATTTGCAGAATTTGTTGCGCCGCGAAATGATCAAGTTTATAGGGATTTTTGGGATACAT
      N L Q N L F A A K *
1261 ATGCTCTTACACTCAACTGTGATCAAAGATAAGGAGTGTTAGGGTTATTTTATTCTATT
1321 GATTAATATTATTATTCTCTGGTACATCTTGTATGTTACACATAACCAATAGCTTGTAGTTT
1381 TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTACTTATTATTTTCTTCTTGAAAATTTGGGAGGAAATTAAG
1441 GTCAAGGTTTATGTTGTAATAAGTGAGGGACAGAGGGGTAAAGTGGTACCAAAAATTA
1501 GTAATCAGCAATAAGAAGTTAAAAAAAAAAGAAGAAAATGCAAATGTTGATGAAATTTTA
1561 CTTGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

Abb. 29: Nukleotid-Sequenz und abgeleitete Aminosäure-Sequenz des Gens 18R10VL aus *Chenopodium rubrum*-Suspensionkulturzellen (*Accession Number* AY299194). Das GDSL Motiv ist durch Fettdruck hervorgehoben

### 3.5.1 Proteomics von 18R10VL

Der Vergleich des Volllängen-Klons 18R10VL mit der Gen-Datenbank zeigt eine beachtliche Identität mit einer Lipase/Acylhydrolase-Sequenz von *Arabidopsis thaliana* (37 % identisch, 56,1 % homolog). Da der Klon außerdem alle die für diese Enzyme charakteristischen Domänen enthält, kann man annehmen, dass dieses Gen eine durch Auxin induzierte und durch Cytokinin reprimierte Lipase/Acylhydrolase mit GDSL-Motiv (Abb. 29) codiert.

Der Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenz mit der Genbank ergab 200 ähnliche Sequenzen von Pflanzen. Der Vergleich zeigt 159 Sequenzen von *Arabidopsis thaliana* und 23 Sequenzen von *Oryza sativa* sowie weitere von *Brassica*, einigen *Fabaceen*, *Heveca* und *Digitalis* (Tabelle 6). Interessant ist die große Anzahl von ähnlichen Sequenzen aus *Arabidopsis thaliana*. Die Datenbank des Institute for Genomic Research (TIGR <http://www.tigr.org/>) enthält in der Familie der GDSL-Lipase/Hydrolase Proteine 108 Sequenzen.

Tabelle 6: Nach Arten geordnete Sequenzen mit Ähnlichkeiten zur abgeleiteten Aminosäuresequenz von 18R10 von *Chenopodium rubrum*

Spezies	Sequenznummer	Sequenznummer für W <sup>2</sup> H	Name des Proteins	Ähnlichkeit mit <i>Chenopodium rubrum</i> in %
<i>Arabidopsis thaliana</i>	159	141	<i>GDSL-Motiv lipase/hydrolase protein</i>	56,1-39,2
<i>Oryza sativa</i>	23	20	<i>putative GDSL-like lipase/acylhydrolase</i>	51,0-40,9
<i>Brassica napus</i>	4	3	<i>myrosinase-associated protein</i>	43,6-42,5
<i>Medicago truncatula</i>	3		<i>early nodule-specific protein</i>	47,4-42,0
<i>Medicago sativa</i>	3	1	<i>early nodulin</i>	42,5-38,4
<i>Daucus carota</i>	2		<i>iEP4</i>	42,0
<i>Brassica rapa subsp. pekinensis</i>	1	1	<i>lipase SIL1</i>	60,0
<i>Brassica oleracea</i>	1	1	<i>anther-specific proline-rich protein</i>	42,3
<i>Cicer arietinum</i>	1	1	<i>putative proline-rich protein APG isolog</i>	45,0
<i>Vigna unguiculata</i>	1		<i>CPRD47</i>	33,2
<i>Hevea brasiliensis</i>	1	1	<i>ENSP-like protein</i>	45,0
<i>Digitalis lanata</i>	1	1	<i>lanatoside 15'-O-acetylerase</i>	44,4
Summe bekannter Sequenz	200	152		

Im W<sup>2</sup>H-Programm (Version 4, 2001) wurde mit 152 ausgewählten Sequenzen ein phylogenetisches Kladogramm erstellt (Abb. 30). Dabei ergaben sich 2 Hauptgruppen (eine mit 46 Sequenzen, die andere mit 106), die wiederum in Untergruppen aufgeteilt werden können.

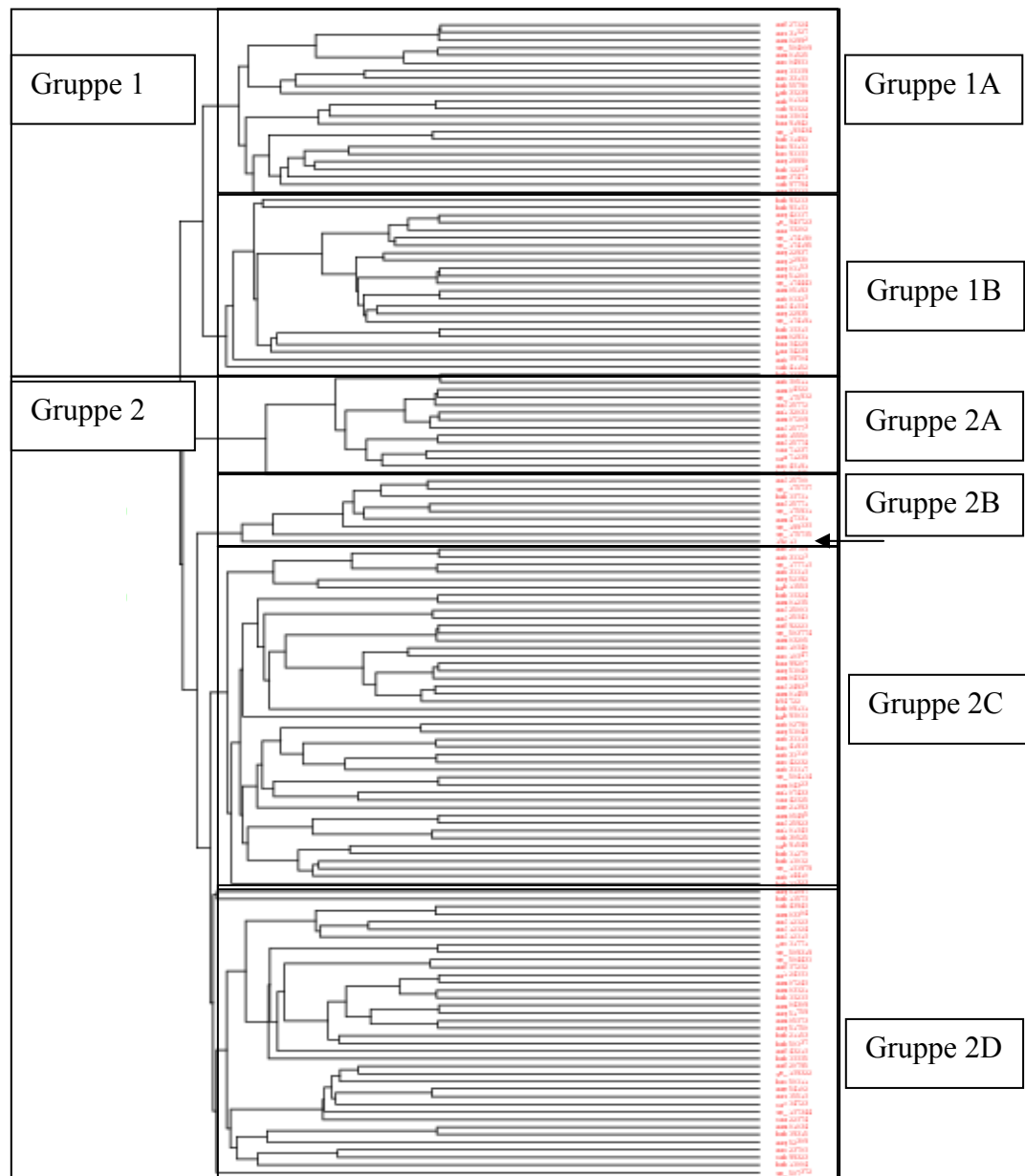


Abb. 30: Kladogramm der abgeleiteten Aminosäuresequenzen bekannter GDSL-Lipasen.  
 → Position von *Chenopodium rubrum*. Eine Auflistung der *Accession Number* aller Sequenzen ist in Anhang I.

Das Ergebnis des Vergleichs (*pileUp*) der abgeleiteten Aminosäuresequenzen bekannter GDSL-Lipasen mit der von *Chenopodium rubrum* wurde mit der Analyse des Hydrophobizitätsindex kombiniert. Die mit Hilfe des TMHMM-Programms durchgeführte Analyse zeigt, dass die GDSL-Lipasen transmembrane Proteine sind. Dabei befindet sich der N-Terminus (12 Aminosäuren) im Zellinneren und ist über einen transmembranen Anker von 19 Aminosäuren an die Zellmembran gebunden. Der größte Teil des Proteins ist extrazellulär (Aminosäuren 32-368), möglicherweise auch das aktive Zentrum (Abb. 31).

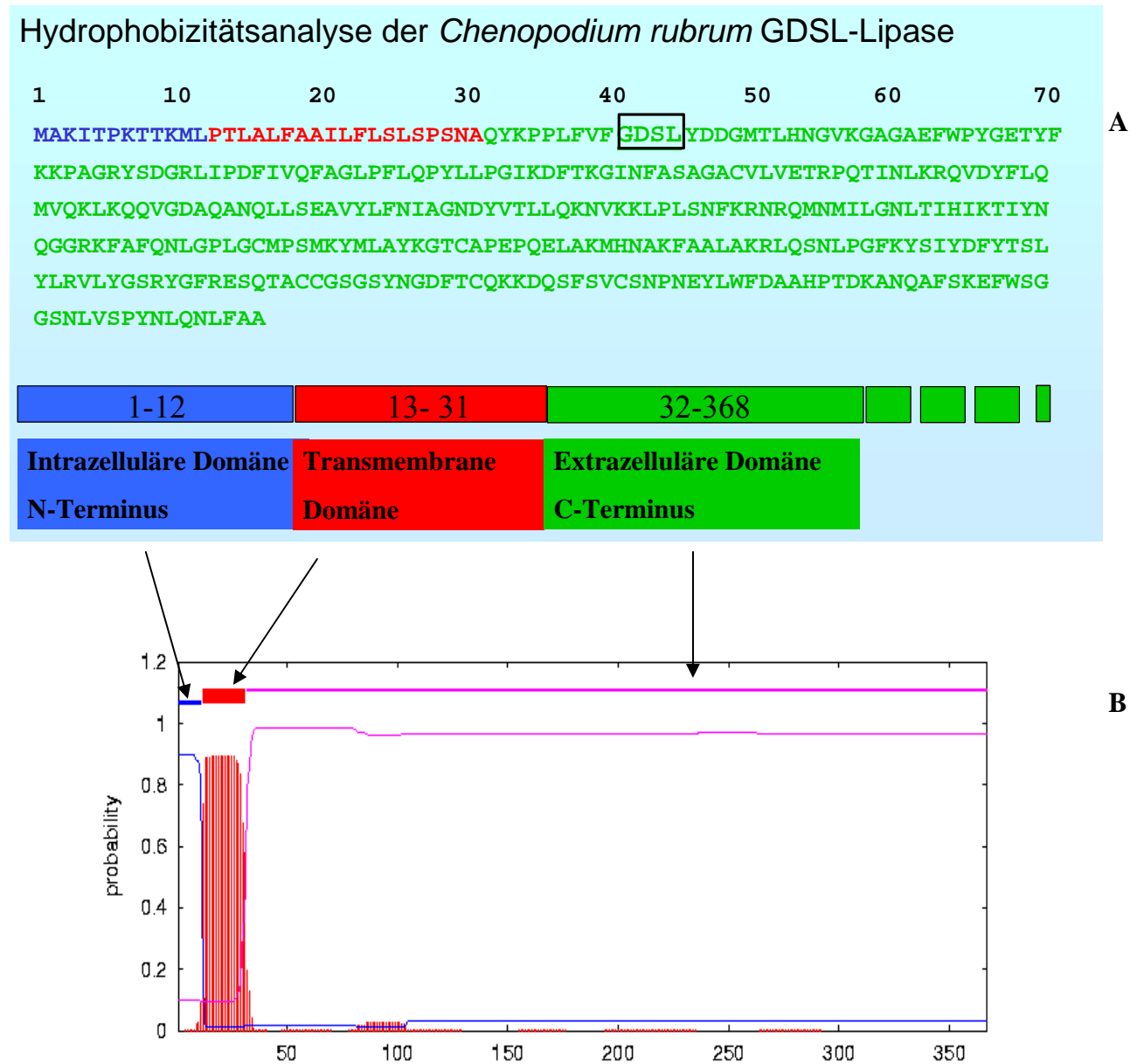
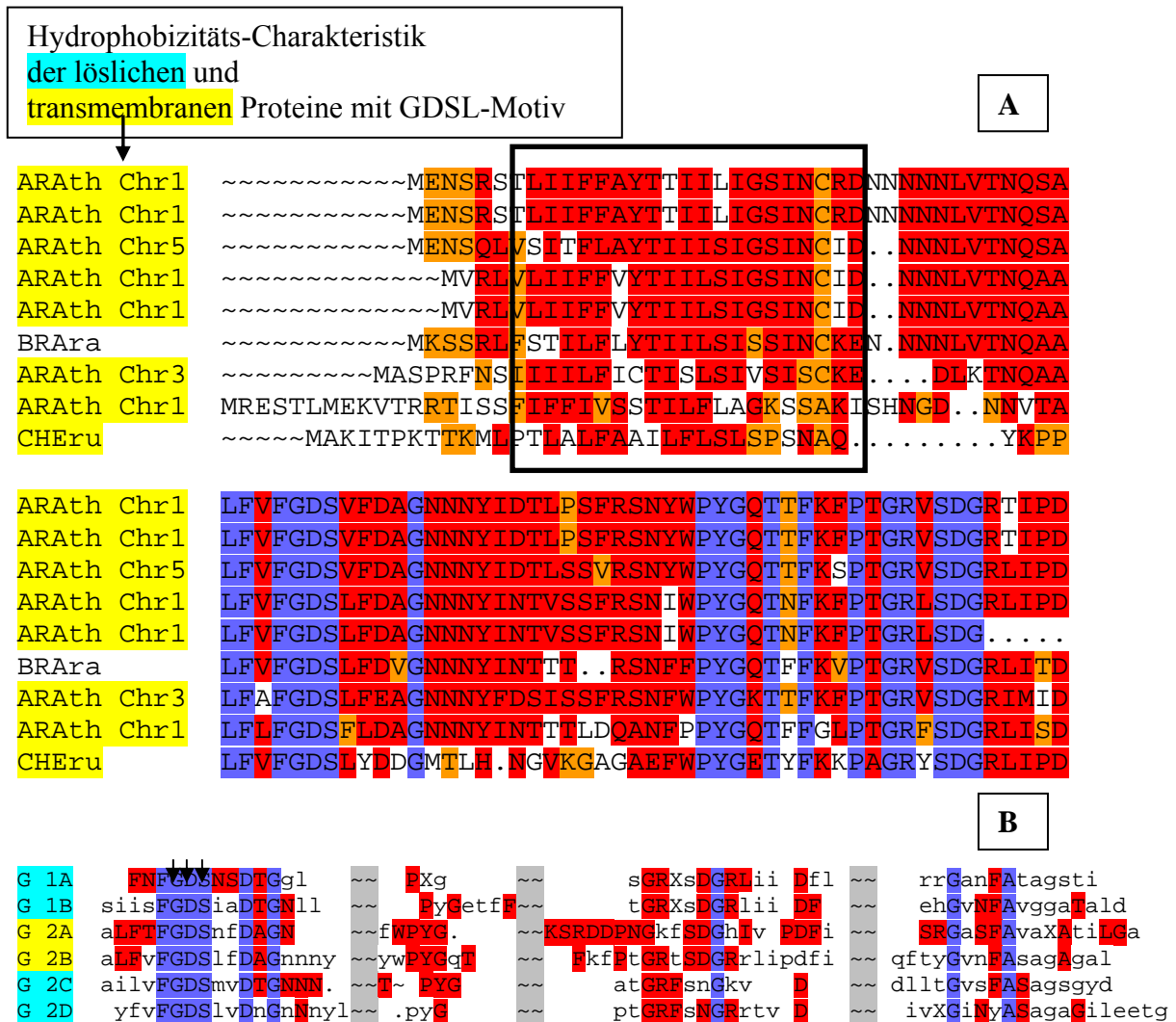


Abb. 31A: Struktureller Aufbau der GDSL-Lipase von *Chenopodium rubrum* entsprechend dem Hydrophobizitätsindex. B: Hydrophobizitätsindex-Analyse für GDSL-Lipase von *Chenopodium rubrum* mit Hilfe des TMHMM-Programms

Eine entsprechende Analyse wurde mit den anderen Vertretern der GDSL-Lipasen durchgeführt, wobei aus den Gruppen 1, 2A, 2C und 2D jeweils 1 Vertreter ausgewählt und die Gruppe 2B mit *Chenopodium rubrum* vollständig bearbeitet wurde (Abb. 32 A und B).



- Domäne für alle Sequenzen
- Domäne für alle Sequenzen dieser Gruppe
- Vergleich nicht relevanter Sequenzabschnitte

Abb. 32A: Multivergleich (*pileUp*) der abgeleiteten Aminosäuresequenzen bekannter GDSL-Lipasen aus der Gruppe 2B (s. Abb. 30) **Blau**: Identische Aminosäuren, **Rot**: mehr als 50% der Aminosäuren in einer Spalte besitzen starke Ähnlichkeit in ihrer funktionellen Gruppe, **Orange**: mehr als 50% der Aminosäuren in einer Spalte besitzen schwache Ähnlichkeit in ihren funktionellen Gruppen. Die eingerahmten Teilsequenzen gehören zum Transmembranbereich des Proteins. ARAth Chr – *Arabidopsis thaliana* – Chromosom; BRARA – *Brassica rapa*; CHERU – *Chenopodium rubrum*. B: Die Consensus – Sequenzen für alle 6 Gruppen

Die Abb. 32B zeigt, dass zwar alle Sequenzen das GDSL-Motiv enthalten, aber nicht alle die gleichen Charakteristika in Bezug auf den Hydrophobizitätsindex besitzen. Nach einer Kalkulation mit dem Programm Boxshade 3.21 ([www.ch.embnet.org/software/BOX\\_form.html](http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html)) von 50% Wahrscheinlichkeit besitzen sie außerdem verschiedene Domänen im aktiven Zentrum, das in Abb. 32B gezeigt ist.

Abb. 32 B deutet das Vorhandensein von 4 Gruppen an (1A, 1B, 2C und 2D aus Abb. 30) mit einer Tendenz zur Löslichkeit der Proteine und von 2 Gruppen (2A und 2B) mit transmembranen Proteinen. Die Zusammenfassung der Charakteristika der einzelnen Gruppen ist in Tabelle 7 dargestellt.

Tabelle 7: Übersicht über die GDSL-Lipasen aller 6 Gruppen in Bezug auf die Löslichkeit

Gruppe	Gesamtanzahl der Proteine	Anzahl der löslichen Proteine	Anzahl der transmembranen Proteine	% der löslichen Proteine
1 A	23	16	7	70
1 B	23	19	4	83
2 A	14	0	14	0
2 B	9	0	9	0
2 C	45	27	18	60
2 D	38	28	10	74

Bemerkenswert ist, dass die Sequenzanalyse der *Chenopodium rubrum*-Lipase-Domäne, die das GDSL-Motiv enthält, keine Homologie mit den Lipasen von *E. coli*, *Drosophila melanogaster* und *Homo sapiens* (komplettes Genom) aufweist. Nur mit den Bakterien (und dabei wiederum nur mit Cyanobakterien) ergibt sich eine geringe Homologie (33%) hinsichtlich der Phospholipasen.

Bevor Upton und Buckley (1995) in ihrer Arbeit „*A new family of lipolytic enzyme?*“ treffend die Frage nach einer neuen Familie von Enzymen stellten, gab es eine andere Bezeichnung für diese Proteine, die in verschiedenen Gruppen charakterisiert wurden.

Die Analyse der einzelnen Sequenzen der Gruppen ergab, dass es eine gut ausgeprägte Charakteristik für jede Gruppe gibt. In der Gruppe 1A sind das die nodulinen Proteine, in der Gruppe 1B die Lipase mit einer Ähnlichkeit zur Phospholipase der Bakterien. Für die Gruppe 2A ist die Myrosinase charakteristisch, in der Gruppe 2B die Lipase Acylhydrolase GDSL.

Die Gruppe 2C ist durch die Lipase der Familie II oder auch „*anther-specific proline-rich protein*“ charakterisiert. Für die Gruppe 2D ist wiederum das Lipase-Acylhydrolase-GDSL-Motiv kennzeichnend.

### 3.5.2 Induktion und Expression des Lipase-GDSL-Motiv-Transkriptes in *Chenopodium rubrum*

Für die GDSL-Lipase wurde eine Expressionsanalyse mit der Northern Blot-Technik durchgeführt. In Abb. 33 ist die Repression durch Cytokinin (Zeatinribosid) und 2,4D und die starke Induktion durch Auxin (IES) in Gegenwart von 0,1  $\mu$ M 2,4-D gezeigt. Festzuhalten ist auch, dass Cytokinin die Induktion durch Auxin unterdrückt.



Abb. 33: Northern Blot - Analyse der mRNA von 35 Tage alten *Chenopodium rubrum* - Suspensionskulturzellen nach Zugabe von IES (0,1 $\mu$ M), 2,4-D (0,1  $\mu$ M) und ZR (1 $\mu$ M) zum Kulturmedium (Gen 18R10VL als Sonde)

Die Expression des Lipase-Gens von *Chenopodium rubrum*-Suspensionszellen wurde während der gesamten Wachstumsperiode untersucht (Abb. 34). Die stärkste Expression zeigt sich am 20. Tag. Danach fällt die Expression bis zur späten stationären Phase ab. Zu Beginn der Seneszenz- und Alterungsphase zeigt sich ein zweiter, kleinerer Peak der Lipase-Expression.

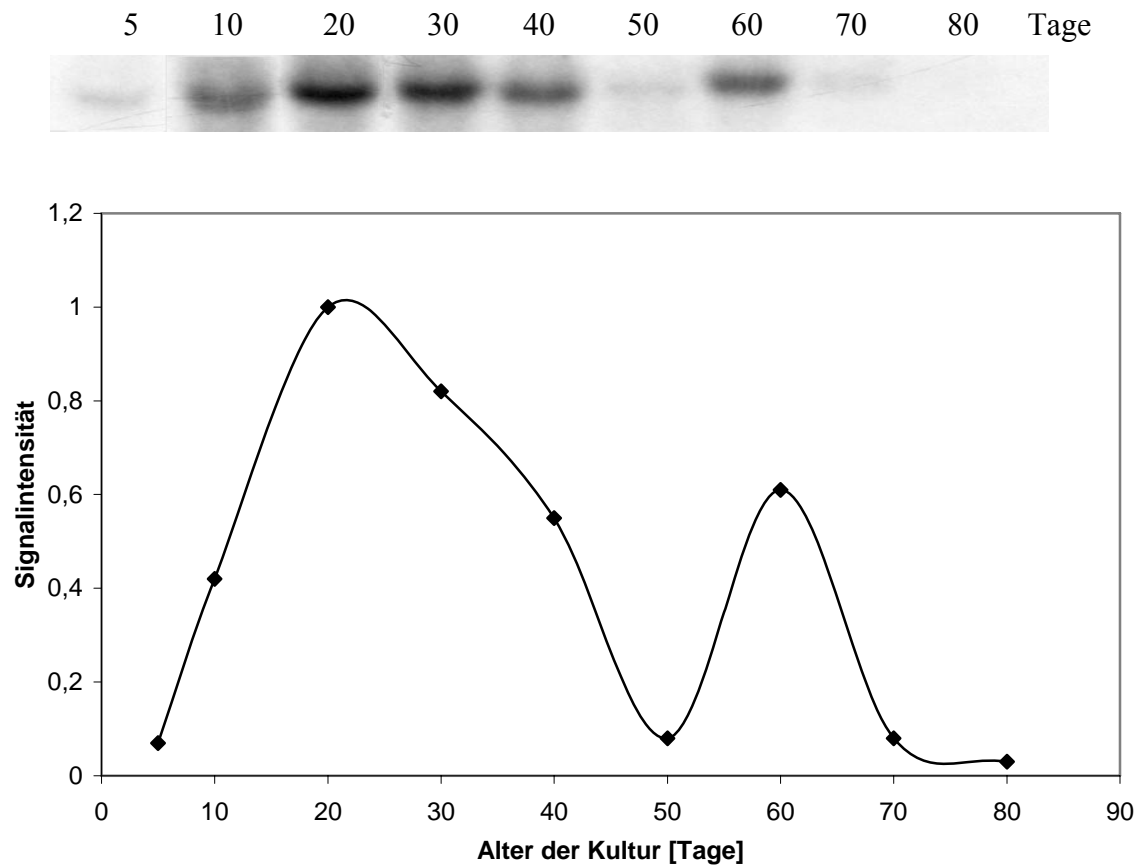


Abb. 34: Northern Blot-Analyse der RNA während der gesamten Kulturperiode von *Chenopodium rubrum*-Suspensionszellen. Es wurde jeweils RNA entsprechend 47 mg Zellen pro Bande aufgetragen

Bezieht man die Dynamik der Lipase-Expression statt auf die Biomasse auf die Zahl der zum jeweiligen Zeitpunkt lebenden Zellen (vgl. Abb. 7) so ergeben sich 3 Peaks: Am Ende der Teilungsphase, in der Mitte der stationären Phase und zu Beginn der Alterungsphase (Abb. 35).



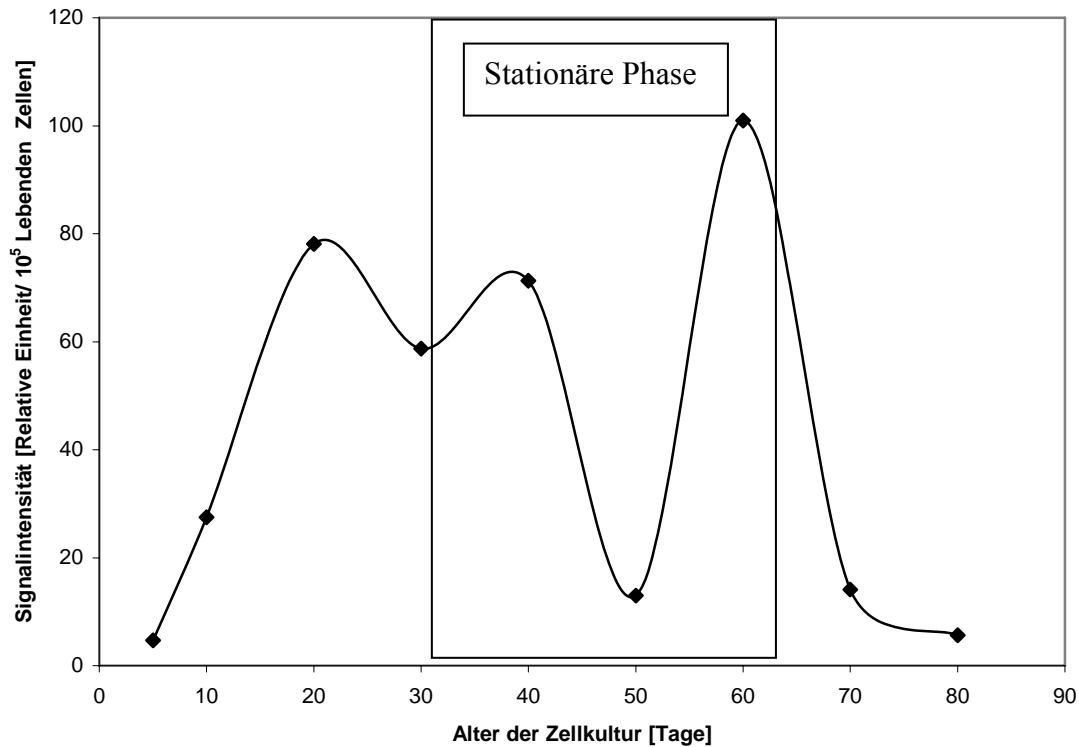


Abb. 35: Relative Expression der Lipase im Northern Blot, auf die Lebendzellzahl in 47 mg Zellmasse bezogen, während der gesamten Kulturperiode einer photoautotrophen *Chenopodium rubrum*-Suspensionskultur

### 3.5.3 *In vitro* und *in vivo* Expression der GDSL-Lipase von *Chenopodium rubrum*

Die Größe des Proteins von 41kDa wurde durch eine *In vitro*-Translation in Weizenkeimlingen überprüft, dass keine Deletion oder Insertion von Nukleotiden das korrekte Leseraster verändert haben.

Mit dem Ziel eine Enzymaktivität zu bestimmen, wurde eine *in vivo* Expression des Lipase in *E. coli* durchgeführt. Die Expression der GDSL-Lipase von *Chenopodium rubrum* wurde mit zwei verschiedenen Systemen durchgeführt: dem Qiagen-System mit dem Vektor pQE30 für die Expression im *E. coli*-Stamm M15 (Reinigung mit His-Tag) und dem Stratagene-System mit dem Vektor pCal-kc (Reinigung mit Hilfe des Calmodulins im C-Terminus und die Spaltung mit Thrombin). Für beide Systeme wurden die Klonierungen überprüft, die beide positiv ausfielen, und die in Abb. 36 dargestellt sind.

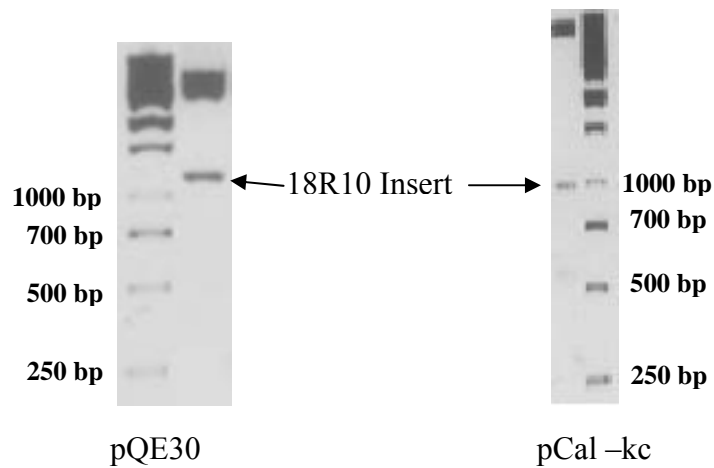


Abb. 36: Restriktionsverdau zum Nachweis von 18R10VL (GDSL-Lipase) in den Expressionsvektoren

Mit beiden Systemen wurde keine effiziente Protein-Expression erreicht. Im Qiagen-System mit dem Stamm *E. coli* M15 war es mit keiner Variation des Ansatzes möglich, auch nur geringste Proteinmengen mit Antikörpern gegen His-Tag nachzuweisen. Mit dem Stamm *E. coli* BL21-CodonPlus wurde eine geringe Proteinproduktion von etwa 56 kDa (GDSL-Lipase 41 kDa + Thrombin 15 kDa) beobachtet. Wilhelm et al. (1999) erzielten unter Zugabe von Rifampicin eine größere Induktion der GDSL-Lipase von *Pseudomonas aeruginosa*. Für die vorliegende Arbeit war diese Herangehensweise von Wilhelm et al. (1999) für eine Steigerung der Proteinproduktion jedoch nicht geeignet. Eine mögliche Erklärung für dieses Problem ist, dass das Protein der GDSL-Lipase von *Pseudomonas aeruginosa* ein lösliches Protein ist, das von *Chenopodium rubrum* jedoch ein transmembranes Protein.

Zur Gewinnung des Proteins wurde daher ein Reaktionansatz mit 2 Stunden Inkubationszeit gewählt.

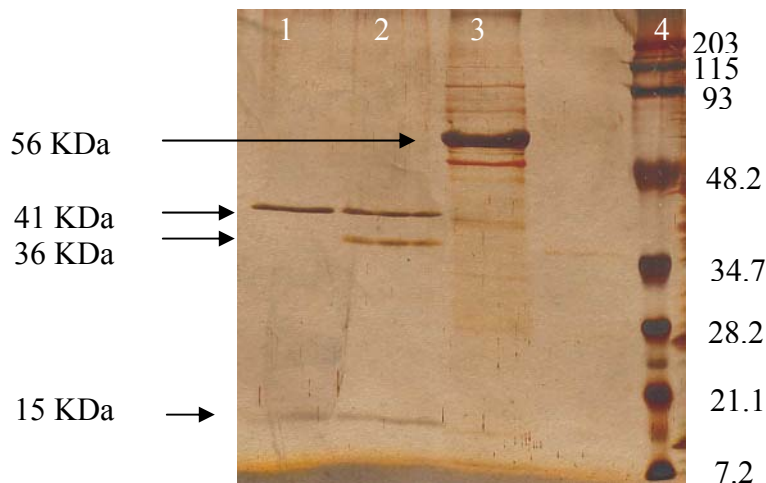


Abb. 37: SDS-Polyacrylamidgel mit anschließender Silberfärbung von Proteinextrakten aus *E. coli* BL21-CodonPlus nach Überexpression der GDSL-Lipase. Proteinbanden nach Spaltung des GDSL-Fusionsproteins mit Calmodulin durch Thrombin. Bande 1: Kontrolle für die Thrombin-Spaltung (mit dem im Kit mitgelieferten Protein); Bande 2: Thrombin-Spaltung des GDSL-Lipase Fusionsproteins; Bande 3: GDSL-Lipase Fusionsprotein; Bande 4: Protein Marker

Abb. 37 zeigt die Proteine der Thrombin-Spaltung des Calmodulin-Fusionsproteins, die eine mögliche GDSL-Lipase von *Chenopodium rubrum* darstellen. In der Spur 3 wurde das Fusionsprotein direkt aufgetragen, dessen Masse bei 56 kDa lag. Dies entsprach der Erwartung. In der Spur 2 traten deutliche Banden bei 41, 36 und 15 kDa auf. Die Bande bei 41 kDa entspricht der molekularen Masse der GDSL-Lipase, während die Bande bei 15 kDa dem Thrombin zuzuordnen ist, welches auch in Spur 1 des Kontroll-Proteins zu sehen ist. Hilton und Buckley (1991) sowie Flieger et al (2001) stellten nach der Thrombin-Spaltung in einer GDSL-Lipase von *Aeromonas hydrophila* und *Legionella pneumophila* aufgrund des Wegfalles der Disulfid-Brücke, die sich im C-Terminus befindet, einen Verlust von 4 – 5 kDa fest. In der vorliegenden Untersuchung wurde eine ähnliche Differenz von 4-5 kDa (die Bande bei 36 kDa) beobachtet.

### 3.5.4 Lipase-Acylhydrolase mit GDSL-Motiv

Die Lipasen sind Enzyme, die eine kleine Konsensus-Region mit der Sequenz G-X-S-X-G aufweisen, in der sich das aktive Zentrum befindet. Diese Sequenz findet man auch in Serine-Proteasen (Yang et al. 1987, Brenner 1988). Einer der ersten Berichte über das GDSL-

Motiv stammt von Hilton und Buckley (1991), die jedoch in der Sequenz selbst das GDSL nicht als charakteristische Motiv sahen. Sie sprachen allgemein von einer Lipase, und durch Mutation von Phe13 zu Ser und von Ser16, His175, His180 und Ser229 zu Asn bestimmten sie Ser16 als katalytisches Zentrum. Die Mutation dieser Aminosäuren führte dazu, dass das Protein keine Aktivität für eine Lipidhydrolyse- oder einen Acyl-Transfer mehr aufweist.

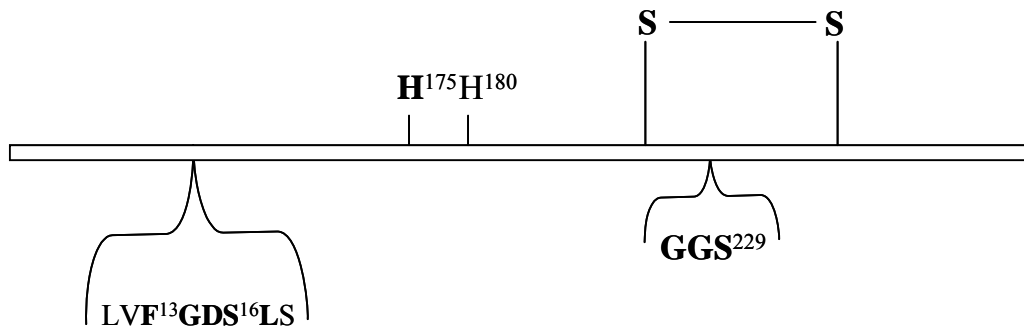


Abb. 38: Potentiell wichtige Regionen in der Sequenz der Lipase von *Aeromonas hydrophila*. (fett gedruckt die sind Aminosäuren, die identisch mit der Lipase von *Chenopodium rubrum* sind)

In weiteren Studien wurde bestätigt, dass das konservierte Ser im GXS-Motiv in *Vibrio mimicus* (Shaw et al. 1994), in *Bos taurus* (Hattori et al. 1995) und in *Streptomyces diastochromogenes* (Tesch et al. 1996) das katalytische Zentrum des Enzyms ist. Außerdem wurde in Strukturuntersuchungen gezeigt, daß auch das im DXXHP Motiv enthaltene konservierte Histidin an der Katalyse beteiligt ist (Wei et al. 1995; Ho et al. 1997).

Upton und Buckley (1995) beschrieben die Existenz einer neuen Familie von lipolytischen Enzymen mit einer FGDSL-Region, nannten diese jedoch GDSL-Lipase. Sie beschrieben 5 für diese Enzyme charakteristische Blöcke (I, II, III, IV und V). Später wurden durch die Sequenzanalyse typische Motive für drei der Blöcke ermittelt (I, III und V Dalrymple et al. 1997). Der Block I wird in Abb. 32B dargestellt.

Tabelle 8: Die Gruppen der Lipase im Vergleich des Motivs GXND (Block III)

Gruppe	Motiv der Gruppe	Bemerkung
1 A	GXND	X immer Q
1 B	GXND	X= G,V oder A
2 A	GX(E N,)D E-57%	X=A, M und T
2 B	GXND	Außer von <i>Chenopodium rubrum</i> , bei dem es <b>AGND</b> ist X=S, A, L, V und G
2 C	GX(N,D,T,V,S)D	77.77% GXND
2 D	GXND	X= S,N,G,A oderV

Tabelle 9: Die Gruppen der Lipase im Vergleich des Motivs DXXHP (Block V)

Gruppe	Motiv der Gruppe	Bemerkung
1 A	DXXH(Y,A)	
1 B	DXXH(L,M,F,P)	L-10mal M-10mal F und P1mal
2 A	DXXHN	
2 B	DXXH(L,P)	P nur bei <i>Chenopodium rubrum</i>
2 C	DXXHP	
2 D	DXXHP	

Nur die Motive der Gruppe 2 D entsprechen den oben von verschiedenen Autoren beschriebenen Charakteristiken der einzelnen Blöcke. Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass die Untersuchungen nicht spezifischerweise bei Pflanzen vorgenommen wurden. Das unterstreicht die Notwendigkeit nach der Suche von Übereinstimmungen mit Sequenzen von anderen Organismen, bei denen nur eine geringe Ähnlichkeit vorlag, vor allem aber für die GDSL-Lipase von *Chenopodium rubrum* mit nichtpflanzlichen Organismen.

### 3.5.5 Regulation der Expression von Lipasen durch Phytohormone

#### Auxin

Untersuchungen mittels Northern Blot (Abb. 33) hatten gezeigt, dass die Expression des GDSL-Lipase-Gens durch Auxin induziert wird. Auch Lee et al. (2003) beobachteten in *Arabidopsis thaliana* eine schnelle Aktivierung eines Phospholipase A<sub>2</sub>-Gens durch IES, dessen stärkste Expression 4 Stunden nach Zugabe des Auxins gemessen wurde.

Daten anderer Arbeitsgruppen zeigen einen Einfluss von Auxin eher auf die Enzymaktivität von Phospholipase A (Andre und Scherer 1991; Scherer und Andre 1989, 1993; Scherer 1995). Dass es sich dabei um einen sehr schnellen Prozess handelt, demonstrierten Paul et al. (1998) mit fluoreszierendem BODIPY-Phosphatidylcholin als Substrat, welches durch Phospholipase A<sub>2</sub> hydrolysiert wird. Auch in Zellkulturen von *Petroselinum crispum* L. und *Glycine max* L. wurde eine schnelle Aktivierung einer Phospholipase A<sub>2</sub> durch Auxin nachgewiesen.

### **Cytokinin**

Der Einfluß von Cytokinen (Repression oder Induktion) auf Lipase-Aktivität ist bislang nur wenig untersucht. Helliwell et al. (2001) berichteten von einer GDSL-Lipase aus *Arabidopsis thaliana* (AAF26785), die keinen Cytokininresponse zeigt. Diese Lipase besitzt eine Homologie von 48% mit dem Protein aus *Chenopodium rubrum*. Nach einer Multivergleichsanalyse des Proteins gehört diese Lipase zur Gruppe 2 D und damit zu den löslichen Proteinen.

### **3.5.6 Antagonistische Wirkung des Auxins und des Cytokinins in der Molekularbiologie**

Im Gegensatz zur Lipase aus *Arabidopsis thaliana* reagiert die Expression der Lipase aus *Chenopodium rubrum* sowohl auf Auxin (Induktion) als auch auf Cytokinin (Repression) (Valdes et al. 2001).

Das Verhältnis von Auxin- und Cytokininkonzentrationen kontrolliert ein weites Spektrum an Prozessen in der Pflanzenentwicklung, z.B. die Bildung von Wurzeln oder von Sprossen aus Kallusgewebe (Skoog und Müller 1957). Die Applikation der beiden Hormonspezies verursacht häufig antagonistische Effekte (z.B. wird die Bildung von Sprossen durch Auxin gehemmt, durch Cytokinin jedoch gefördert). Die molekularen Mechanismen derartiger Interaktionen sind jedoch nicht geklärt (Coenen et al. 2003).

Bislang wurden nur wenige Gene gefunden, deren Promoter mit synergistischem Response auf beide Phytohormone reagiert. Matsuda et al. (2001) beobachteten mit einem Genkonstrukt FAD3::LUC (Fettsäure Desaturase und Luciferase ) erst nach zwölfstündiger Induktion mit Auxin und Cytokinin ein Ansteigen der Expression. Daraus schlossen die Autoren, dass eine direkte Einwirkung der Phytohormone auf den Promotor FAD3

unwahrscheinlich sei. In einer anderen Arbeit untersuchen Coenen und Lomax (1997) die synergistische Wirkung der beiden Phytohormone auf Proteinebene der CDKA (Cyclin-abhängige Proteinkinasen A), deren Menge durch Auxin erhöht und deren Aktivität nach Cytokininzugabe meßbar wird. Die gegenseitige Kontrolle von Auxin und Cytokinin, die interaktive Kontrolle der Genexpression und posttranslationale Effekte sind als mögliche Mechanismen beschrieben worden, die solchen physiologischen Wechselwirkungen zu Grunde liegen.

Arbeiten über eine Interaktion von Cytokinin mit dem synthetischen Auxin 2,4-D liegen - mit einer Ausnahme - noch nicht vor. Bei der Ausnahme handelt es sich um die Expression des Gens der Stärkesynthese in der Tabak-Zellkultur BY-2. Unter diesen Bedingungen zeigte sich eine antagonistische Wirkung beider Hormone, weil 2,4-D die Expression des Gens reprimiert und während sie durch Cytokinin induziert wird (Miyazawa et al. 1999).

IES induziert, ZR unterdrückt die Induktion der Lipase von *Chenopodium rubrum*. Bei einer gleichzeitigen Behandlung der Kulturzellen mit IES und ZR überwiegt der reprimierende Effekt des Cytokinins. Vergleichbare Befunde anderer Autoren liegen bis heute nicht vor, jedoch sind antagonistische Effekte anderer Phytohormone bzw. Effektoren auf GDSL-Lipasen der Gruppe 2A bekannt. So induziert Jasmonsäure diese Gene, während die Induktion durch Salicylsäure reprimiert wird (Taipalensuu et al. 1996, 1997, Grsic 1999).

### **3.5.7 Lipase und Seneszenz in der Wachstumsperiode**

Erstmalig demonstrierten Brick et al. (1995), dass eine GDSL-Lipase von Pflanzen (*Arabidopsis thaliana*) lipolytische Aktivität aufweist. Sie fanden nur in den etiolierten nicht aber in den belichteten Keimlingen eine Expression des Gens und schlossen daraus, dass das Enzym nur in den ersten Wachstumsstadien der Pflanze aktiv ist. Dieser Befund steht im Widerspruch zu den Ergebnissen anderer Autoren, wie z.B. Beisson et al. (1997), die in Keimlingen von Sonnenblumen mit zunehmendem Alter einen Anstieg des Proteins beobachteten und erstmals zeigten, dass mit dem GDSL-Motiv Acyl-Esterase-Aktivität verbunden ist. In der *Chenopodium rubrum* - Zellkultur akkumuliert das Lipase-Transkript am Ende der stationären Phase (Abb. 35). In der Alterungsphase lässt die Expression aber stark nach, was gegen die Beteiligung des Enzyms an Seneszenzprozessen spricht.

---

Nach Thompson et al. (1998) sind an der gesteuerten Seneszenz vier lipiddegradierende Enzyme beteiligt: die Lipoxygenase, Phosphatidsäure-Phosphatase, Phospholipase D und lipolytische Acyl-Hydrolase. Dies trifft für die Lipase aus *Chenopodium rubrum* sicherlich nicht zu. Allerdings kann auch nicht ausgeschlossen werden, dass die Phospholipase von *Chenopodium rubrum* an der Freisetzung von Fettsäuren aus der Plasmamembran beteiligt ist, die über die Reaktionen der LOX letztlich zur Bildung von Jasmonsäure führen. Ein Argument dafür wäre der Befund, dass es sich um ein membranintegrales Enzym handelt.



### 3.6 Isolierung des Volllängen-Klons des Fragmentes Alt6m4 aus der cDNA-Bank von *Chenopodium rubrum*

Das Fragment Alt6m4 wurde im Differential Display entdeckt. Es konnte nicht in jungen Zellen (7 Tage) sondern nur in Zellen der stationären Phase (35 Tage) gefunden werden und seine Expression wird durch Auxin (IES) nicht aber durch 2,4-D induziert. Zur Isolierung des Volllängen-Klons wurde eine cDNA-Bank von *Chenopodium rubrum* gescreent. Nach der *in vivo*-Excision wurde ein Klon von 2451 bp gefunden (Alt6m42). Der Vergleich mit in Datenbanken verfügbaren Sequenzen zeigte, dass diesem Klon das 5'-Ende fehlte. Ein Volllängen-Klon wurde durch RACE-PCR mit anschließender Klonierung mit dem Gateway-System erhalten.

Die Nukleotid- und die abgeleitete Aminosäuresequenz des Volllängen-Klons Alt6m42 sind in Abb. 39 dargestellt. Die cDNA ist 2692 bp lang, mit einem offenen Leseraster zwischen den Basenpaaren 59-2362; das entsprechende Protein enthält 767 Aminosäuren. Die Molekularmasse, abgeleitet von der Aminosäuresequenz, beträgt 83 kDa.

```

1  GCAAACATACAACAATTATTATTACTTATCCACCAAACCTAATAACAATAAAATAAATTAT
M
61  GTCATCTCGTAATAAACTTTTTTTGCTTTCTTGTGTTATTTATTCTTCTTAGCGCAGAGGC
   S S R N N F F C F L V L F I L L S A E A
121  CCGAGCTGCCCATTTGGCATGTGATCCAAAAGCGGGCTAACTCGGGCCTTGCGCTTTTG
   R A A P L A C D P K S G L T R A L R F C
181  CAGGGTCAACCTCCCGATACGTGCTAGGGTCCAAGACCTTATCGGGAGGTTGAACCTGCA
   R V N L P I R A R V Q D L I G R L N L Q
241  GGAGAAGGTGAAACTACTAGTGAACAATGCGGCACCTGTGCCGCTCTAGGAATATCAGG
   E K V K L L V N N A A P V P R L G I S G
301  GTATGAGTGGTGGTCTGAGGCCTTACATGGAGTGTCCAACGTGGGACCGGGGACAAAATT
   Y E W W S E A L H G V S N V G P G T K F
361  CCGTGGCGCTTTCCCGCCGCCACCAGCTTCCCCCAGGTCATCACCACGGCTGCTTCCTT
   R G A F P A A T S F P Q V I T T A A S F
421  CAATGCCTCTCTTTGGGAAGCTATTGGACAGGTAGTGTGATGAAGCAAGAGCAATGTA
   N A S L W E A I G Q V V S D E A R A M Y
481  TAATGGAGGAACAGCAGGATTAACATATTGGAGTCCAATGTGAACATATTTTCGTGACCC
   N G G T A G L T Y W S P N V N I F R D P
541  AAGATGGGGTAGAGGTCAGGAACTCCTGGTGGAGACCCACATTAGCATCACAAATATGC
   R W G R G Q E T P G E D P T L A S Q Y A
601  TGCTAGTTATGTTTCGAGGGCTTCAAGGTATTTACAATAAGAATCGTTTGAAGGTTGCTGC
   A S Y V R G L Q G I Y N K N R L K V A A
661  TTGTTGTAACATTACACTGCTTATGACCTTGACAATTGGAATGCCGTTGATCGTTTCCA
   C C K H Y T A Y D L D N W N A V D R F H
721  TTTTAATGCTAAGGTGAGCAAGCAAGATTTGGAAGACACATATAATGTGCCCTTCAAGGG
   F N A K V S K Q D L E D T Y N V P F K G
781  TTGTGTACAAGAGGGAAGAGTTGCTAGTGTGATGTGCTCCTACAACCAAGTAAATGGCAA
   C V Q E G R V A S V M C S Y N Q V N G K

```

841 GCCCACTTGTGCTGACCCTGATCTACTTCGCAACACTATTCGTGGCCAATGGCGCCTCAA  
 P T C A D P D L L R N T I R G Q W R L N  
 901 TGGGTATATTGTATCTGATTGTGATTCAGTTGGTGTGTTATATGATGATCAACATTACAC  
 G Y I V S D C D S V G V L Y D D Q H Y T  
 961 CAGAACTCCTGAGGAAGCGGCAGCTGATACCATCAAAGCAGGTTTAGACTTGGACTGTGG  
 R T P E E A A A D T I K A G L D L D C G  
 1021 GCCCTTTTTAGCAGTGCACACGGAAGCGGCCGTAAAAAGAGGGTTATTAACAGAGGCTGA  
 P F L A V H T E A A V K R G L L T E A D  
 1081 TGTGAACCAGGCCTTAACCAACACCTTCACAGTCCAAATGAGACTAGGGATGTTTGATGG  
 V N Q A L T N T F T V Q M R L G M F D G  
 1171 AGAAGCAGCAGCCCAACCATTTGGACATTTAGGCCAAAAGACGTATGCAGTCCAGCCCA  
 E A A A Q P F G H L G P K D V C S P A H  
 1201 CCAAGACCTAGCCCTCCAGGCAGCCCGTCAAGGGATTGTTCTACTCCAAAACCGGGCCG  
 Q D L A L Q A A R Q G I V L L Q N R G R  
 1261 ATCACTGCCCTTGTCCACGGCTCGCCACCGTAATATTGCCGTTATTGGGCCTAATGCCGA  
 S L P L S T A R H R N I A V I G P N A D  
 1321 TGCCACGGTAACCATGATCGGTAACACGCCGGGTGGCATGTGGTTACACATCACCTT  
 A T V T M I G N Y A G V A C G Y T S P L  
 1381 ACAAGGCATAGCAAGGTATGCAAAAACAGTCCATCAAGCAGGATGCATAGGTGTTGCTTG  
 Q G I A R Y A K T V H Q A G C I G V A C  
 1441 TACTAGCAACCAACAATTTGGGGCAGCTACAGCAGCAGCAGCTCATGCTGATGCAACAGT  
 T S N Q Q F G A A T A A A A H A D A T V  
 1501 ACTAGTTATGGGCCTGGACCAATCAATCGAGGCCGAATTCCTGATCGGGCATCGGTCTCT  
 L V M G L D Q S I E A E F R D R A S V L  
 1561 ATTACCGGGCCACCAACAAGAGCTCGTTTCAAAGTGGCCTTGGCTTCAAGAGGCCCAAC  
 L P G H Q Q E L V S K V A L A S R G P T  
 1621 TATTCTGGTCTTGATGTGTGGTGGGCCTGTTGATGTCACCTTTGCTAAAAATGACCCAAA  
 I L V L M C G G P V D V T F A K N D P K  
 1681 GATTAGTGCTATTTTATGGGTTGGTTATCCAGGTCAAGCTGGTGGCACTGCTATTGCTGA  
 I S A I L W V G Y P G Q A G G T A I A D  
 1741 TGTTCTCTTTGGTACCACTAATCCAGGAGGAAAGTTACCAAATACATGGTACCCCCAAG  
 V L F G T T N P G G K L P N T W Y P Q S  
 1801 CTATGTGGCAAAGGTTCCAATGACAGACCTAGCAATGAGGGCGAACCCATCAAACGGTTA  
 Y V A K V P M T D L A M R A N P S N G Y  
 1861 TCCGGGCCGACCTACCGTTTCTATAAGGGGCCCGTTGTGTTCCCGTTCGGTTTTGGGTT  
 P G R T Y R F Y K G P V V F P F G F G L  
 1921 AAGTTACACCCGGTTCACCCAATCACTGGCCCATGCACCCACCAAGGTCATGGTACCCTT  
 S Y T R F T Q S L A H A P T K V M V P L  
 1981 AGCCAACCAATTACCAACTCAAACATCACCTCATTTAACAAAGATGCCTTAAAAGTGTT  
 A N Q F T N S N I T S F N K D A L K V L  
 2041 ACATACAAATTGTGACAACATAACCCCTAAGCCTCCACATTGATGTGAAGAACAAGGGCAA  
 H T N C D N I P L S L H I D V K N K G K  
 2101 GGTGATGGATCCCACACTATCCTTGTGTTCTCGACCCCGCCAAAGGGACCAAGTCGTC  
 V D G S H T I L V F S T P P K G T K S S  
 2161 CGAGAAGCAACTTATTGGGTTCAAAGGGTCCATGTGTTTCGCGGGTTCAAAGCAACGGGT  
 E K Q L I G F K R V H V F A G S K Q R V  
 2221 TAGGATGAACATACACGTTTGCAACCATCTTAGTAGAGCTGATGAATTTGGGGTTAGAAG  
 R M N I H V C N H L S R A D E F G V R R  
 2281 AATCCCAATTGGTGAACATACTCTACATATTGGGGACGACCACAAACATAAGCTTTCTCT  
 I P I G E H T L H I G D D H K H K L S L  
 2341 TCACATTGACATAGGGAAATGAGATCTTAGCATGGTATTTTTCAAAGGAAATTTAGGAAT  
 H I D I G K \*  
 2401 TATACGTACAGTTGCTAGTGTGATTAAGTGTTCATATGATGCTATTTATACATAGATC  
 2461 CATTAAATAAGTGTACATGAAATGTGGTTTTAAATTAGTTTGCTTCATATTTGTTCTTT

```

2521  TGAACAGGTGAAAACCTATTGGGAATTGTAATGATGATACTAGACATACTGTTTAATTACA
2581  ACATTTAGCCACAAACTTTGCAATGTAAAAATACTTTATTTTCAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
2641  AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

Abb. 39: Nukleotid-Sequenz und abgeleitete Aminosäure-Sequenz des Volllängen-Klons Alt6m42 aus *Chenopodium rubrum*-Zellkulturen (*Accession Number* AAP83934). Der durch RACE-PCR erhaltene Abschnitt ist fett gedruckt. Entweder kursiv oder unterstrichen ist derjenige Teil der Sequenz, der später für die RNA-Interferenz (RNAi) benutzt wurde

### 3.6.1 Genomics und Proteomics von Alt6m42

Der Sequenz-Vergleich des Volllängen-Klons Alt6m42 mit der Nukleinsäure-Datenbank zeigt eine beachtliche Übereinstimmung (70 % identisch, 80 % ähnlich) mit zwei Sequenzen von *Arabidopsis thaliana* (*Accession Number* NP\_199747 Chromosom 5, NP\_563659 Chromosom 1), die zur Glycosyl-Hydrolase-Familie 3 gehören.

Der taxonomische Report der ersten 200 Sequenzen mit Homologie zur abgeleiteten Aminosäure-Sequenz des Klons Alt6m42 aus der *Chenopodium rubrum*-Zellkultur (*Accession Number* AAP83934) ist in Tabelle 10 dargestellt. Hohe Ähnlichkeit des Proteins von *Chenopodium rubrum* mit solchen von anderen Pflanzen (27 Pflanzensequenzen, davon 15 aus *Arabidopsis thaliana*), von Pilzen (37) und von Bakterien (135) konnten festgestellt werden. In weiteren Vergleichen mit den Sequenzen von Genen aus Viren, Insekten, Metazoen und Wirbeltieren wurden aber keine ähnlichen Sequenzen mit *Chenopodium rubrum* gefunden. Nur eine Sequenz eines Archae-bacteriums (*Sulfolobus solfataricus* *Accession Number* AAK43134) weist eine Homologie von 49% mit der Sequenz von *Chenopodium rubrum* auf. Diese Sequenz besitzt Homologie zu verschiedenen  $\beta$ -Xylosidasen und  $\beta$ -Glucosidasen, was daher auch die Aufmerksamkeit auf die Homologie zu der Sequenz des Enzyms  $\beta$ -Xylo-Glucosidase (ausschließlich durch Breves et al. 1997, so bezeichnet) lenkte. Da  $\beta$ -Xylosidase und  $\beta$ -Glucosidasen gleiche Domänen aufweisen, wird das Gen aus *Chenopodium rubrum* als  $\beta$ -Xylo-Glucosidase-Gen bezeichnet.

Tabelle 10: Nach Organismengruppen und Arten geordnete Sequenzen mit Homologie zu der abgeleiteten Aminosäuresequenz der  $\beta$ -Xylo-Glucosidase von *Chenopodium rubrum*

Organismen-Gruppe	Anzahl der Sequenzen pro Organismengruppe	Pflanzen	Sequenz-Anzahl	Sequenz-Anzahl für W <sup>2</sup> H	Homologie mit <i>Chenopodium rubrum</i> in %
Pflanze	27	<i>Arabidopsis thaliana</i>	15	11	80 - 34
		<i>Prunus persica</i>	1		83
		<i>Glycine max</i>	1		61
		<i>Lycopersicon esculentum</i>	2	1	69 - 61
		<i>Oryza sativa</i>	4	3	69 - 37
		<i>Hordeum vulgare</i>	3	2	69 - 41
		<i>Zea mays</i>	1		41
Pilz	37			11	53 - 32
Bakterium	135			38	51 - 42

Im W<sup>2</sup>H-Programm (Version 4, 2001) wurde eine Analyse der in Tabelle 10 aufgeführten Sequenzen durchgeführt, und ein phylogenetisches Kladogramm erstellt (Abb. 40). Dieses zeigt 2 Hauptgruppen (eine mit 46 Sequenzen, die andere mit 106), die ihrerseits wiederum in Untergruppen aufgeteilt sind (Tabelle 10).

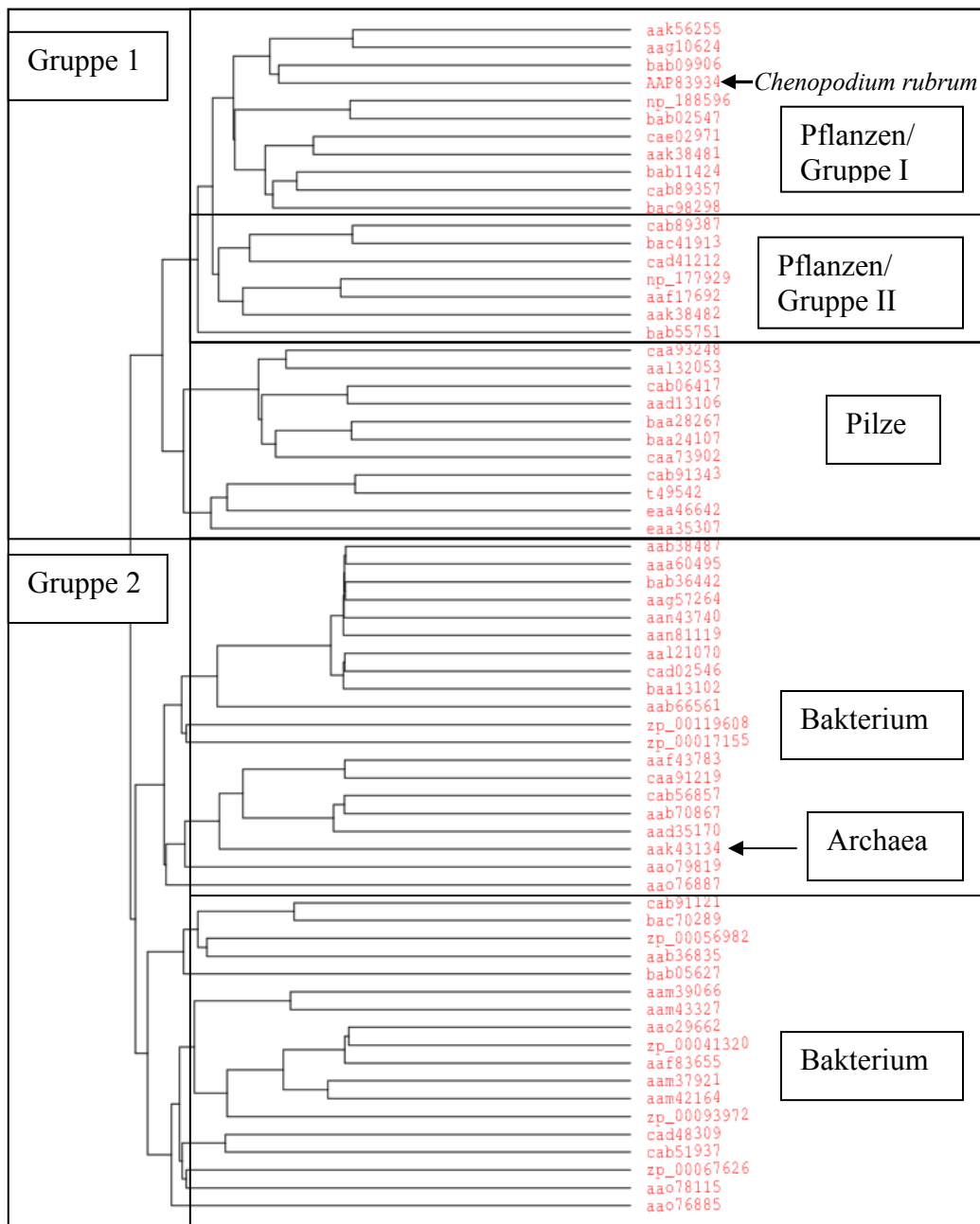


Abb. 40: Kladogramm aus dem Multivergleich (*pileUp*) der abgeleiteten Aminosäuresequenzen bekannter β-Xylo-Glucosidasen.

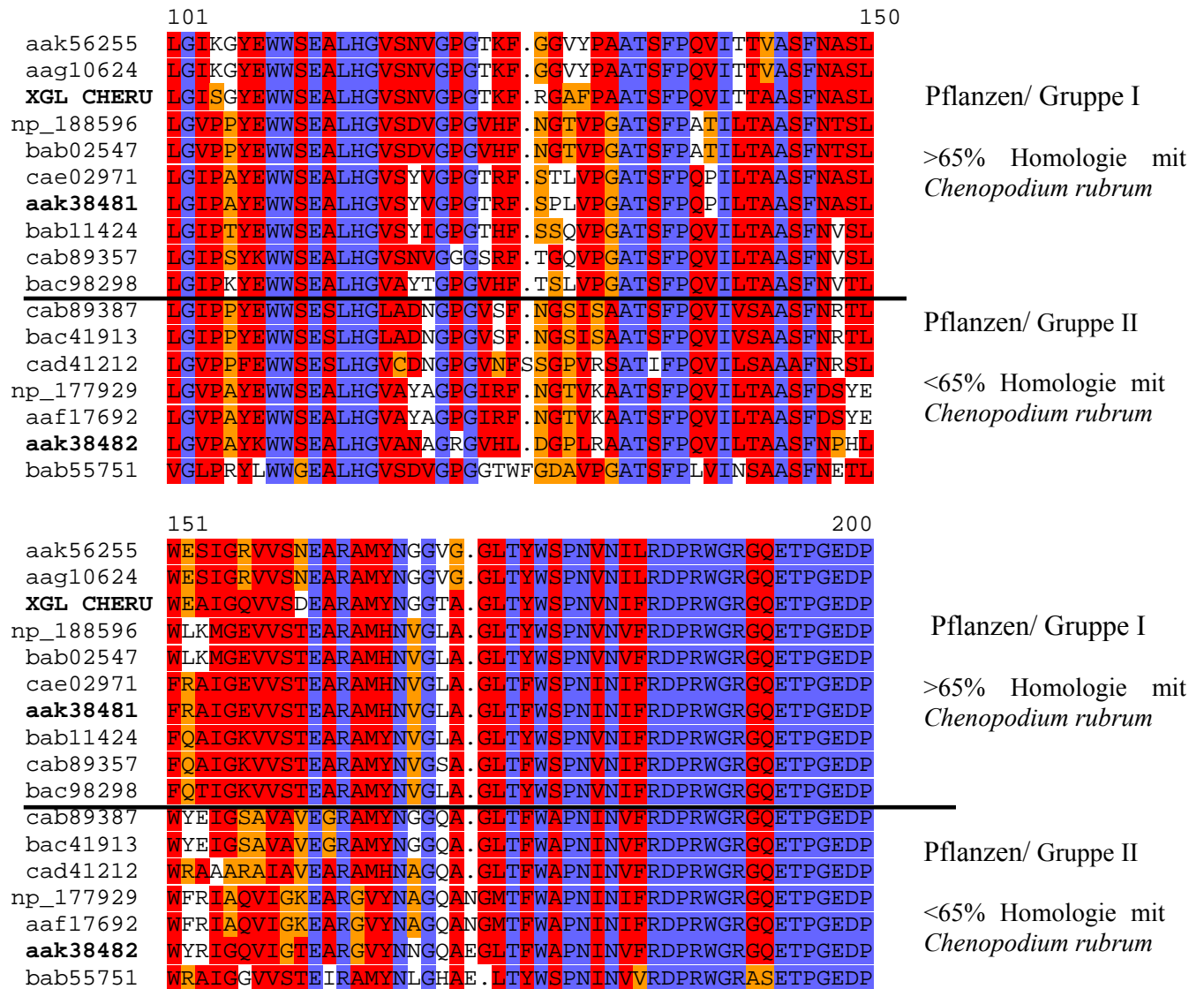


Abb. 41: Multivergleich (*pileUp*) der abgeleiteten Aminosäuresequenzen der *Glycosyl-Hydrolase-Familie 3* der Pflanzen. **Blau**: Identische Aminosäuren, **Rot**: mehr als 50% der Aminosäuren in einer Spalte besitzen starke Ähnlichkeit in ihrer funktionellen Gruppe, **Orange**: mehr als 50% der Aminosäuren einer Spalte besitzen schwache Ähnlichkeit in ihren funktionellen Gruppen. In „fett“: XGL CHERU =  $\beta$ -Xylo-Glukosidase von *Chenopodium rubrum* und die Sequenz des  $\alpha$ -L-Arabinofuranosidase/ $\beta$ -D-Xylosidase Isoenzym aak38481 und  $\beta$ -D-xylosidase aak38482 von *Hordeum vulgare*

Abb. 41 zeigt 2 Hauptgruppen. Zur ersten gehören die  $\beta$ -Xylo-Glucosidase-Sequenzen der Pflanzen und Pilze, zur zweiten die aus Prokaryoten. Jede Gruppe teilt sich in Untergruppen, die im Fall der 1. Hauptgruppe aus Sequenzen der Pflanzen zum einen und denen der Pilze zum anderen bestehen. Innerhalb der Pflanzengruppe gibt es wiederum zwei Untergruppen (Abb. 41).

### 3.6.2 Induktion der Expression des $\beta$ -Xylo-Glucosidase-Gens in *Chenopodium rubrum*-Kulturzellen

Für die  $\beta$ -Xylo-Glucosidase wurde eine Northern Blot-Expressionsanalyse durchgeführt. Abb. 42 zeigt die Induktion durch Auxin (IES) und einen wesentlich schwächeren Effekt von 2,4-D (0,1  $\mu$ M).

K IES 2,4-D



Abb. 42: Northern Blot-Analyse der mRNA von 35 Tage alten *Chenopodium rubrum*-Suspensionskulturzellen nach zweistündiger Behandlung mit IES (0,1  $\mu$ M) (I), 2,4-D (0,1  $\mu$ M) (D). (K), Kontrolle (Gen Alt6m4 als Sonde)

Die Expression von  $\beta$ -Xylo-Glucosidase während der gesamten Wachstumsperiode von *Chenopodium rubrum*-Suspensionszellen wird in Abb. 43 gezeigt. Die Expression wurde auf die Zahl lebender Zellen normiert. Es zeigten sich 2 Expressionsmaxima, eines gegen Ende der Zellteilungsphase, das andere in der späten stationären Phase.

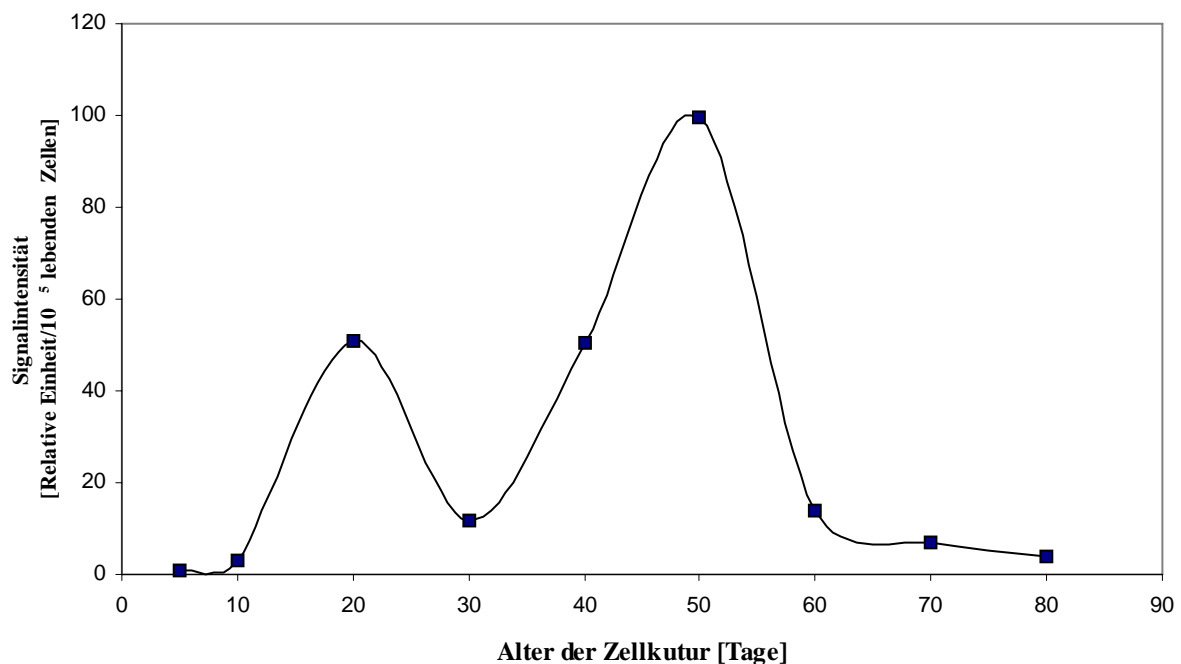


Abb. 43: Auf die Zellzahl normierte Expression der  $\beta$ -Xylo-Glucosidase (entsprechend einer Probe von 47 mg Zell-Frischgewicht) während der gesamten Dauer einer Suspensions-Batchkultur von autotrophen *Chenopodium rubrum*-Zellen

### 3.6.3 Genfunktionsanalyse durch Transformation mit Doppelstrang-RNA - vermittelte RNA-Interferenz (RNAi) von $\beta$ -Xylo-Glucosidase

Mit dem Ziel, die Funktion der  $\beta$ -Xylo-Glucosidase in der Zellkultur von *Chenopodium rubrum* zu untersuchen, wurde eine Loss-of-Funktion-Analyse durch Doppelstrang-RNA vermittelte Gen-Interferenz (RNAi) durchgeführt. Dazu wurde mit Hilfe des p-Hannibal-Vektors ein geeignetes Konstrukt mit dem entsprechenden Intron (pdk) hergestellt (Wesley et al. 2001, Abb. 44). Durch PCR konnten die Sequenzen in beiden Orientierungen erhalten werden. Die Klonierung erfolgte in Sense-Orientierung zwischen den Schnittstellen XhoI und KpnI und in Antisense-Orientierung zwischen XbaI und ClaI. Nachdem das vollständige Konstrukt nachgewiesen war, wurde mit Hilfe der Schnittstelle NotI eine 2. Klonierung im binären Vektor pART27 (Gleave 1992) durchgeführt. Die entsprechende T-DNA, die für die Transformation mit Agrobakterien bzw. durch Partikelbeschuss benutzt wurde, ist in Abb. 45 dargestellt.

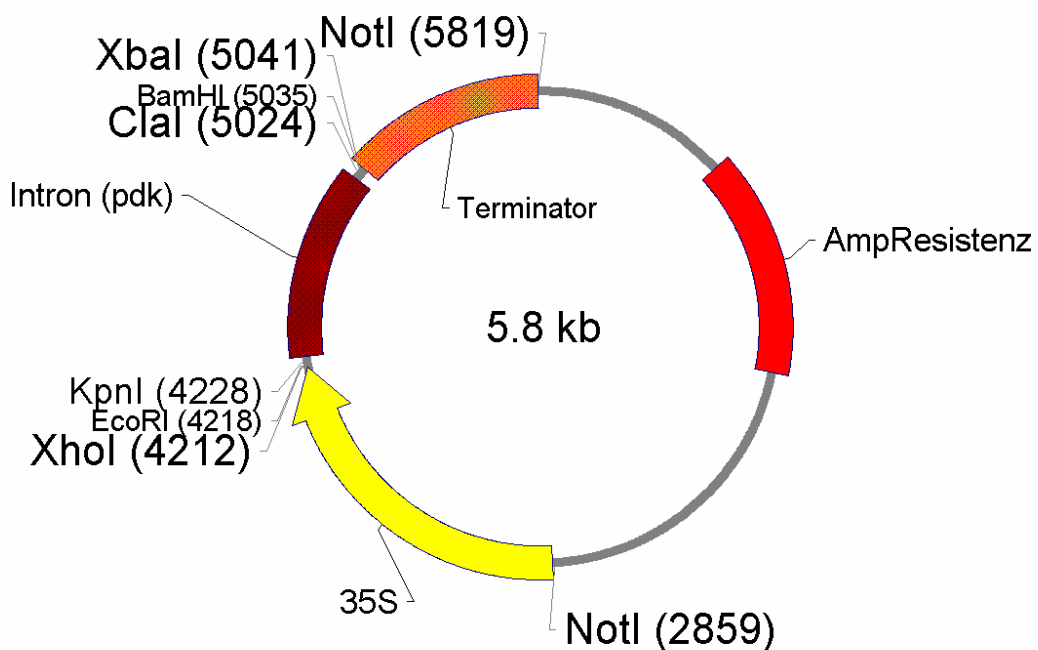


Abb. 44: Schema des zur Klonierung des Sense-Antisense-Konstruktes verwendeten p-Hannibal-Vektors



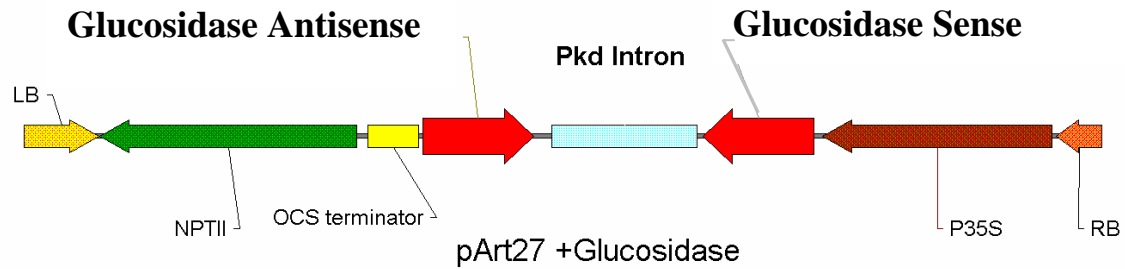


Abb. 45: Schematische Darstellung des T-DNA-Teils des Sense-Antisense-Konstrukts der *C. rubrum* β-Xylo-Glucosidase. Die T-DNA enthält außer dem Gen Alt6m42 (β-Xylo-Glucosidase) (in beiden Richtungen), dem P35S-Promotor, dem OCS Terminator die für die Kanamycin Resistenz notwendige Sequenz NPTII.

### 3.6.4 Bestimmung einer optimalen Kanamycin-Konzentration zur Selektion transgener *Chenopodium rubrum*-Zellen

Das Antibiotikum Kanamycin wird sehr häufig zur Selektion transgener Pflanzen eingesetzt. Dabei muss darauf geachtet werden, dass die Kanamycin-Konzentration die Kapazitäten des transferierten Entgiftungssystems nicht überschreitet. Ziel ist eine Antibiotikum-Konzentration, die alle nicht-transformierten Pflanzenzellen abtötet, während die transformierten nicht am Wachstum gehindert werden.

Es zeigte sich, dass die Kanamycin-Konzentration in der Suspensions-Batchkultur sehr viel kritischer ist als auf Agarplatten. Dies ist wohl auf die langsamere Diffusion des Wirkstoffs aus dem Agar in die Kalli zurückzuführen. Da für *Chenopodium rubrum*-Kulturen noch keine Erfahrungen vorlagen, musste die geeignete Menge an einzusetzendem Kanamycin ermittelt werden. Es wurden *Chenopodium rubrum*-Suspensionskulturen mit unterschiedlichen Kanamycin-Konzentrationen (0 – 100 µg Kanamycin/ml Medium) versetzt und der Aufwuchs der Zellen bestimmt (Abb. 46).

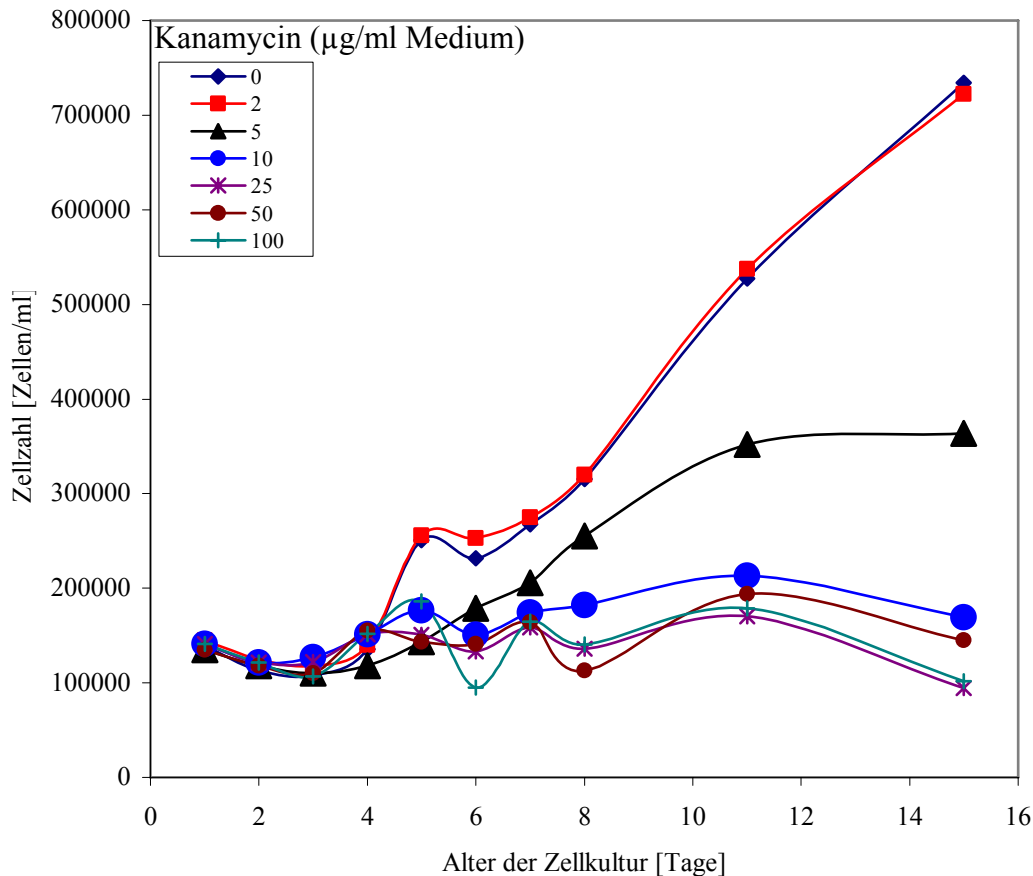


Abb. 46: Aufwuchs (Zellzahl) der *Chenopodium rubrum*-Zellkultur in Gegenwart unterschiedlicher Kanamycin-Konzentrationen

Aus den in Abb. 46 dargestellten Wachstumskurven wurde eine zur Selektion der transformierten Zellen geeignete Kanamycin-Konzentration zwischen 5 und 10 µg Kanamycin pro ml Medium ermittelt. Schließlich wurde eine für die Selektion von transgenen *Chenopodium rubrum*-Zellen geeignete Konzentration von 7,5 µg Kanamycin pro ml MS-Medium gewählt. Auf MS-Agarplatten war eine Konzentration von 25 µg Kanamycin für eine gute Selektion ausreichend.

### 3.6.5 Transformation der *Chenopodium rubrum*-Zellkultur RNAi-β-Xylo-Glucosidase mit Agrobakterium

Mit Agrobakterien (LBA 4404) konnte eine stabile Transformation der Zellkultur mit RNAi-β-Xylo-Glucosidase nur mit heterotrophen *Chenopodium rubrum*-Zellen erreicht werden (Abb. 47A).

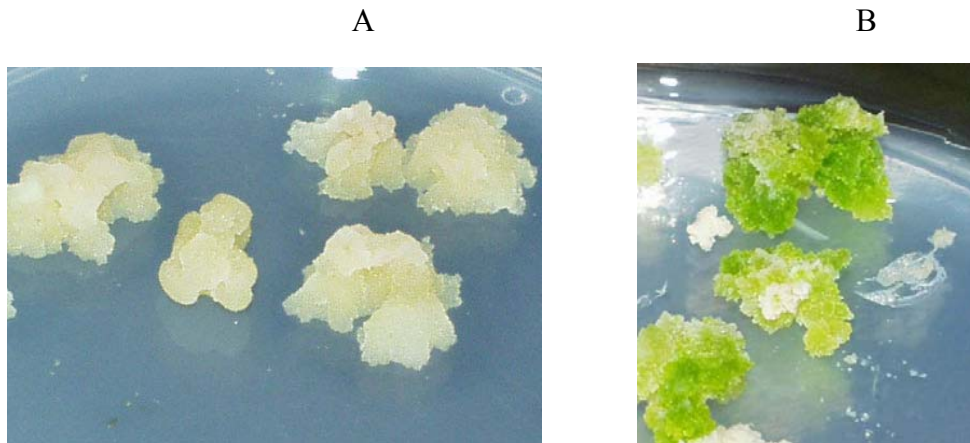


Abb. 47: Transformierte heterotrophe Zellen nach der Selektion mit Kanamycin  
A- Im Dunkeln gehalten. B- In 24 stündigem Dauerlicht nach 3 Wochen.

Der Versuch, aus diesen eine photoautotrophe Zellkultur durch Belichtung und CO<sub>2</sub>-Begasung zu regenerieren, führte nur bis zur Stufe der photomixotrophen Zellen (Abb. 47B). Suspensionskulturen ließen sich davon nicht herstellen.

Nach Transformationen von photoautotrophen Zellen mit dem Agrobakterium konnten nur nicht lebensfähige Transformanten erzielt werden. Jedoch starben die RNAi transformierten Zellen immer im früheren Alter als die Kontrollen, die nur mit dem Vektor oder mit einem anderen stoffwechsel-inerten Gen (z.B. mit dem GFP-Gen) transformiert wurden (Abb. 48).

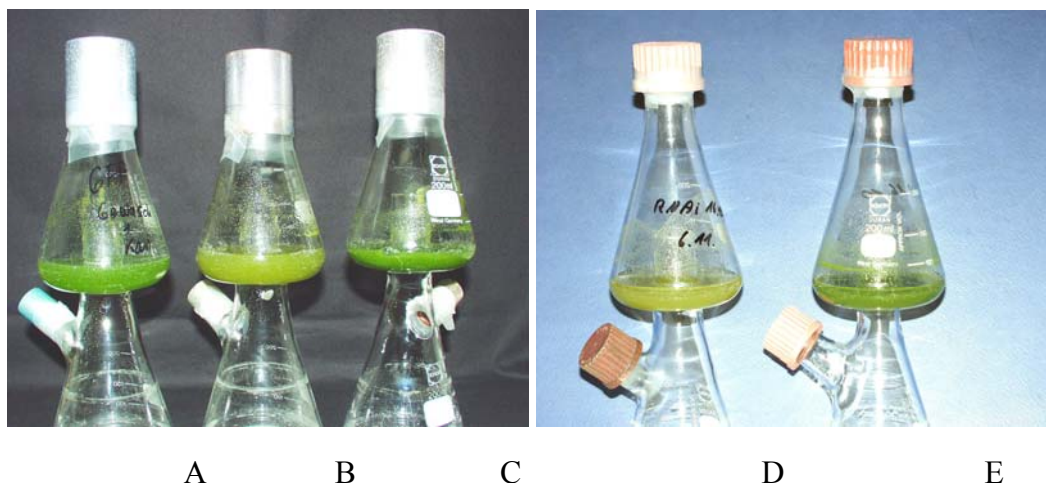


Abb. 48: Suspensionskultur von *Chenopodium rubrum*-Zellen im Alter von 30 Tagen. Nicht transformierte und transformierte sowie mit Kanamycin selektierte. Kolben A: Zellkultur mit GFP transformiert, Kolben B und D: Zellkultur mit RNAi von  $\beta$ - Xylo-Glucosidase

transformiert, Kolben C: nicht transformierte Zellkultur und Kolben E: nur mit dem leeren Vektor pArt27 transformierte Zellkultur.

Die gelbliche Verfärbung, ein Merkmal alternder Zellen (Peters et al. 2000), ist deutlich zu erkennen. Das Ergebnis konnte nicht weiter konkretisiert werden, da keine lebensfähige Kultur der transformierten Zellen erzielt werden konnte.

### 3.6.6 Herstellung stabiler Transformanten durch Partikelbeschuss

Um möglicherweise doch eine stabile Transformation zu erzielen wurde die Partikel-Beschuss-Methode angewandt. Ein die Kanamycin-Resistenz tragendes Plasmid, das zusätzlich das GFP enthielt, wurde zum Beschuss verwendet. Abb. 49 zeigt die GFP-Fluoreszenz von heterotrophen, sowie photoautotrophen Kalli der durch Partikelbeschuss erzielten Transformanten.

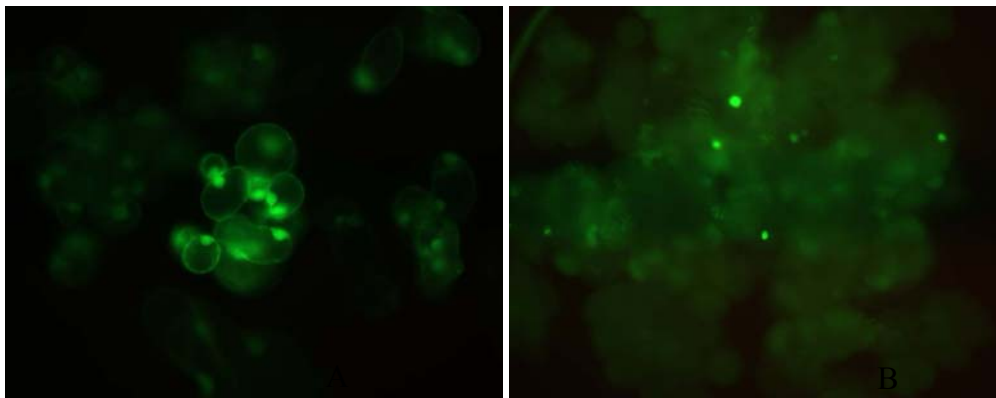


Abb. 49: Durch Partikelbeschuss transformierte Kalli von *Chenopodium rubrum*:

A- heterotrophe Zellen und B- autotrophe Zellen. Der Erfolg wird durch die Fluoreszenz des GFP nachgewiesen.

Die Transformation mit dem T-DNA-Sense-Antisense-Konstrukt wurde mit Kalli von *Chenopodium rubrum* durch Partikelbeschuss durchgeführt (Abb. 45). Als Kontrolle diente ein Plasmid ohne T-DNA-Sense-Antisense. Eine Woche nach dem Beschuss wurden die Kalli erstmalig selektiert, d.h. auf eine MS-Glucose-Agarplatte mit Kanamycin übertragen. Die aufwachsenden Kalli mit Antibiotika-Resistenz wurden erneut auf eine MS-Glucose-Agarplatte mit Kanamycin transferiert. Die Kalli, die nach dem zweiten Selektions-Schritt übrig blieben, wurden in einer Suspensions-Batchkultur überimpft. So ergaben sich zwei transgene Zelllinien: Eine Kanamycin-resistente  $\beta$ -Xylo-Glucosidase- RNAi-Linie (XGRNAi) und eine mit dem leeren Vektor aber mit Kanamycin-Resistenz (VKanR). Zur

Charakterisierung des Phänotyps der transformierten Linien wurde die Wachstumskinetik anhand der Zellzahl bestimmt (Abb. 52).

### 3.6.7 Kontrolle der RNAi in Pflanzenzellen mittels PCR

Um die Integration der T-DNA in das Genom der *Chenopodium rubrum*-Kulturzellen festzustellen, wurde eine PCR-Analyse durchgeführt.

Die PCR-Analyse wurde mit der genomischen DNA von transformierten *Chenopodium rubrum*-Zellen (XGRNAi) durchgeführt. Zur Kontrolle wurde die DNA aus Wildtyp-*Chenopodium rubrum*-Zellen sowie aus VKanR-Zelllinien benutzt. Als Primer wurde die genspezifischen Primer und Primer der Bereiche des 35S-Promotors verwendet. Die Ergebnisse der PCR-Analyse zeigen, dass die Transformation erfolgreich war (Abb. 50).

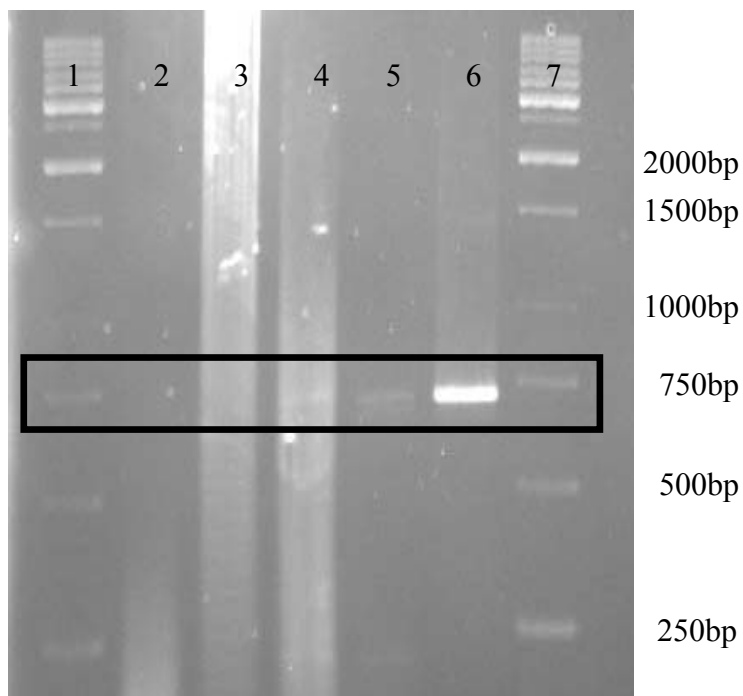


Abb. 50: Gelelektrophorese der PCR-Produkte zum Nachweis der Fremd-DNA in den transformierten Zellen. Bahn 1 und 7: GeneRuler™ 1Kb Ladder; Bahn 2: Wildtyp von *Chenopodium rubrum*; Bahn 3: VKanR-Zelllinien; Bahn 4: XGRNAi-Zelllinien; Bahn 5: Erneute PCR des Produktes aus Bande 4; Bahn 6: reines RNAi-Plasmid (pArt27 + Glucosidase RNAi)

Abb. 50 zeigt die Gelelektrophorese der PCR-Kontrolle mit genomischer DNA aus den beiden 80 Tage alten transformierten Zelllinien und den Zellen des 30 Tage alten Wildtyps.

Sowohl in der zweiten als auch in der 3. Bahn ist kein PCR-Produkt zu erkennen. Bei der Verwendung des Plasmids pArt27 mit  $\beta$ -Xylo-Glucosidase-RNAi, des Primers für CaMV 35S sowie der genspezifischen Primer wurde die erwartete Größe des PCR-Produktes von ca. 703 bp beobachtet (Spur 6). Ein gleich großes PCR-Produkt ist in den Spuren 4 und 5 schwach sichtbar, wobei dieses sich in Spur 4 auf die genomische DNA der XGRNAi-Zelllinien bezieht. In der Spur 5 wurde das aus der Spur 4 erhaltene PCR-Produkt für eine nochmalige PCR-Analyse verwendet, um zu überprüfen, ob dieses das gesuchte war und um gleichzeitig das Signal zu verstärken. Dieses Ergebnis zeigt, dass die T-DNA in den Zellen der transformierten Zellkultur von *Chenopodium rubrum* vorhanden ist.

### 3.6.8 Untersuchung des Phänotyps der XGRNAi-Mutante der *Chenopodium rubrum*-Zellkultur

In Abb. 51 beobachtet man, dass die Zellen, die mit RNAi der  $\beta$ -Xylo-Glucosidase transformiert wurden, nach mehreren Generationen keine Möglichkeiten mehr haben, sich weiter zu entwickeln.

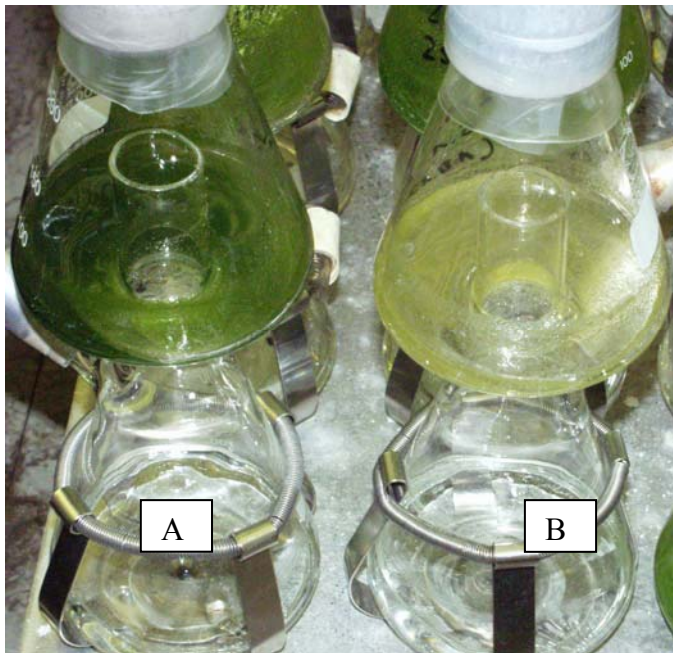


Abb. 51: Suspensionskultur von *Chenopodium rubrum*-Zellen im Alter von 28 Tagen nach mehreren Generationen. Kolben A: VkanR, Kolben B: XGRNAi

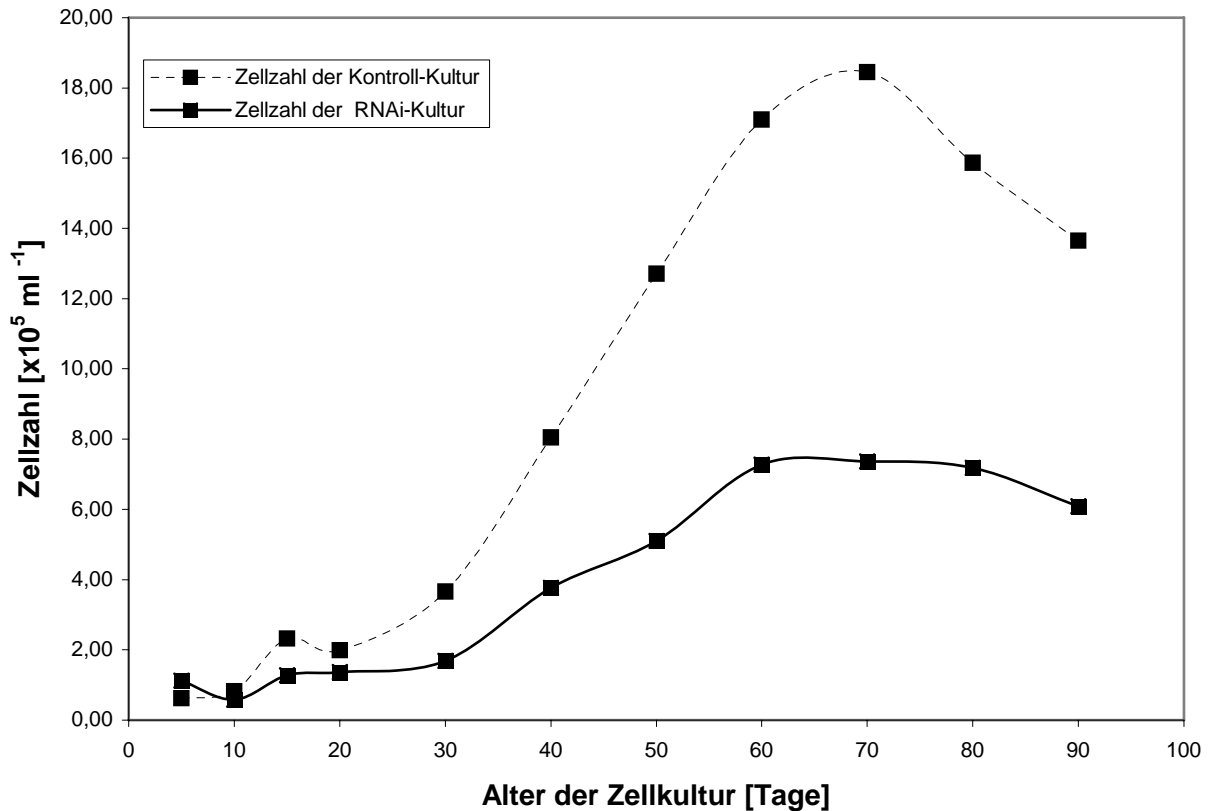


Abb. 52: Die Entwicklung der Zellkultur mit dem leeren Vektor (mit Kanamycin-Resistenz als Kontroll-Kultur) und der  $\beta$ -Xylo-Glucosidase-RNAi transformierten *Chenopodium rubrum* - Suspensionszellen.

Die Abb. 52 zeigt die Wachstumskinetik der beiden Transformanten von *Chenopodium rubrum* im Verlauf von 90 Tagen. Im Kurvenverlauf zeigt sich der Unterschied zwischen beiden Transgenen (VKanR und XGRNAi), wobei am Anfang der Wachstumsperiode, in der sogenannten Zellteilungsphase, deutliche, aber keine großen Unterschiede erkennbar sind. Der Unterschied in der Zellzahlentwicklung wuchs besonders nach dem 30. Tag deutlich an. Maximale Unterschiede in der Zellzahl zwischen beiden Zelllinien traten zwischen 50 und 70 Tagen auf. Wie die Anfangswerte der Wachstumskurve zeigen, wurde die Suspensionskultur der RNAi-Zellen mit einem doppelten Inoculum gestartet. Allerdings gilt für beide Transformanten-Linien, dass die Zellteilungsphase enorm verlängert ist (Zunahme der Zellzahl bis zum 60. und 70. Tag).

Ein Vergleich der bekannten Merkmale wie z.B. der Zellzahl des Wildtyps (Abb. 7) und der XGRNAi-Linie ist nicht möglich, da die XGRNAi-Transformante in der

Suspensions-Batchkultur nach einigen Generationen ihre Lebensfähigkeit verloren hat und ihre Überimpfung von Kallus ausgehend neu beginnen muss.

Die Teilungsfähigkeit der XGRNAi-Linie wurde nach Übertragung der Zellen eines Alters von 50 Tagen überprüft. Der negative Effekt des RNAi auf die Teilungsfähigkeit der Zellen ist in Abb. 53 dargestellt. Es ist ersichtlich, dass es nicht möglich ist, die Zellen der XGRNAi mit einem Alter von 50 Tagen noch einmal zur Teilung zu bringen. Das kann man im Vergleich zur nicht transformierten Zellkultur als frühes Altern bezeichnen. Daraus kann man schließen, dass die  $\beta$ -Xylo-Glucosidase-Teilungsfähigkeit alternder Zellen in der Alterungsphase essentiell ist. Dieser Alterungsprozess wurde nur in autotrophen Zellen der Flüssigkultur beobachtet, während die transformierten Kalli immer wieder zum Starten einer neuen Suspensionskultur verwendet werden können.

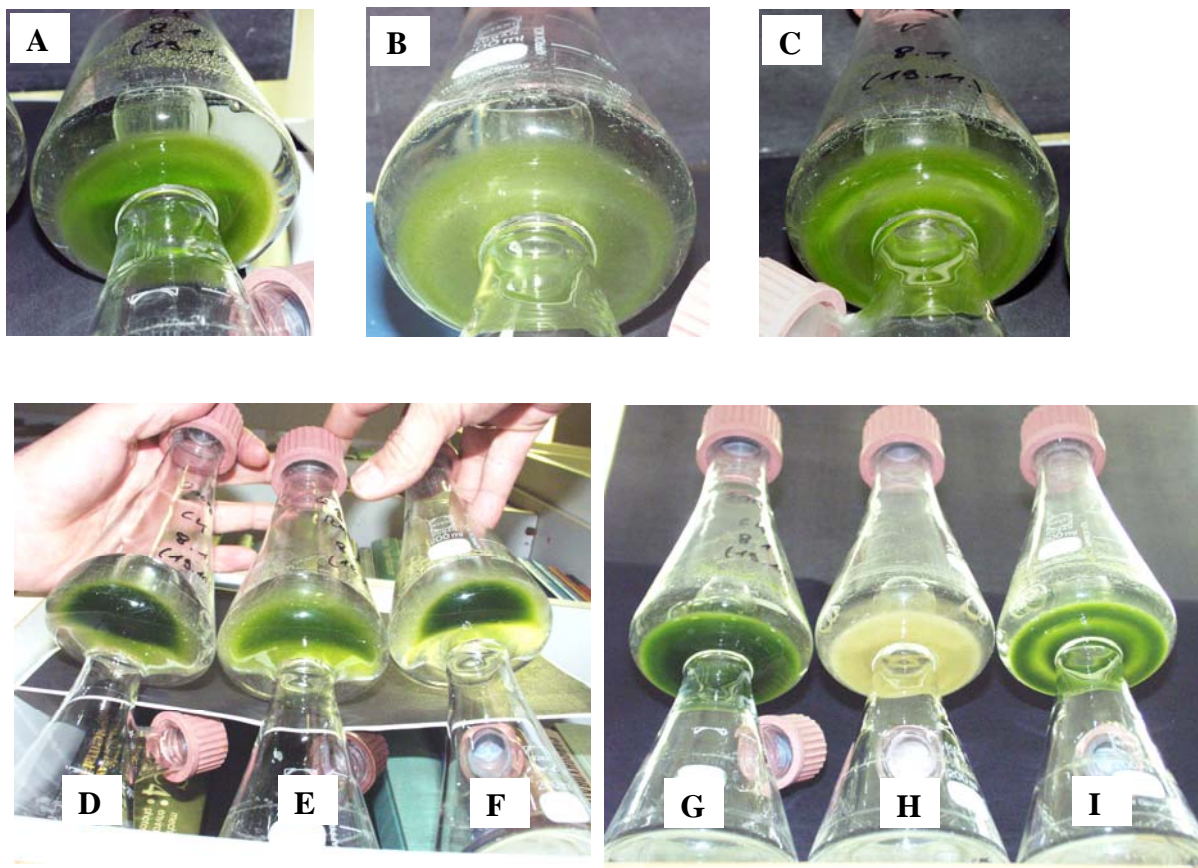


Abb. 53: Suspensionskultur von *Chenopodium rubrum*-Zellen im Alter von 5 (A,B und C), 10 (D,E und F) und 28 (G,H und I) Tagen Übertragung in frisches Medium im Alter von 50 Tagen. Kolben A,D und G: Wild-Typ von *Chenopodium rubrum*-Zellkultur, Kolben B,E und H: XGRNAi, Kolben C,F und I: VkanR.



### 3.6.9 $\beta$ -Xylo-Glukosidase von *Chenopodium rubrum*

Die  $\beta$ -Xylo-Glukosidase von *Chenopodium rubrum* gehört zur Familie 3 der Glycosyl-Hydrolasen. Aus dieser Familie sind bis heute folgende Enzyme bekannt:  $\beta$ -Glucosidase (EC 3.2.1.21), Xylan-1,4- $\beta$ -Xylosidase (EC 3.2.1.37),  $\beta$ -N-Acetylhexosaminidase (EC 3.2.1.52), Glucan-1,3- $\beta$ -Glucosidase (EC 3.2.1.58), Glucan-1,4- $\beta$ -Glucosidase (EC 3.2.1.74), Exo-1,3-1,4-Glucanase (EC 3.2.1.-),  $\alpha$ -L-Arabinofuranosidase (EC 3.2.1.55) ([http://afmb.cnrs-mrs.fr/CAZY/GH\\_3.html](http://afmb.cnrs-mrs.fr/CAZY/GH_3.html)).

Die  $\beta$ -Glucosidasen werden nach der Ähnlichkeit in den Aminosäuresequenzen (Henrissat 1991, Henrissat und Bairoch 1993, Coutinho und Henrissat 1999) klassifiziert und gehören entweder zur Glycosyl-Hydrolase-Familie 1 (GHF1) mit einer Molekularmasse von ca. 50 kDa oder zur Glycosyl-Hydrolase-Familie 3 (GHF3), für welche eine Molekularmasse von ca. 80 kDa charakteristisch ist. Die GHF3-Enzyme besitzen sowohl  $\beta$ -Xylosidase- als auch  $\beta$ -Glucosidase-Aktivität (Breves et al. 1997). Die  $\beta$ -Glucosidasen vom Typ GHF3 (zu der auch die  $\beta$ -Xylo-Glukosidase von *Chenopodium rubrum* gehört) zeigen einen Aufbau aus zwei Domänen: eine N-terminale - katalytische Domäne (A) - und eine C-terminale – nicht-katalytische, aber essentielle Domäne (B) (Faure et al. 2001) (Abb. 55). Dieser aus den Modulen AB bestehende Aufbau ist der häufigste Typ. Der inverse BA-Aufbau ist weniger häufig und wurde von Lemesle-Varloot et al. 1990; Vroemen et al. 1995; Faure et al. 1999 beschrieben.

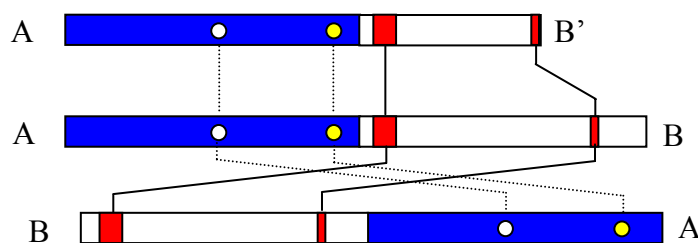


Abb. 54: Schematische Darstellung des Aufbaus der  $\beta$ -Glucosidasen aus den Domänen A und B (Modulen). A ist die katalytische, B die nicht-katalytische, gleichwohl aber essentielle Domäne. Gelber Kreis: Position des katalytischen Aspart-Restes, weißer Kreis: Position des putativen katalytischen Aspart-Restes (siehe auch Pfeil in Abb. 55 und Abb. 56), rot markiert sind die konservierten Domäne.

Nach Breves et al. (1997) existieren in der  $\beta$ -Xylo-Glucosidase (XglS) von *Thermoanaerobacter brockii* (Accession Number CAA91219) (46% Homologie mit *Chenopodium*- $\beta$ -Xylo-Glucosidase) zwei Motive, die konserviert und im aktiven Teil des Enzyms lokalisiert sind (Abb. 54).

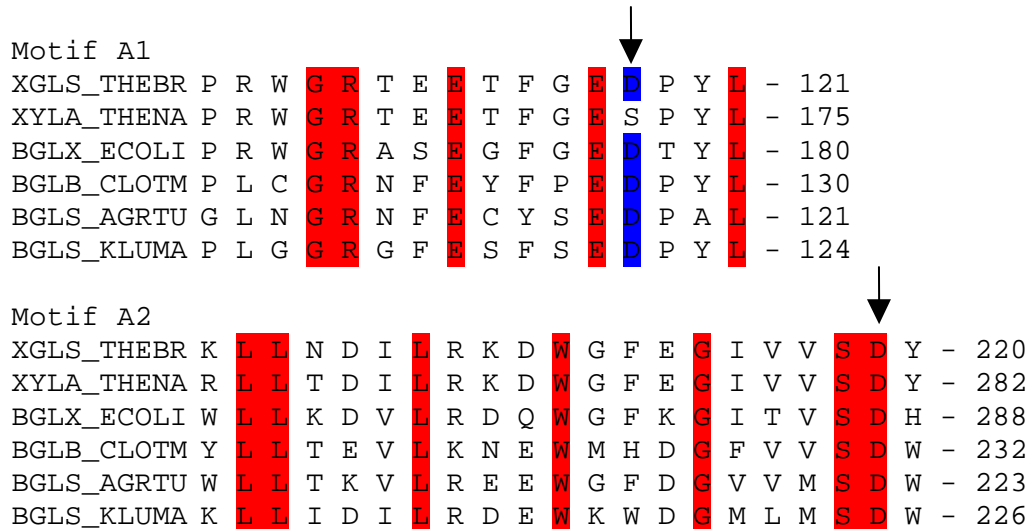


Abb. 55: Vergleich der konservierten Motive in der A-Region der XglS von *Thermoanaerobacter brockii*, XylA von *Thermotoga neapolitana* (U58632), BglX of *E. coli* (P33363), BglB of *C. thermocellum* (P14002), BglS von *Agrobacterium tumefaciens* (P27034), und BglS von *Kluyveromyces marxianus* (P07337). Der in allen Arten vorkommende konservierte katalytisch bedeutsame Rest, die Asparaginsäure, ist mit einem Pfeil gekennzeichnet (Breves et al.1997).

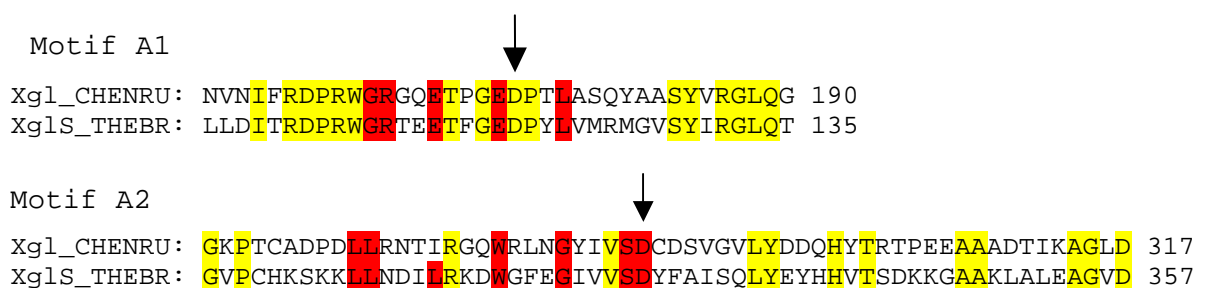


Abb. 56: Vergleich der  $\beta$ -Xylo-Glucosidase von *Chenopodium rubrum* mit den Regionen A1 und A2 von *Thermoanaerobacter brockii* (Breves et al. 1997). Der konservierte, katalytisch wichtige Teil, die Asparaginsäure, ist mit einem Pfeil gekennzeichnet. In Rot sind die Aminosäuren gekennzeichnet, die im Vergleich mit der  $\beta$ -Xylo-Glucosidase von *Thermoanaerobacter brockii* (Breves et al. 1997) in Rot übereinstimmen (Abb. 55). In Gelb sind die Aminosäuren gekennzeichnet, die in beiden Sequenzen identisch sind.

Abb. 56 zeigt, dass die  $\beta$ -Xylo-Glucosidase von *Chenopodium rubrum* im Motiv A2 an der Position 287 Asparaginsäure (Pfeil) als potenziell katalytisches Zentrum besitzt. In der Domäne A1 wurden die konservierten Reste des Aspartat und Glutamat als konservierte Aminosäuren identifiziert, die offensichtlich für die Glycosyl-Hydrolase-Aktivität notwendig sind (McCarter und Withers 1994; Vroemen et al. 1995).

Die physiologische Funktion der  $\beta$ -Xylo-Glucosidase von *Chenopodium rubrum* ist noch unbekannt. Zu klären bleibt, ob das Enzym wirklich  $\beta$ -Xyloside und  $\beta$ -Glucoside hydrolysiert, ob es Polymere oder niedermolekulare Glycoside hydrolysiert und warum es für die Zellteilung notwendig ist.

### 3.6.10 $\beta$ -Xylo-Glukosidase-Expression in der *Chenopodium rubrum*-Zellkultur

#### Auxin-Induktion

Die  $\beta$ -Xylo-Glucosidasen von *Chenopodium rubrum* wurde nach IES-Gabe verstärkt exprimiert. Bisher liegt für die Responsivität einer Glycosyl-Hydrolase auf Auxin nur ein Bericht über ein Enzym von *Pinus pinaster* aus der Glycosyl-Hydrolase-Familie 31 vor, in dem ein Ansteigen des Transkriptes in den ersten 90 Minuten sowie eine Zunahme der Enzymaktivität bis zu 3 Stunden nach der Behandlung mit IES nachgewiesen wurde. Beides, Transkript und Aktivität, nehmen später wieder ab, bleiben jedoch über dem Niveau des nichtbehandelten Materials (Sanchez et al. 2003). Außerdem fand Campos et al. (1993), dass P60 eine  $\beta$ -Glucosidase aus Mais, (Glycosyl-Hydrolase-Familie 1) Auxin binden kann. IES und NAA sowie Naphthylphthalat (Inhibitor des Auxintransportes) hemmen die Aktivität der  $\beta$ -Glucosidase. Im Gegensatz dazu hatten Analoga des Auxins, wie z. B. L-Tryptophan, 5-Hydroxy-IES oder aromatische Verbindungen wie die Benzoesäure keinerlei Auswirkungen auf die Aktivität des P60. Andere Experimente demonstrierten, dass P60 leicht Indoxyl-O-Glucoside hydrolysiert (Campos et al. 1993). Diese Aktivität scheint sehr spezifisch zu sein, denn P60 kann keine anderen IES-Konjugate wie z. B. IES-myo-Inositol oder IES-Aspartat hydrolysieren (Schell et al. 1993).

### 3.6.11 Expression der $\beta$ -Xylo-Glucosidase von *Chenopodium rubrum* in der Seneszenzphase

Die Expression von  $\beta$ -Xylo-Glucosidase von *Chenopodium rubrum* ist am stärksten in der stationären Phase und erlischt während der Alterungsphase. Yoshida et al. (1998, 2001) beschrieben eine  $\beta$ -Glukosidase, die mittels Differential Display in *Arabidopsis*-Blättern in

unterschiedlichen Seneszenzstadien gefunden wurde: Im letzten Stadium der Seneszenz (nur noch 21% Restgehalt an Chlorophyll gegenüber einem adulten Blatt) wurde eine hohe Gen-Expression von YSL1, einer  $\beta$ -Glucosidase, festgestellt. Solch eine Expression wurde nicht in jungen und adulten Blättern sowie nicht in Blättern der frühen Seneszenzphase (Blätter mit 56 % Chlorophyll) gefunden. Eine andere  $\beta$ -Glucosidase von *Arabidopsis thaliana* (Fujiki et al. 1997) wurde ebenfalls bei Dunkelheit (Fujiki et al. 2001) sowie durch Zuckermangel (Fujiki et al. 2000) induziert. Bei der natürlichen Seneszenz hatte diese  $\beta$ -Glucosidase ihre größte Expression in Blättern, deren Fläche einen gelben Anteil von mehr als 75% hatte. Allerdings handelte es sich dabei um ein Enzym der Glucosyl-Hydrolase-Familie 1.

Ruperti et al. (2002) fand ein Gen (PpAz152) in *Prunus persica* (AAM00218), welches eine  $\beta$ -Xylosidase codiert. Diese  $\beta$ -Xylosidase gehört zur Glycosyl-Hydrolase Familie 3, welche in der Abszissionszone durch Ethylen induziert, und nur in Blättern mit mittlerer und fortgeschrittener Seneszenz exprimiert wird. Die Ähnlichkeit der  $\beta$ -Xylosidase in *Prunus persica* mit der von *Chenopodium rubrum* beträgt 83 %. Ruperti et al. (2002) berichten, dass dieses Enzym eine besonders starke Expression in überreifen Früchten zeigt und Ähnlichkeiten zum Klon JPPXYL besitzt, der eine  $\beta$ -Xylosidase der japanischen Birne (*Pyrus pyrifolia*) ist (Yamaki und Kakiuchi, 1979). Das Gen wird in reifenden Früchten stark exprimiert (Itai et al. 1999). Auch in reifenden Tomaten wurde eine  $\beta$ -Xylosidase (LeXYL1 Accession Number BAC98298 und LeXYL2 Accession Number BAC98299) gefunden, die mit dem Enzym von *Chenopodium rubrum* 70% Homologie hat (Itai et al. 2003). LeXYL2 wird relativ stark während der Fruchtentwicklung exprimiert, nicht aber während des Reifungsprozesses. Gegenätzlich verhält sich LeXYL1, das zur gleichen Gruppe wie das *Chenopodium*-Enzym (Pflanzen I) gehört. LeXYL1 wird während der Fruchtentwicklung nicht exprimiert, dafür aber später, und besonders im überreifen Zustand der Früchte. Aus diesen Ergebnissen sowie aus der verstärkten Expression in der letzten Seneszenzphase schlussfolgerten Itai et al. (1999), dass diese  $\beta$ -Xylosidase Zellwand-gebunden ist und dort die Hemicellulose abbaut. Ruperti et al. (2002) vermuteten, dass das Gen PpAz152 am Metabolismus der Zellwand während der Seneszenz beteiligt ist.

### 3.6.12 Transformation mit Hilfe des Partikelbeschusses von RNAi

Bei der Analyse des Verhältnisses beider Transgene wurde nach 50 Tagen im Phenotyp mit dem Gen  $\beta$ -Xylo-Glucosidase 2,49 mal weniger Zellen beobachtet als im Transgen mit dem leeren Vektor. Dieses Verhalten war zu erwarten, weil die Genexpression am 50. Tag am stärksten ist (Abb. 43).

Man könnte sich vorstellen, dass die langsam alternden Pflanzenzellen das Spaltprodukt (Aglucon) eines  $\beta$ -Glucosids zur Alterungsverzögerung brauchen. Da in diesen Zellen der Spiegel der freien Cytokinine sehr niedrig, der der Cytokinin-O-glucoside aber hoch ist (Peters et al. 2000) wären die Cytokininglucoside ein potentielles Target der  $\beta$ -Xyloglucosidase. Eine Anhebung des Spiegels an freien Cytokinin könnte in der Tat alterungsverzögernd wirken.

Auch im Tierreich hat man  $\beta$ -Glucosidasen gefunden (ebenfalls der Glukosyl-Hydrolase-Familie 1), die mit der Alterung in Zusammenhang stehen (Kuro-o et al. 1997, Yahata et al. 2000). Ein Beispiel dafür ist das Produkt des *Klotho*-Gens, welches eine  $\beta$ -Glucosidase codiert, die derjenigen in Bakterien und Pflanzen ähnelt. Takahashi et al. (2000) demonstrierten vorzeitiges Altern von Maus-Mutanten, die dieses *Klotho*-Gen nicht exprimierten. Es wurde vermutet, dass es sich bei dieser Glucosidase um einen „Master“-Gen für die tierische Seneszenz handelt (Kuro-o 2001).

Bei transgenen Mäusen führt die Unterdrückung der „Klotho“- $\beta$ -Glucosidase zur signifikanten Verkürzung der Lebensspanne (Yamashita et al. 1998, Kuro-o 2001, Kashimada et al. 2002). Hinweise auf einen ähnlichen Effekt sieht man bei den Xyloglucosidase-RNAi-Transformanten der *Chenopodium rubrum*-Zellkultur. Allerdings muss angemerkt werden, dass es sich bei beiden Enzymen um verschiedene Klassen der  $\beta$ -Glucosidasen handelt, so dass eine direkte Übertragung der biologischen Bedeutung vom Tier- auf das Pflanzensystem zumindest problematisch ist.

In der Einleitung wurde auf die Möglichkeit eingegangen, dass in den ersten vier Wochen der stationären Phase die Zellen durch Übertragen in frisches, 2,4-D-haltiges Nährmedium erneut zur Teilung angeregt werden können. In Abb. 57 beobachtet man, dass nach dem Übertragen in frisches, 2,4-D-haltiges Nährmedium nach 44 Tagen immer noch eine, wenn auch deutlich verzögerte, Entwicklung möglich ist (Peters et al. 2000).

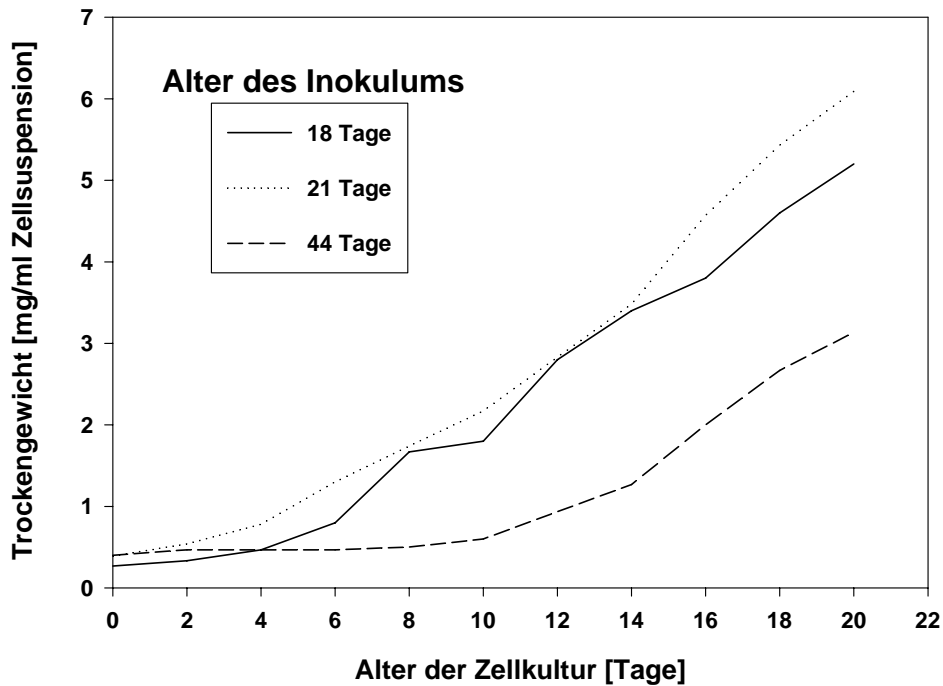


Abb. 57 Wachstumskinetik (Trockengewichtszunahme) in *Chenopodium rubrum*-Kulturzellen, die mit einem Inokulum von  $4 \times 10^6$  Zellen von Kulturen verschiedenen Alters übertragen wurden (Peters et al. 2000).

Die fortschreitende Alterung der Zellen verhindert die Wiedererlangung der Teilungsfähigkeit. Es gibt einen „Point of no return“ im Leben dieser Zellen, der von Peters et al. (2000) als irreversibles Altern charakterisiert wurde. Dieser beginnt ab dem 60. Tag und kann durch keine Art von Hormonbehandlung aufgehalten werden.

In Zellen mit einer „Herunterregulierung“ oder sogar „knock-down-effekt“ der  $\beta$ -Xylo-Glucosidase wird der „Point of no return“ früher erreicht, als in Zellen des „Wild-Typs“ und der VkanR-Linie, da die Teilungsfähigkeit der Zellen bereits am 50. Tag verlorengegangen ist.

#### 4 SCHLUSSBETRACHTUNG

Um zellbiologische Prozesse und ihre Regulation verstehen zu lernen, empfiehlt es sich, die Genexpression in definierbaren Phasen der Entwicklung zu verfolgen und dadurch auch Hinweise auf das Zusammenspiel von aktivierenden und reprimierenden Faktoren zu erhalten. Viele derartige Untersuchungen wurden mit Hefe, mit *Caenorhabditis elegans* und mit *Drosophila melanogaster* durchgeführt; bei Pflanzen ist *Arabidopsis thaliana* das am besten untersuchte Modell. Jedoch eignete sich diese *Arabidopsis thaliana* wegen ihrer Wuchsform, ihrer geringen Größe und wegen der Schnelligkeit ihrer Entwicklung bzw. ihrer Kurzlebigkeit keineswegs für das Studium aller zellbiologischen Prozesse von Pflanzen. Ein Beispiel dafür ist die Kurzlebigkeit der Rosettenblätter, deren frühzeitig einsetzende Sequenz und deren raschem Verlauf den Übergang zwischen Wachstum und Seneszenz nur unscharf erkennen lassen. Bei der Kurzlebigkeit der ganzen Arabidopsis-Pflanze wird auch die Sequenz der Rosettenblätter von der Sequenz der ganzen Pflanze physiologisch überlagert (Hensel et al. 1993). Zellkulturen bieten sich für das Studium bestimmter ontogenetischer Prozesse von Pflanzen an; jedoch ist die bei weitem überwiegende Mehrzahl derartiger Zellkulturen heterotroph und ebenfalls kurzlebig. Eine langlebige, autotroph wie heterotroph wachsende Zellkultur, wie die von *Chenopodium rubrum*, ist hingegen für derartige Studien hervorragend geeignet und bereits als Modellsystem für die Blattentwicklung beschrieben (Peters et al. 2000).

Als die Entwicklung dieser Zellkultur regulierende Größe wurde der Ernährungszustand der Zellen ausgemacht, der über endogene Phytohormonspiegel die Transkription regulatorischer Gene steuert (Peters et al. 2000, Fountain et al. 2003). In dieser Hinsicht waren das Cytokininspektrum dieser Zellen und die Ethylenproduktion über den ganzen Verlauf einer Suspensions-Batchkultur im Detail untersucht wurden. Die vorliegende Arbeit ergänzt diese Studien durch die Untersuchung der Phytohormongruppe der Auxine, zu deren Synthese die Zellen offensichtlich einen exogenen Stimulus in Form des künstlichen Auxins 2,4-D benötigen.

Ähnlich den Cytokininen und dem Ethylen steigt der Gehalt an endogener IES in der Anfangsphase (Tage 1-4) deutlich an, fällt danach aber schneller als dies bei den anderen Phytohormonen der Fall ist noch während der Teilungsphase wieder auf den Anfangswert zurück. Im Gegensatz zu den „aktiven“ Cytokininen und dem Ethylen nimmt die endogene Auxinkonzentration in der stationären Phase vorübergehend nochmals zu, fällt zum Beginn der Seneszenz wieder ab, steigt aber in deren Schlussphase erneut deutlich an; letzterer

Anstieg hängt mit der Freisetzung von 2,4-D aus den Vakuolen absterbender Zellen zusammen, welche die noch lebenden Zellen zu erneuter Auxinsynthese veranlassen.

Nachdem in einer früheren Arbeit ein Zusammenhang zwischen dem endogenen Auxinspiegel und der Expression einiger Gene der Zellzykluskontrolle gezeigt werden konnte (Fountain et al. 2003), interessierte vor allem, welche Gene spezifisch durch Auxin induziert werden. Im Differential Display wurde die auxin-abhängige Expression dreier Gene gezeigt, deren Volllänge sequenz aufgeklärt und bestimmten Proteinen zugeordnet werden konnte. In einem dieser Fälle handelt es sich um die Untereinheit einer ATPase, deren entwicklungssteuernde Relevanz nicht erkennbar ist. Hingegen zeigen die anderen beiden Gene ein Expressionsmuster, das sich mit der Entwicklung insofern korrelieren lässt, als die Expression hauptsächlich in der stationären Phase erfolgt, wenn auch das zweite Maximum der endogenen IES-Konzentration durchlaufen wird. Die Expression des zweiten, auxinabhängigen Gens, einer GDSL-Lipase könnte in Zusammenhang mit der Jasmonatsynthese stehen, eines auch die Seneszenz auslösenden Stresshormons. Besonders interessant ist das 3. identifizierte Gen, eine  $\beta$ -Xylo-Glucosidase. Mit Mäusen konnte gezeigt werden, dass Knockout-Transformanten deutlich schneller altern als der Kontrolltyp (Kuro-o 2001). Es gelang, eine entsprechende Knockdown-Transformante auch der *Chenopodium rubrum*-Suspensionszellen zu erhalten und zu zeigen, dass diese Zellen schlechter wachsen und schneller altern als die Kontrolltransformanten. Diesem Phänomen muss nun in weiteren Arbeiten nachgegangen werden. Selbstverständlich ist anzunehmen, dass die 3 identifizierten Gene nicht die einzigen sind, die durch IES kontrolliert werden. So wurde z.B. eine CDKA nachgewiesen, deren Genexpression ebenfalls Auxin-abhängig ist und ein ähnliches Muster wie die  $\beta$ -Xylo-Glucosidase hat. Ungeklärt bleibt allerdings der biochemische Zusammenhang zwischen dem exogenen Stimulus und der Induktion der IES-Synthese.



## 5 ZUSAMMENFASSUNG

Phytohormone sind eine wichtige Gruppe pflanzeigener Verbindungen, die als endogene Wachstumsregulatoren wirken und Wachstum und Entwicklung der höheren Pflanzen steuern und koordinieren.

Das Ziel dieser Arbeit war die Klärung der Bedeutung von endogenem (IES) und künstlichem Auxin (2,4-D) für das Wachstum der photoautotrophen *Chenopodium rubrum*-Zellkultur. Das Cytokininspektrum dieser Zellen und die Ethylenproduktion einer Suspensions-Batchkultur war bereits über den ganzen Verlauf von ca. 100 Tagen eingehend untersucht worden, über die endogenen Auxinverhältnisse lagen jedoch keine Daten vor.

Um dieses Ziel zu erreichen, wurde eine effiziente Methode zur Extraktion und Reinigung der Indolessigsäure (IES) entwickelt, da bei der in der Literatur beschriebenen Methode mit den Kulturzellen sehr hohe Verluste auftraten. Die Quantifizierung der IES-Konzentration erfolgte dann mit Hilfe des ELISA nach Weiler (1986).

Mit der optimierten Methode wurde der Auxingehalt während der gesamten Kulturperiode gemessen. Zu Beginn der Kultur (4.Tag) durchläuft die endogene Konzentration an IES einen kurzzeitigen, aber besonders ausgeprägten Peak, wobei die Konzentration bereits in der Teilungsphase wieder auf einen niedrigen Wert abfällt. In der stationären Phase nimmt die Auxinkonzentration vorübergehend, aber längst nicht so stark wie am Anfang, zu, fällt zum Beginn der Seneszenz wieder ab, und steigt dann in der Schlussphase erneut deutlich an. Der endogene Auxingehalt steht aber auch unter dem Einfluss von exogen angebotenen 2,4-D (Dichlorphenoxyessigsäure). Dies wurde durch Kongruenz der Kinetiken von 2,4-D im Suspensionskulturmedium und der endogenen IES-Konzentration demonstriert.

Um einen Beitrag zum Verständnis der Auxinwirkung auf molekularer Ebene zu leisten, wurde zunächst die Aufnahme von exogenem Auxin in die Zellen untersucht. Die Zellen nehmen Auxin sehr schnell und (fast) vollständig aus dem Medium auf.

Nun konnte mit Hilfe des Differential Display-Verfahrens gezielt nach Genen gesucht werden, die durch IES induziert werden. Mit diesem Verfahren wurden 3 Genfragmente aufgefunden, deren Expression durch IES induziert wurde.

Durch Screenen von cDNA-Banken von *Chenopodium rubrum* wurden die zugehörigen Gene gefunden: 18R10 (cDNA-Bank aus 35 Tage alten Zellen), A1.1 und Alt6m4 (cDNA-Bank aus 35 Tage alten Zellen nach 2stündiger IES-Behandlung).

Das Gen A1.1 wird durch IES, nicht aber durch 2,4-D induziert. Es handelt sich um ein Gencluster, das zwei Proteine codiert - das ribosomale Protein S2 (RPS2) und die Untereinheit IV der ATPase. Das Gen ist 2711 bp lang, mit zwei offenen Leserastern, nämlich 503-1213 für RPS2 mit 236 Aminosäuren, und 1411-2154 für die ATPase-Untereinheit mit 247 Aminosäuren. Da A1.1 für keinen Poly-A-Schwanz codiert, ist das Gencluster plastidisch.

Im Northern-Blot-Verfahren wurde eine mRNA aus *Chenopodium rubrum*-Kulturzellen detektiert, die mit der die ATPase-Untereinheit codierenden cDNA aus A1.1 hybridisierte. Da diese mRNA durch die Bindung an eine Oligo-dT-Säule isoliert wurde, muß sie einen Poly-A-Schwanz besitzen und somit aus der Transkription des Kerngenoms stammen, da plastidische mRNA keinen Poly-A-Schwanz aufweist. Ein die ATPase-Untereinheit-codierendes Gen sollte daher auch im Kern der *Chenopodium rubrum*-Zellen vorkommen, das grosse Ähnlichkeit mit dem entsprechenden cDNA-Bereich des plastomischen A1.1 hat (von *Arabidopsis thaliana* ist bekannt, dass ATPase-Gene des Plastoms und des Kerngenoms bis zu 96% Identität aufweisen). Die Bildung dieser mRNA wurde durch IES-Behandlung induziert. Daher ist es sehr wahrscheinlich, dass nicht nur die Chloroplasten, sondern auch der Kern der *Chenopodium rubrum*-Zellen ein ATPase-Untereinheit-codierendes Gen besitzt, dessen Expression durch Auxin induziert werden kann.

Das Gen 18R10 codiert eine Lipase mit dem für Phospholipasen typischen GDSL-Motiv. Die Sequenz ist 368 Aminosäuren lang. Eine Hydrophobizitätsindex-Analyse mit Hilfe des TMHMM-Programms ergab, dass die GDSL-Lipase von *Chenopodium rubrum* ein transmembranes Protein ist. Dabei befindet sich der N-Terminus (12 Aminosäuren) im Zellinneren und ist über einen transmembranen Anker von 19 Aminosäuren an die Zellmembran gebunden. Der größte Teil des Proteins ist extrazellulär (Aminosäuren 32-368), darunter auch das aktive Zentrum.

Interessanterweise wurde die Expression dieser Lipase durch IES induziert, aber durch Cytokinin gehemmt. Ein Antagonismus beider Phytohormone wurde auf Genexpressionsebene bisher noch für kein anderes Gen beschrieben.

---

Das Gen Alt6m4 wird nicht in Zellen der Teilungsphase (7 Tage), sondern nur in Zellen der stationären Phase (35 Tage) exprimiert und seine Expression wird durch IES, nicht aber durch 2,4-D induziert. Die Sequenz ist 2692 bp lang, mit einem offenen Leseraster zwischen den Basenpaaren 59-2362. Das entsprechende Protein ist eine  $\beta$ -Xylo-Glucosidase, die zur Glycosyl-Hydrolase-Familie 3 gehört und 767 Aminosäuren enthält. Um die zellphysiologische Bedeutung dieses Gens zu ermitteln, wurde eine *knock-down*-transformante (RNAi) Zelllinie hergestellt. Dafür musste ein Transformations- und Selektionssystem für die *Chenopodium rubrum*-Suspensionskultur entwickelt werden. Die stabile Transformation gelang schließlich durch Partikelbeschuss und Selektion mit Kanamycin. Die Transformante konnte über eine Kalluskultur wieder als Suspensionskultur etabliert werden. Sie wächst erheblich schlechter als der „Wildtyp“ und auch als die Null-Transformante und altert schneller. Die Teilungsfähigkeit dieser Zellen geht schon am 50.Tag der Kultur verloren. Diese Beobachtung stimmt mit dem Befund überein, dass das Gen im „Wildtyp“ in der stationären Phase (Tag 30 – 60) am stärksten exprimiert wird.

## 6 SUMMARY

### **The significance of endogenous and synthetic auxins in the culture of photoautotrophic *Chenopodium rubrum* cells**

Phytohormones are an important group of plant compounds, which act as endogenous growth regulators. They control and coordinate the growth and development of higher plants.

The goal of the present study was to clarify the importance of endogenous (IAA) and synthetic auxin (2,4-D) for the growth of a photoautotrophic cell culture of *Chenopodium rubrum*. The cytokinin spectrum of these cells had already been thoroughly investigated, as well as the ethylene production during the entire progression of a suspension batch culture over a period of about 100 days. However, no information was available as to the endogenous auxin relations of the cells.

In order to achieve this goal, an efficient method for the extraction and purification of indole acetic acid (IAA) was developed, since the method described in the literature led to heavy losses with the culture cells. Quantification of the IAA concentrations was performed with the aid of the ELISA according to Weiler (1986).

The auxin content was measured with the optimized method during the entire culture period. The endogenous IAA concentration exhibits a short-lived, but particularly pronounced peak at the beginning of the culture (4th day), and falls off to a low value already during the division phase. The auxin concentration increased temporarily during the stationary phase, but to a much lesser extent than at the onset of the culture. It decreased again during the onset of senescence, and increased markedly once more during the final phase. The endogenous auxin concentration is, moreover, also influenced by exogenously supplied dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D). This was demonstrated by the similarity of the kinetics of the 2,4-D in the suspension culture medium and the endogenous IAA concentration.

In order to contribute to the understanding of the effect of auxin at the molecular level, the uptake of exogenous auxin into the cells was studied first. The cells take up auxin very rapidly and (almost) completely from the medium.

The differential display technique was then employed to search for genes which were induced by IAA. Three gene fragments whose expression was induced by IAA were found by this procedure.

The corresponding genes were found by screening cDNA libraries from *Chenopodium rubrum*: 18R10 (cDNA library from 35 days old cells), A1.1 and Alt6m4 (cDNA library from 35 days old cells after two hours of treatment with IAA).

The gene A1.1 is induced by IAA, but not by 2,4-D. It is actually a gene cluster that encodes two proteins - the ribosomal protein S2 (RPS2) and the subunit IV of an ATPase. The gene is 2711 bp long and has two open reading frames, namely 503-1213 for RPS2 (236 amino acids) and 1411-2154 for the ATPase subunit (247 amino acids). Since A1.1 does not encode any poly-A tail, this gene cluster is plastidic.

A mRNA from *Chenopodium rubrum* culture cells which hybridized with the cDNA of A1.1 encoding the ATPase subunit was detected by Northern blotting. Since this mRNA was isolated via binding to an oligo dT-column, it must possess a poly-A tail and thus originate from transcription of the nuclear genome, as plastidic mRNA does not have a poly-A tail. A gene encoding an ATPase subunit should thus be present in the nuclear genome of the *Chenopodium rubrum* cells which is highly similar to the corresponding cDNA region of the plastomic A1.1 (it is known from *Arabidopsis thaliana* that ATPase genes in the plastome and the nuclear genome are up to 96% identical). The formation of this mRNA is induced by treatment with IAA. It is therefore very probable that not only the chloroplasts, but also the nuclear chromosomes of the *Chenopodium rubrum* cells possess a gene encoding an ATPase subunit whose expression can be induced by auxin.

The gene 18R10 encodes a lipase with the GDSL motif typical of phospholipases. The sequence is 368 amino acids long. An hydrophobicity index analysis with the aid of the TMHMM program showed that the GDSL-lipase from *Chenopodium rubrum* is a transmembrane protein. The N-terminus (12 amino acids) is within the interior of the cell and is bound to the cell membrane by a 19 amino acid long transmembrane anchor. The largest part of the protein is extracellular (amino acids 28-368), including also the active center.

Interestingly, the expression of this lipase is induced by IAA, but inhibited by cytokinin. An antagonism of the two phytohormones on the level of gene expression has not yet been described for any other gene.

---

The gene Alt6m4 is not expressed in young cells of the division phase (7 days), but only in cells in the stationary phase (35 days), and the expression is induced by IAA, but not by 2,4-D. The sequence is 2692 bp long, with an open reading frame between the base pairs 59-2362. The corresponding protein is a  $\beta$ -xyloglucosidase which belongs to the glycosyl hydrolase family 3 and consists of 767 amino acids. A knock-down transformant (RNAi) cell line was established to determine the cell physiological significance of this gene. This required the establishment of a transformation and selection system for the *Chenopodium rubrum* suspension culture. Stable transformation was attained by particle bombardment and selection with kanamycin. The transformant was re-established as a suspension culture via a callus culture. The culture grows considerably more slowly than the "wild-type" and than the control transformant and ages more rapidly. The ability of these cells to divide is already gone after 50 days of culture. This observation agrees with the finding that the gene in the "wild type" is expressed most strongly during the stationary phase (days 30-60).

---

**7 LITERATURVERZEICHNIS**

- Ainley WM, Walker JC, Nagao RT, Key JL** (1988) Sequence and characterization of two auxin-regulated genes from soybean. *J Biol Chem.* **263**:10658-10666
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ** (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **215**:403-410
- Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ** (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucl Acids Res* **25**: 3389-3402
- Andre B, Scherer GFE** (1991) Stimulation by auxin of phospholipase A in membrane vesicles from an auxin-sensitive tissue is mediated by an auxin receptor. *Planta* **185**: 209–214
- Arend M, Weisenseel MH, Brummer M, Osswald W, Fromm JH** (2002) Seasonal changes of plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase and endogenous ion current during cambial growth in poplar plants. *Plant Physiol* **129**: 1651-1663
- Ashton FM, Crafts AS** (1981) *Mode of Action of Herbicides*. 2<sup>nd</sup> Edition. John Wiley & Sons. New York, pp 525
- Bause E, Legler G** (1980) Isolation and structure of a tryptic glycopeptide from the active site of beta-glucosidase A3 from *Aspergillus wentii*. *Biochim Biophys Acta* **626**: 459-465
- Beck E, Renner U** (1990) Net fluxes and pools of nitrogenous compounds during suspension culture of photoautotrophic *Chenopodium rubrum* cells. *Plant Cell Environm* **13**: 111-122
- Beck E, Scheibe R** (2003) Senescence and ageing in plants and cyanobacteria. *Physiol Plant* **119**: 1-4
- Beisson F, Gardies AM, Teissere M, Ferte N, Noat G** (1997) An esterase neosynthesized in post-germinated sunflower seeds is related to a new family of lipolytic enzymes. *Plant Physiol Biochem* **35**: 761-765
- Beltran-Pena E, Aguilar R, Ortiz-Lopez A, Dinkova TD, De Jimenez ES** (2002) Auxin stimulates S6 ribosomal protein phosphorylation in maize thereby affecting protein synthesis regulation. *Physiol Plant* **115**: 291-297
- Brenner S** (1988) The molecular evolution of genes and proteins- a tale of 2 serines. *Nature* **334**: 528-530

- Breves R, Bronnenmeier K, Wild N, Lottspeich F, Staudenbauer WL, Hofemeister J** (1997) Genes encoding two different beta-glucosidases of *Thermoanaerobacter brockii* are clustered in a common operon. *Appl Environ Microbiol* **63**:3902-3910
- Brick DJ, Brumlik MJ, Buckley JT, Cao JX, Davies PC, Misra S, Tranbarger TJ, Upton C** (1995) A new family of lipolytic plant enzymes with members in rice, *arabidopsis* and maize. *FEBS Letters* **377**: 475-480
- Bujard H, Gentz R, Lanzer M, Stueber D, Mueller M, Ibrahimi I, Haeuptle MT, Dobberstein B** (1987) A T5 promoter-based transcription-translation system for analysis of proteins in vitro and in vivo. *Meth Enzymol* **155**: 416-433
- Bullock WO, Fernandez JM, Short JM** (1987) A high efficiency plasmid transforming *recA* *Escherichia coli* strain with  $\beta$ -galactosidase selection. *Biotechniques* **5**: 376-379
- Calvin M, Benson AA** (1948) The path of carbon in photosynthesis. *Science* **107**: 476-480
- Campos N, Bako L, Brzobohaty B, Feldwisch J, Zettl R, Boland W, Palme K** (1993) Identification and Characterization of a Novel Phytohormone Conjugate Specific  $\beta$ -glucosidase Activity from Maize. In: ACS Symposium Series **553**, "β-Glucosidases. Biochemistry and Molecular Biology." (Asim Esen ed.), American Chemical Society, Washington D.C., pp 205-213
- Cheung AL, Eberhardt KJ, Fischetti VA** (1994) A Method to Isolate RNA from Gram-Positive Bacteria and Mycobacteria. *Analytical Biochemistry* **222**: 511-514
- Coenen C, Bierfreund N, Luthen H, Neuhaus G** (2002) Developmental regulation of H<sup>+</sup>-ATPase-dependent auxin responses in the diageotropica mutant of tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Physiol Plant* **114**: 461-471
- Coenen C, Christian M, Lüthen H, Lomax TL** (2003) Cytokinin Inhibits a Subset of Diageotropica-Dependent Primary Auxin Responses in Tomato. *Plant Physiol* **131**: 1692–1704
- Coenen C, Lomax TL** (1997). Auxin-cytokinin interaction in higher plants: Old problems and new tools. *Trends Plant Sci* **2**: 351–356
- Cohen JD, Bandurski RS** (1978) Bound auxins - Protection of indole-3-acetic-acid from peroxidase-catalyzed oxidation. *Planta* **139**: 203-208



- Coutinho PM, Henrissat B** (1999) The modular structure of cellulases and other carbohydrate-active enzymes: an integrated database approach, p. 15–23. In K. Ohmiya, K. Hayashi, K. Sakka, Y. Kobayashi, S. Karita, and T. Kimura (ed.), Genetics, biochemistry and ecology of cellulose degradation. Uni Publishers Co., Tokyo, Japan
- Crafts AS** (1953) Herbicides. *Annu Rev Plant Physiol* **4**: 253-282
- Dalrymple BP, Cybinski DH, Layton I, McSweeney CS, Xue GP, Swadling YJ, Lowry JB** (1997) Three *Neocallimastix patriciarum* esterases associated with the degradation of complex polysaccharides are members of a new family of hydrolases. *Microbiology* **143**: 2605–2614
- De Boer TJ, Backer HJ** (1954) A new method for the preparation of diazomethane. *Recueil des Travaux Chimique des Pays-Bas* **73**: 229-234
- Delbarre A, Muller P, Imhoff V, Guern J** (1996) Comparison of mechanisms controlling uptake and accumulation of 2,4-dichlorophenoxy acetic acid, naphthalene-1-acetic acid, and indole-3-acetic acid in suspension-cultured tobacco cells. *Planta* **198**: 532-541
- Devereux J, Haerberli P, Smithies O** (1984) A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX. *Nucl Acids Res* **12**: 387-395
- Diekmann W, Venis MR, Robinson DG** (1995) Auxins induce clustering of the auxin-binding protein at the surface of maize coleoptile protoplasts. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 3425–3429
- Faure D, Desair J, Keijers V, Bekri MA, Proost P, Henrissat B, Vanderleyden J** (1999) Growth of *Azospirillum irakense* KBC1 on the aryl beta-glucoside salicin requires either salA or salB. *J Bacteriol* **181**: 3003-3009
- Faure D, Henrissat B, Ptacek D, Bekri MA, Vanderleyden J** (2001) The *celA* gene, encoding a glycosyl hydrolase family 3 beta-glucosidase in *Azospirillum irakense*, is required for optimal growth on cellobiosides. *Appl Environ Microbiol* **67**: 2380-2383
- Fettig S** (1998) Expression eines chimären Stilbensynthasegens in Weizen (*Triticum aestivum* L.). PhD thesis, Hohenheim.
- Flieger A, Gong S, Faigle M, Stevanovic S, Cianciotto NP, Neumeister B** (2001) Novel Lysophospholipase A Secreted by *Legionella pneumophila*. *J Bacteriol* **183**: 2121–2124
- Fountain MD** (2000) Zellteilungszyklus und Altern in einer Suspensionskultur von *Chenopodium rubrum*-Zellen. Identifizierung und Expression von Zellzykluskontrollelementen in Abhängigkeit vom Alter der Zellkultur. PhD thesis, Bayreuth

- Fountain MD, Valdes O, Fettig S, Beck E** (2003) Expression of cell cycle control factors in non-dividing and ageing photoautotrophic plant cells. *Physiol Plant* **119**: 30-39
- Frias I, Caldeira MT, PerezCastineira JR, NavarroAvino JP, CulianezMacia FA, Kuppinger O, Stransky H, Pages M, Hager A, Serrano R** (1996) A major isoform of the maize plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase: Characterization and induction by auxin in coleoptiles. *Plant Cell* **8**: 1533-1544
- Fujiki Y, Ito M, Nishida I, Watanabe A** (2000) Multiple signaling pathways in gene expression during sugar starvation. Pharmacological analysis of din gene expression in suspension-cultured cells of *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **124**: 1139-1148
- Fujiki Y, Sato T, Yoshikawa Y, Ito M, Watanabe A** (1997) Dark-induced expression of the genes for branchedchain alpha-keto acid dehydrogenase complex in *Arabidopsis* leaves (abstract no. 400). *Plant Physiol* **114**: S-95
- Fujiki Y, Yoshikawa Y, Sato T, Inada N, Ito M, Nishida I, Watanabe A** (2001) Dark-inducible genes from *Arabidopsis thaliana* are associated with leaf senescence and repressed by sugars. *Physiol Plant* **111**: 345-352
- Gamborg OL, LaRue TAG** (1971) Ethylene production by plant cell cultures: The effect of auxins, abscisic acid, and kinetin on ethylene production in suspension cultures of rose and *Ruta* cells. *Plant Physiol* **48**: 399-401
- Gantt JS, Key JL** (1985) Coordinate expression of ribosomal protein mRNAs following auxin treatment of soybean hypocotyls. *J Biol Chem* **260**: 6175-6181
- Gao JW, Kim SR, Chung YY, Lee JM, An GH** (1994) Developmental and environmental-regulation of 2 ribosomal-protein genes in tobacco. *Plant Mol Biol* **25**: 761-770
- Gish W, States DJ** (1993) Identification of protein coding regions by database similarity search. *Nature Genet.* **3**: 266-272
- Gleave AP** (1992) A versatile binary vector system with a T-DNA organisational structure conducive to efficient integration of cloned DNA into the plant genome. *Plant Mol Biol* **20**: 1203-1207
- Grodberg J, Dunn JJ** (1998) ompT encodes the *Escherichia coli* outer membrane protease that cleaves T7 RNA polymerase during purification. *J Bacteriol* **170**:1245-1253

- Grsic S, Kirchheim B, Pieper K, Fritsch M, Hilgenberg W, Ludwig-Müller J** (1999) Induction of auxin biosynthetic enzymes by jasmonic acid and in clubroot diseased Chinese cabbage plants. *Physiol Plant* **105**: 521–531
- Hall JC, Bassi PK, Spencer MS, Vande Born WH** (1985) An evaluation of the role of ethylene in herbicidal injury induced by picloram clopyralid in rapeseed and sunflower. *Plant Physiol* **79**: 18-23
- Hanahan D** (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**: 557-580
- Hattori M, Adachi H, Aoki J, Tsujimoto M, Arai H, Inoue K** (1995) Cloning and expression of a cDNA encoding the  $\beta$ -subunit (30-kDa subunit) of bovine brain platelet-activating factor acetylhydrolase. *J Biol Chem* **270**: 31345-31352
- Hay B, Short J** (1992) XL1-Blue Helper phage and SOLR-cells for  $\lambda$ -FIX II Excision. *Strategies* **5**: 16-18
- Henrissat B** (1991) A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem J* **280**: 309-316
- Henrissat B, Bairoch A** (1993) New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem J* **293**: 781-788
- Hensel LL, Grbic V, Baumgarten DA, Bleecker AB** (1993) Developmental and age-related processes that influence the longevity and senescence of photosynthetic tissues in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **5**: 553-564.
- Hilton S, Buckley JT** (1991) Studies on the Reaction Mechanism of a Microbial Lipase/Acyltransferase Using Chemical Modification and Site-directed Mutagenesis. *J Biol Chem* **266**: 997-1000
- Ho YS, Swenson L, Derewenda U, Serre L, Wei Y, Dauter Z, Hattori M, Adachi T, Aoki J, Arai H, Inoue K, Derewenda ZS** (1997) Brain acetylhydrolase that inactivates platelet-activating factor is a G-protein-like trimer. *Nature* **385**: 89-93
- Hoekema A, Hirsch P, Hooykaas P, Schileroort RA** (1983). "A binary plant vector strategy based on separation of vir- and T- region of *A. tumefaciens*. *Nature* **303**: 179-180.
- Hoffman LH, Olson GE, Carson DD, Chilton BS** (1998) Progesterone and Implanting Blastocysts Regulate Mucl Expression in Rabbit Uterine Epithelium. *Endocrinology*. **139**: 266-271

- Höfgen R, Willmitzer L** (1988) Storage of competent cells for *Agrobacterium* transformation. *Nucl Acids Res* **16**: 9877
- Hudson GS, Holton TA, Whitfield PR, Bottomley W** (1988) Spinach chloroplast rpoBC genes encode three subunits of the chloroplast RNA polymerase. *J Mol Biol* **200**: 639-654
- Hudson GS, Mason JG, Holton TA, Koller B, Cox GB, Whitfield PR, Bottomley W** (1987) A gene cluster in the spinach and pea chloroplast genomes encoding one CF1 and three CF0 subunits of the H<sup>+</sup>-ATP synthase complex and the ribosomal protein S2. *J Mol Biol* **196**: 283-98
- Hüsemann W, Barz W** (1977) Photoautotrophic growth and photosynthesis in cell suspension cultures of *Chenopodium rubrum*. *Plant Physiol* **48**: 77-81.
- Itai A, Ishihara K, Bewley JD** (2003) Characterization of expression, and cloning, of  $\beta$ -D-xylosidase and  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase in developing and ripening tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) fruit. *J Exp Bot* **54**: 2615-2622
- Itai A, Yoshida K, Tanabe K, Tamura F** (1999) A  $\beta$ -D-xylosidase-like gene is expressed during fruit ripening in Japanese pear (*Pyrus pyrifolia* Nakai). *J Exp Bot* **50**: 877-878
- Jerpseth B, Greener A, Short JM, Viola J, Kretz PL** (1992) XL1-Blue MRF' *E. coli* cells: McrA<sup>-</sup>, mcrCB<sup>-</sup>, mcrF<sup>-</sup>, mrr<sup>-</sup>, hsdR<sup>-</sup> derivative of XL1-Blue cells. *Strategies Mol. Biol.* **5**: 81-83
- Jones AM** (1994) Auxin-binding proteins. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **45**: 393-420
- Kashimada K, Yamashita T, Tsuji K, Nifuji A, Mizutani S, Nabeshima Y, Noda M** (2002) Defects in growth and bone metabolism in klotho mutant mice are resistant to GH treatment. *J of Endocrinology* **174**: 403-410
- Kim D, Kim YS, Jung J** (1997) Involvement of soluble proteinous factors in auxin-induced modulation of P-type ATPase in rice (*Oryza sativa* L) seedlings. *FEBS Letters* **409**: 273-276
- Kim YS, Min JK, Kim D, Jung J** (2001) A soluble auxin-binding protein, ABP(57) - Purification with anti-bovine serum albumin antibody and characterization of its mechanistic role in the auxin effect on plant plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase. *J Biol Chem* **276**: 10730-10736
- Klein TM, Wolf ED, Wu R, Sanford JC** (1987) High-velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells. *Nature* **327**: 70-73
- Kuro-o M** (2001) Disease model: human aging. *Trends Mol Med* **7**:179-181

- Kuro-o M, Matsumura Y, Aizawa H, Kawaguchi H, Suga T, Utsugi T, Ohyama Y, Kurabayashi M, Kaname T, Kume E, Iwasaki H, Iida A, Shiraki-Iida T, Nishikawa S, Nagai R, Nabeshima Y** (1997) Mutation of the mouse *klotho* gene leads to a syndrome resembling ageing. *Nature* **390**: 45-51
- Laporte K, Rossignol M** (1997) Auxin control of the sensitivity to auxin of the proton translocation catalyzed by the tobacco plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase. *Plant Growth Regulation* **21**: 19-25
- Lee HY, Bahn SC, Kang YM, Lee KH, Kim HJ, Noh EK, Palta JP, Shin JS, Ryu SB** (2003) Secretory Low Molecular Weight Phospholipase A2 Plays Important Roles in Cell Elongation and Shoot Gravitropism in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **15**: 1990-2002
- Lee RC, Hrmova M, Burton RA, Lahnstein J, Fincher GB** (2003) Bifunctional family 3 glycoside hydrolases from barley with alpha -L-arabinofuranosidase and beta -D-xylosidase activity. Characterization, primary structures, and COOH-terminal processing. *J Biol Chem* **278**: 5377-5387
- Lemesle-Varloot L, Henrissat B, Gaboriaud C, Bissery V, Morgat A, Mornon JP** (1990) Hydrophobic cluster analysis: procedures to derive structural and functional information from 2-D-representation of protein sequences. *Biochimie* **72**: 555-574.
- Ljung K, Hull AK, Kowalczyk M, Marchant A, Celenza J, Cohen JD, Sandberg G** (2002) Biosynthesis, conjugation, catabolism and homeostasis of indole-3-acetic acid in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol* **50**: 309-332
- Macdonald H** (1997) Auxin perception and signal transduction. *Physiol Plant* **100**: 423-430
- Madden TL, Tatusov RL, Zhang J** (1996) Applications of network BLAST server. *Meth Enzymol* **266**: 131-141
- Mai V, Wiegel J, Lorenz WW** (2000) Cloning, sequencing, and characterization of the bifunctional xylosidase-arabinosidase from the anaerobic thermophile *thermoanaerobacter ethanolicus*. *Gene* **247**: 137-143
- Matsuda O, Watanabe C, Iba K** (2001) Hormonal regulation of tissue-specific ectopic expression of an *Arabidopsis* endoplasmic reticulum-type omega-3 fatty acid desaturase (FAD3) gene. *Planta* **213**: 833-840
- Maxie EC, Crane JC** (1967) 2,4,5 Trichlorphenoxyacetic acid: effect on ethylene production by fruits and leaves of fig tree. *Science* **155**: 1548-1550

- McCarter JD, Withers SG** (1994) Mechanisms of enzymatic glycoside hydrolysis. *Curr Opin Struct Biol* **4**: 885-892
- Mertens R, Eberle J, Arnscheidt A, Ledebur A, Weiler EW** (1985) Monoclonal antibodies to plant growth regulators. II. Indole-3-acetic acid. *Planta* **166**: 389-393
- Michalczyk L, Ribnicky DM, Cooke TJ, Cohen JD** (1992) Regulation of indole-3-acetic acid biosynthetic pathways in carrot cell cultures. *Plant Physiol* **100**: 1346-1353
- Miyagi T, Kapoor S, Sugita M, Sugiura M** (1998) Transcript analysis of the tobacco plastid operon *rps2/atpI/H/F/A* reveals the existence of a non-consensus type II (NCII) promoter upstream of the *atpI* coding sequence. *Mol Gen Genet* **257**: 299-307
- Miyazawa Y, Sakai A, Miyagishima S, Takano H, Kawano S, Kuroiwa T** (1999) Auxin and cytokinin have opposite effects on amyloplast development and the expression of starch synthesis genes in cultured bright yellow-2 tobacco cells. *Plant Physiol* **121**: 461-469
- Moll I, Grill S, Gründling A, Bläsi U** (2002) Effects of ribosomal proteins S1, S2 and the *DeaD/CsdA* DEAD-box helicase on translation of leaderless and canonical mRNAs in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology* **44**: 1387-1396
- Morgan PW, Baur JR** (1970) Involvement of ethylen in picloram-induced leaf movement response. *Plant Physiol* **46**: 655-659
- Morgan PW, Hall WC** (1962) Effect of 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid on production of ethylene by cotton and grain sorghum. *Physiol Plant* **15**: 420-427
- Müller A, Hillebrand H, Weiler EW** (1998) Indole-3-acetic acid is synthesised from L-tryptophan in roots of *Arabidopsis thaliana*. *Planta* **206**: 362-369
- Müller A, Weiler EW** (2000) Indolic constituents and indole-3-acetic acid biosynthesis in the wild-type and a tryptophan auxotroph mutant of *Arabidopsis thaliana*. *Planta* **211**: 855-863
- Murashige T, Skoog F** (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* **15**: 473-497
- Napier RM, David KM, Perrot-Rechenmann C** (2002) A short history of auxin-binding proteins. *Plant Mol Biol* **49**: 339-348
- Normanly J** (1997). Auxin metabolism. *Physiol Plant* **100**: 431-442
- Park S, Walz A, Momonoki YS, Slovin JP, Ludwig-Müller J, Cohen JD** (2001) Partial characterization of major amide-linked conjugates of IAA in *Arabidopsis* seed (Abstract 321).

Final Program July 2001, American Society of Plant Biologists/Canadian Society of Plant Physiologist meeting, Providence, RI, pp. 81–82

- Paul RU, Holk A, Scherer GFE** (1998) Fatty acids and lysophospholipids as potential second messengers in auxin action. Rapid activation of phospholipase A2 activity by auxin in suspension-cultured parsley and soybean cells. *Plant J* **16**: 601–611
- Peltier JB, Rossignol M** (1996) Auxin-induced differential sensitivity of the H<sup>+</sup>-ATPase in plasma membrane subfractions from tobacco cells. *Biochem Biophys Res Commun* **219**: 492-496
- Peters W, Ritter J, Tiller H, Valdes O, Renner U, Fountain M, Beck E** (2000) Growth, ageing and death of a photoautotrophic plant cell culture. *Planta* **210**: 478-487
- Peters W, Zenkel M** (1999) Cytokinins affect the pattern of m-RNAs independently of cell division in stationary phase cells of *Chenopodium rubrum* (L.). In: Strnad M, Peê P, Beck E (eds) *Advances in Regulation of Plant Growth and Developmen*. Peres Publishers, Prague, pp. 79-84
- Ptashne M** (1992) *A Genetic Switch*. 2nd Edition, Cell Press and Blackwell Scientific Publ., Cambridge, MA, USA
- Rosche E, Streubel M, Westhoff P** (1994) Primary structure of the photosynthetic pyruvate orthophosphate dikinase of the C3 plant *Flaveria pringlei* and expression analysis of pyruvate orthophosphate dikinase sequences in C3, C3-C4 and C4 *Flaveria species*. *Plant Mol Biol* **26**: 763-769
- Rosche E., Westhoff P** (1990) Primary structure of pyruvate, orthophosphate dikinase in the dicotyledonous C4 plant *Flaveria trinervia*. *FEBS Letters* **273**: 116-121
- Rück A, Palme K, Venis MA, Napier RM, Felle HH** (1993) Patch-clamp analysis establishes a role for an auxin binding protein in the auxin stimulation of plasma membrane current in *Zea mays* protoplasts. *Plant J* **4**: 41–46
- Ruperti B, Cattivelli L, Pagni S, Ramina A** (2002) Ethylene-responsive genes are differentially regulated during abscission, organ senescence and wounding in peach (*Prunus persica*). *J Exp Bot* **53**: 429-437
- Sanchez M, Gianzo C, Sampedro J, Revilla G, Zarra I** (2003) Changes in  $\alpha$ -xylosidase during intact and auxin-induced growth of pine hypocotyls. *Plant Cell Physiol* **44**: 132-138

- Schäfer C, Simper H, Hofmann B** (1992) Glucose feeding results in coordinated changes of chlorophyll content, ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase-oxygenase activity and photosynthetic potential in photoautotrophic suspension cultured-cells of *Chenopodium-rubrum*. *Plant Cell Environm* **15**: 343-350
- Schell J, Koncz C, Spena A, Palme K, Walden R** (1993) Genes involved in the control of growth and differentiation in plants. *Gene* **135**: 245-249
- Scherer GFE** (1995) Activation of phospholipase A by auxin and mastoparan in hypocotyl segments from zucchini and sunflower. *J Plant Physiol* **145**: 483–490
- Scherer GFE, Andre B** (1989) A rapid response to a plant hormone: auxin stimulates phospholipase A2 in vivo and in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* **163**: 111–117
- Scherer GFE, Andre B** (1993) Stimulation of phospholipase A2 by auxin in microsomes from suspension-cultured soybean cells is receptor-mediated and influenced by nucleotides. *Planta* **191**: 515–523
- Shaw JF, Chang RC, Chuang KH, Yen YT, Wang Y T, Wang FG** (1994) Nucleotide sequence of a novel arylesterase gene from *Vibrio mimicus* and characterization of the enzyme expressed in *Escherichia coli*. *Biochem J* **298**: 675-680
- Short JM, Fernandez JM, Sorge JA, Huse WD** (1988)  $\lambda$ -ZAP: A bacteriophage lambda expression vector with in vivo excision properties. *Nucl Acids Res* **16**: 7583-7600
- Siebert P, Herrler M, Hsieh F** (1999) Accurate Expression Profiling with Normalized Poly A+ RNA Northern Blots CLONTECHniques JANUARY 1999 Gene Cloning & Analysis Group CLONTECH Laboratories, Inc.
- Simcox T, Zheng CF, Simcox ME, Vaillancourt P** (1995) Calmodulin-Binding Peptide Affinity-Tag *E. coli* Protein Purification System. *Strateg Mol Biol* **8**: 40-43
- Sitbon F, Astot C, Edlund A, Crozier A, Sandberg G** (2000) The relative importance of tryptophan-dependent and tryptophan-independent biosynthesis of indole-3-acetic acid in tobacco during vegetative growth. *Planta* **211**: 715-721
- Skoog F, Miller CO** (1957) Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue cultures *in vitro*. *Symp Soc Exp Biol* **11**: 118–131
- Stahl D, Rodermel SR, Subramanian AR, Bogorad L** (1990) Nucleotide sequence of a 3.46 kb region of maize chloroplast DNA containing the gene cluster rpoC2-rps2-atpI-atpH. *Nucl Acids Res* **18**: 3073-3074



- Stahl DJ, Rodermel SR, Bogorad L, Subramanian AR** (1993) Co-transcription pattern of an introgressed operon in the maize chloroplast genome comprising four ATP synthase subunit genes and the ribosomal rps2. *Plant Mol Biol* **21**: 1069-1076
- Taipalensuu J, Falk A, Ek B, Rask L** (1997) Myrosinase-binding proteins are derived from a large wound-inducible and repetitive transcript. *Eur J Biochem* **243**: 605-611
- Taipalensuu J, Falk A, Rask L** (1996) A wound and methyl jasmonate-inducible transcript coding for a myrosinase-associated protein with similarities to an early nodulin. *Plant Physiol* **110**: 483-491
- Takahashi Y, Kuro-o M, Ishikawa F** (2000) Aging mechanisms. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 12407-12408
- Tesch C, Nikoleit K, Gnau V, Gotz F, Bormann C** (1996) Biochemical and molecular characterization of the extracellular esterase from *Streptomyces diastatochromogenes*. *J Bacteriol* **178**: 1858-1865
- Thompson JE, Froese CD, Madey E, Smith MD, Hong YW** (1998) Lipid metabolism during plant senescence. *Prog Lipid Res* **37**: 119-141
- Tian H, Kla D, Jones AM** (1995) Auxin-binding Protein 1 Does Not Bind Auxin within the Endoplasmic Reticulum Despite This Being the Predominant Subcellular Location for This Hormone Receptor. *J Biol Chem* **270**: 26962-26969
- Upton C, Buckley JT.** (1995) A new family of lipolytic enzymes? *Trends Biochem Sci* **20**: 178-179.
- Valdes O, Peters W, Beck E** (2001) Antagonistic action of cytokinins and auxin on the expression of a putative lipase/acylhydrolase with GDSL-Motiv mRNA. Abstract of 17th International Conference on Plant Growth substances -IPGSA, Brno Abstract 18, p.85
- Vanuden W, Bbouma AS, Waker JFB, Middel O, Wichers HJj, Dewaard P, Woerdenbag HJ, Kellogg RM, Pras N** (1995) The production of podophyllotoxin and its 5-methoxy derivative through bioconversion of cyclodextrin-complexed deoxypodophyllotoxin by plant-cell cultures. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* **42**: 73-79
- Vroemen S, Heldens J, Boyd C, Henrissat B, Keen NT** (1995) Cloning and characterization of the bgxA gene from *Erwinia chrysanthemi* D1 which encodes a beta-glucosidase/xylosidase enzyme. *Mol Gen Genet* **246**: 465-477
- Ware GW** (1994) *The Pesticide Book*. 4th Ed. Thomson Publications, Fresno, CA. pp 386.

- Wei Y, Schottel JL, Derewenda U, Swenson L, Patkar S, Derewenda ZS** (1995) A novel variant of the catalytic triad in the *Streptomyces scabies* esterase. *Nat Struct Biol* **2**: 218-223
- Weiler EW** (1986) Plant Hormone Immunoassays Based on Monoclonal and Polyconal Antibody. In: *Modern Methods of Plant Analysis, New Serie Vol. 4 „Immunology in Plant Science“*. (Linskens HF, Jackson JF, eds), pp 1-17
- Weiler EW, Jourdan PS, Conrad W** (1981) Levels of indole-3-acetic acid in intact and decapitated coleoptiles as determined by a specific and highly sensitive solid-phase enzyme immunoassay. *Planta* **153**: 561-571
- Wesley VS, Helliwell C, Smith NA, Wang MB, Rouse D, Liu Q, Gooding PS, Singh SR, Abbott D, Stoutjesdijk A, Robinson SP, Gleave AP, Green AG, Waterhouse PM** (2001) Construct design for efficient, effective and high-throughput gene silencing in plants. *Plant J* **27**: 581-590
- Wilhelm S, Tommassen J, Jaeger KE** (1999) A Novel Lipolytic Enzyme Located in the Outer Membrane of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **181**: 6977-6986
- Williams ME, Sussex IM** (1995) Developmental regulation of ribosomal-protein L16 genes in *Arabidopsis-Thaliana*. *Plant J* **8**: 65-76
- Wimberly BT, Brodersen DE, Clemons WM, Morgan-Warren RJ, Carter AP, Vonnrhein C, Hartsch T, Ramakrishnan V** (2000) Structure of the 30S ribosomal subunit. *Nature* **407**: 323-339
- Wright AD, Moehlenkamp CA, Perrot GH, Neuffer MG, Cone KC** (1992) The maize auxotrophic mutant orange pericarp is defective in duplicate genes for tryptophan synthase  $\beta$ . *Plant Cell* **4**: 711-719
- Yahata K, Mori K, Arai H, Koide S, Ogawa Y, Mukoyama M, Sugawara A, Ozaki S, Tanaka I, Nabeshima Y and Nakao K** (2000) Molecular cloning and expression of a novel klotho-related protein. *J Mol Med* **78**: 389-394
- Yamagami M, Haga K, Napier RM, Iino M** (2004) Two distinct signaling pathways participate in auxin-induced swelling of pea epidermal protoplasts. *Plant Physiol* **134**: 735-747
- Yamaki S, Kakiuchi N** (1979) Changes in hemicellulose-degrading enzymes during development and ripening of Japanese pear fruit. *Plant and Cell Physiol* **20**: 301-309

- Yamashita T, Nifuji A, Furuya K, Nabeshima Y, Noda M** (1998) Elongation of the epiphyseal trabecular bone in transgenic mice carrying a klotho gene locus mutation that leads to a syndrome resembling aging. *J of Endocrinology* **159**: 1-8
- Yang CY, Manoogian D, Pao Q, Lee FS, Knapp RD, Gotto AM, Pownall HJ** (1987) Lecithin-cholesterol acyltransferase - functional regions and a structural model of the enzyme. *J Biol Chem* **262**: 3086-3091
- Yang T, Law DM, Davies PJ** (1993) Magnitude and kinetics of stem elongation induced by exogenous indole-3-acetic acid in intact light-grown pea seedlings. *Plant Physiol* **102**: 717-724
- Yoshida S** (2003) Molecular regulation of leaf senescence. *Curr Opin Plant Biol.* **6**: 79-84
- Yoshida S, Ito M, Nishida I, Watanabe A** (2001) Isolation and RNA gel blot analysis of genes that could serve as potential molecular markers for leaf senescence in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* **42**: 170-178
- Yoshida S, Ito M, Watanabe A** (1998) Cloning of cDNA for senescence-associated genes from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* **39**: S81
- Zamenhof PJ, Villarero M** (1972) Construction and properties of *Escheria coli* strains exhibiting complementation of galactosidase fragments in vivo. *J Bacteriol* **110**: 171-178
- Zhang J, Madden TL** (1997) PowerBLAST: A new network BLAST application for interactive or automated sequence analysis and annotation. *Genome Res* **7**: 649-656
- Ziegler P, Scheibe R** (1989) Greening and growth of suspension-cultured cells of *Chenopodium rubrum* under conditions of heterotrophic and autotrophic nutrition. *Plant Cell Environm* **12**: 725-735

**8 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

2,4-D	2,4-Dichlorphenoxyessigsäure
ABP	Auxin-Bindungs-Protein
Amp	Ampicillin
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BSA	<i>engl.</i> bovine serum albumin
CBP	Calmodulin-Bindungs-Peptid
CDKA	Cyclin-abhängige Kinase A
CDKB	Cyclin-abhängige Kinase B
DD	Differential Display
DEA	Diethanolamin
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMF	N,N'-Dimethylformamid
DS	Andock-Domäne
EDC	Ethyl-3-(3 Dimethylaminopropyl) Carbodiimide
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
ER	Endoplasmatischen Reticulums
FAD3::LUC	Fettsäure Desaturase und Luciferase
FH <sup>+</sup> -ATPase	Functional H <sup>+</sup> -ATPase
GCG	Genetics Computer Group“
GFP	Green Fluorescence Protein
GHF1	Glycosyl-Hydrolase-Familie 1
GHF3	Glycosyl-Hydrolase-Familie 3
IAA	<i>engl.</i> Inodel-3- acetic acid
ID	Inhibitordomäne
IES	Indol-3-essigsäure
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid
LB	Luria-Bertani
LOX	Lipoxigenase
MS-Medium	Murashige und Skoog Medium
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PLA	Phospholipase A
PM H <sup>+</sup> -ATPase	Plasmamembran H <sup>+</sup> -ATPasen
pNPP	Nitrophenylphosphat
PTGS	Post-transcriptional gene silencing

---

RACE	<i>engl.</i> rapid amplification of cDNA ends
RNAi	RNA-Interferenz
RPS2	Ribosomale Protein S2
RubisCO	Ribulose-bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase
SDS	<i>engl.</i> sodium dodecyl sulfate
T4-PNK	T4-Polynukleotidkinase
TBE	Tris/Borat/EDTA
TBS	<i>engl.</i> tris buffered saline
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
Tween 20	Polyoxyethylensorbitan-Monolaureat
VKanR	Kanamycin-Resistenz-Linie
X-Gal	5-Brom-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galaktosid
XGRNAi	$\beta$ -Xylo-Glucosidase- RNAi-Linie
ZR	t-Zeatinribosid

---

**9 ANHANG**

Anhang I: *Accession Number* alle Sequenzen aus dem Kladogramm von der Abb 30

**Gruppe 1A**

aaf27024  
aan31927  
aam62882  
np\_564668  
aam61525  
aac64890  
aag09098  
aac33199  
bab55786  
bab39238  
aab61024  
cab80922  
caa09694  
baa81842  
np\_189434  
bab01482  
bac80100  
bac80099  
aag28886  
bab02204  
aap37470  
cab87784  
aaa83209

**Gruppe 1B**

bab89203  
bab89190  
aag42007  
np\_849723  
aaa93262  
np\_174186  
np\_174185  
aag22837  
aag22836  
aag60153  
aag51269  
np\_174440  
aam65183  
aak60329  
aad41994  
aag22835  
np\_174181  
bab09319  
aam62801  
baa94228  
baa94238  
aak98764  
cab41152

Gruppe 2A	Gruppe 2B	Gruppe 2C	Gruppe 2D
bab02989	aad25766	aaf26758	bab09323
aak96511	np_175797	aak30020	aag51687
aam64922	bab09701	np_177719	bab10579
np_175802	aad25771	aak30019	cab43849
aad25772	np_175801	aag52082	aam63364
aal32630	aam47031	bab10559	aad12023
aam67268	np_188039	bab09324	aad12024
aad25773	np_175795	aam61295	aad12019
aak15556	<b>AAP55714</b>	aad25660	cac01771
aad25774	<b>Chenopodium</b>	aad25940	np_568318
caa71237	<b>rubrum</b> GDSL-	aaf82220	np_564430
caa71238	Lipase	np_563774	aaf97292
aac49181		aam63265	aal24090
bab01435		aac16946	aam67249
		aac16947	aam63021
		baa88267	bab09209
		aag50646	aam64368
		aam64923	aag51758
		aad24833	aam65973
		aam61458	aag51756
		b84722	bab21153
		bab68101	bab56037
		bab89600	aaf43219
		aak62786	bab09995
		aag50643	aaf26785
		aak30018	np_198322
		bac41809	bac56011
		aak30016	aap54162
		aao42232	aan05519
		aak30017	cae04723
		np_564104	np_197344
		aam64323	caa22974
		aal67433	aam61634
		caa42925	bab08315
		aap21383	aag52368
		aam65485	aac23769
		aad25823	cab88323
		aal61949	bab10664
		cab36525	np_567372
		cab81548	
		bab01276	
		bab10602	
		np_190878	
		aak14416	

---

## Ich Danke

meinem wissenschaftlichen Betreuer Herrn Prof. Dr. Erwin Beck für die freundliche Überlassung des Themas und für seinen vielseitigen, fachlichen Rat.

Prof. Weiler (Universität Bochum) für die mir überlassenen Antikörper 18-III-C3 zur Bestimmung des Auxins.

Dr. Wesley (CSIRO Plant Industry Canberra) für die überlassenen Vektoren pHannibal und pArt27 zur Klonierung der RNAi.

Wilfried Peters für die umfangreiche Unterstützung bei der methodischen Arbeit.

Christiane Meinen für ihre tatkräftige Zusammenarbeit im Labor und ihre stets freundliche und fröhliche Art.

allen Mitgliedern des Lehrstuhls für ihre Hilfsbereitschaft und ihre Freundlichkeit, die das Arbeitsklima wesentlich prägten.

meinen Freunden für ihre ständige Gesprächsbereitschaft.

meiner Familie für ihre **Geduld** und Unterstützung in Allem während der gesamten Zeit.

Gracias a mis padres por su educación y su apoyo en todos mis labores y caminos.



---

## **ERKLÄRUNG**

Hiermit erkläre ich, dass ich diese Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Ferner erkläre ich, dass ich nicht anderweitig mit oder ohne Erfolg versucht habe, diese Dissertation einzureichen. Ich habe keine gleichartige Doktorprüfung an einer anderen Hochschule endgültig nicht bestanden.

Bayreuth, den 5. März 2005

.....  
Oscar Carlos Valdes Dominguez