1 Einleitung

Holz ist das Produkt einer dünnen lateralen Zellschicht, dem Kambium, welches den gesamten Holzkörper umschließt. Da der größte Teil der Xylemzellen nach der Differenzierung abstirbt, sind die Eigenschaften der Holzzellen maßgeblich vom physiologischen Zustand des Kambiums bestimmt, der herrschte, als diese Zellen differenzierten. Der physiologische Zustand ist wiederum von externen (Licht, Temperatur, Schwerkraft, Zug- und Druckkräfte) und internen Faktoren (Versorgung mit Wasser, Nährstoffen und Hormonen) abhängig. Der Prozess der Differenzierung der kambialen Zellen zu den Faser-, Gefäß- oder Parenchymzellen des Holzes ist nicht vollständig erforscht. Ein entscheidender Faktor der Holzbildung ist die hormonale Steuerung durch das Pflanzenhormon Auxin (Uggla et al., 1996; Aloni, 2001). In Pflanzen sind neben IAA (Indol-3-Essigsäure) noch einige weniger erforschte und in wesentlich geringeren Konzentrationen synthetisierte Auxine vorhanden, z.B. 4-Chloroindol-3-Essigsäure, Indolbuttersäure, Indol-3-Propionsäure, und Phenylessigsäure (Normanly et al., 1995; Ludwig-Müller, 1999; Bartel et al., 2001; Ludwig-Müller and Cohen, 2002).

Auxine sind in nahezu alle Wachstums- und Differenzierungsvorgänge der Pflanze einbezogen: Polare Ausrichtung des Embryos, Keimung, Steuerung des Zellzyklus, Wurzel- und Sprossstreckung, photo- und geotrope Reaktion, Initiation der Seitenwurzelentwicklung, Entwicklung des vaskulären Systems, Wundregeneration, Blütenbildung, Steuerung des Überganges von der Dormanz in die Wachstumsphase, etc. (Jacobs, 1952; Young, 1954; Celenza et al., 1995; Davies, 1995; Sundberg et al., 1994; Philippar et al., 1999; Reinhard et al., 2000; Casimiro et al. 2001; Oakenfull et al., 2002; Teale et al., 2005). Auxin beeinflusst die meisten Aspekte der Xylemdifferenzierung, zumeist im Zusammenspiel mit anderen Pflanzenhormonen: Xylemproduktion, Größe und Zellwanddicke der Xylemzellen, Gefäßdichte und die Bildung von Reaktionsholz, Erhalten der Identität der Kambiumzellen (Little and Savidge, 1987; Roberts et al., 1988).

Die Hauptsyntheseorte von Auxin sind expandierende Blätter und sich entwickelnde Knospen (Aloni and Zimmermann, 1983; Savidge, 1988; Aloni et al., 2003). Daneben werden im Kambium und der Wurzel geringe Mengen Auxin synthetisiert (Sundberg and Uggla, 1998; Sundberg et al., 2000; Ljung et al. 2001).

Der Transport des Auxins erfolgt basipetal in den Kambiumzellen (Sachs, 1981). Für diese Aufgabe gibt es mindestens zwei spezialisierte Membranproteinfamilien: Influx-Carrier (AUX-Proteine, Bennett et al. 1996), welche Auxin in die Zelle hinein transportieren und asymmetrisch am basalen Ende angeordnete Efflux-Carrier, welche Auxin aus der Zelle heraus transportieren (PIN-Proteine) (Bennett et al., 1995, Gälweiler et al., 1998;

Geldner et al. 2001). Der Transport im Kambium und im Zentralzylinder der Wurzel bis zur Wurzelspitze erfolgt mittels PIN1. Hier wird das Auxin durch PIN2 Efflux-Carrier in die Wurzelepidermis transportiert und wiederum basipetal einige Millimeter in die Elongationszone der Wurzel transportiert (Teale et al., 2005).

Der basipetale Fluss von Auxin steuert die polare Ausrichtung der Pflanze und die der einzelnen Zellen (Berleth, 2001). Die Differenzierung der Xylemmutterzelle in Faser oder Gefäß wird möglicherweise sowohl von der Auxinkonzentration, als auch vom kontinuierlichen Fluss dieses Hormones beeinflusst (Sachs, 1981 und 1991a). Die Verbindung der einzelnen Gefäßelemente zu einem kontinuierlichen Gefäßstrang erfolgt nur, wenn ein stetiger Strom von Auxin durch diese Zellen kanalisiert wird (Sachs, 1981). Der polare Auxintransport kann durch sog. Auxintransportinhibitoren gehemmt oder gänzlich unterbunden werden (Mattsson et al., 1999). Als Auxintransportinhibitoren kommen natürliche Flavonoide (Jacobs and Rubery, 1988; Brown et al., 2001), einige Chemikalien (z.B. NPA, TIBA (Tri-Jod Benzolsäure)) und sog. Morphactine (Schneider, 1964; Katekar and Geissler, 1977) in Frage. Morphactine sind Auxintransportinhibitoren mit zusätzlichen Einflüssen auf die äußere Pflanzengestalt („morphogenetically active substances“, Schneider, 1964). Alle diese Stoffe verhindern den korrekten Zyklus des PIN-Efflux-Carriers von der Zellmembran in Membranvesikel und zurück (Geldner et al., 2001). Dieser Zyklus kann ebenso durch Brefeldin A gehemmt werden. Brefeldin A bewirkt eine Vernetzung aller Vesikel in der Zelle, wodurch die normale Entwicklung der Vesikel gestört wird. Außerdem werden einige selektierende Transportproteine aus der Vesikelmembran heraus gelöst (Klausner et al., 1992). Brefeldin A bewirkt die gleichen Symptome bei Pflanzen wie klassische Auxintransportinhibitoren (Morris and Robinson, 1998; Steinmann et al., 1999)

Die vielfältigen Prozesse, die Auxin in Pflanzen steuern, erfordern eine exakte und rigide Steuerung dieses Faktors und eine sehr differenzierte Antwort seitens der Einzelzelle (Worley et al., 2000; Swarup et al., 2002; Schrader et al. 2003; Rashotte et al., 2005).

Die Synthese von Auxin erfolgt über verschiedene Synthesewege: direkt über Tryptophan oder unabhängig von Tryptophan (Normanly et al., 1993). Bisher wurde jedoch kein Syntheseweg komplett enträtselt. Niedrige, kontinuierliche Auxinkonzentrationen werden zumeist typtophanunahängig synthetisiert. Nicht dauerhafte, hohe Konzentrationen, welche bei Entwicklungsprozessen auftreten oder durch Stress ausgelöst werden, werden über Tryptophan synthetisiert (Michalczuk et al., 1992; Normanly and Bartel, 1999; Sztein et al., 2002). Überschüssiges Auxin wird einerseits

direkt oxidativ abgebaut (Östin et al., 1998), andererseits zeitweise inaktiviert durch Umwandlung in Indolbuttersäure (IBA) oder durch Konjugation an andere organische Verbindungen (Veresterung an Glukose, Glukane oder myo-Inositol oder Kondensation an die meisten Aminosäuren, Polypeptide oder Proteine) und damit inaktiviert.

Ein großer Anteil des in Pflanzen vorhandenen Auxins (bis 99%) liegt in konjugierter

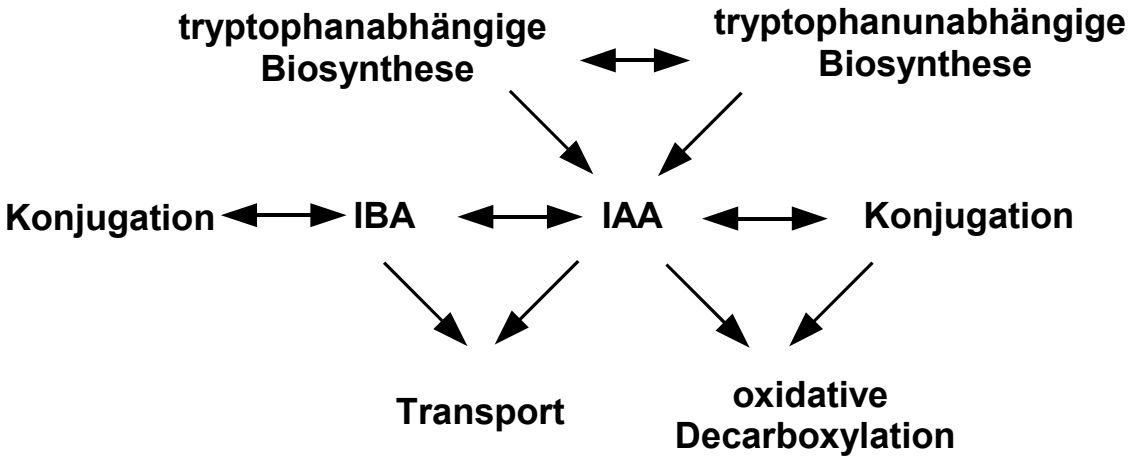

Abb. 1: *Schicksal von IAA im Pflanzenstoffwechsel nach Bialek et al., (1992)*

Form vor (Bandurski and Schulze, 1977; Bandurski et al., 1992; Normanly et al., 1993; Tuominen et al., 1995). In monokotyledonen Pflanzen wie Reis und Mais dominieren Auxinkonjugate mit Esterbindung (Labarca et al., 1965; Hall, 1980; Chisnell, 1984). In Dikotyledonen findet man hingegen fast ausschließlich Auxinkonjugate mit Peptidbindung neben geringen Mengen Esterkonjugaten (Cohen, 1982; Bialek and Cohen, 1986; Epstein et al., 1986; Östin et al., 1992; Tam et al., 2000; Walz et al., 2002).

Die Konjugation ist der erste Schritt im Katabolismus von Auxin, durch Bindung an Asparaginsäure oder Glutaminsäure. Des weiteren erfüllen Auxinkonjugate wichtige Aufgaben bei Speicherung, Langstreckentransport, zeitweiser Inaktivierung und Schutz vor oxidativem Abbau (Cohen and Bandurski, 1982). Zudem stellen Auxinkonjugate einen ständig verfügbaren Pool dar, der bei Bedarf mit nur wenig Aufwand aktiviert werden kann. Die Bildung von IAA-Asparaginsäure in Erbsensämlingen hat vor etwa 50 Jahren zur Entdeckung der Auxinkonjugate in Pflanzen geführt (Andrea and Good, 1955). Im Endosperm von Mais beispielsweise finden sich große Mengen Auxinesterkonjugate (Bandurski et al., 1995). Diese werden während der Keimung in die Kotyledonen transportiert und hier hydrolysiert. Das entstandene Auxin dient der Steuerung der nötigen Differenzierungsprozesse und wird zu diesem Zweck größtenteils basipetal transportiert (Bandurski et al., 1995). Die Neusynthese von Auxin im Keimling setzt erst 4 Tage (*Pinus sylvestis*), bzw. 7 Tage (*Zea mays*) nach der Keimung ein, bis zu diesem Zeitpunkt wird der gesamte Auxinbedarf des Keimlings über die Hydrolysierung von Auxinkonjugaten abgedeckt (Sandberg et al., 1987; Jensen and Bandurski, 1996; Ljung et al., 2001).

Die Bildung von Auxinkonjugaten ist im Pflanzenreich weit verbreitet, von Moosen und Farnen bis hin zu den angiospermen Pflanzen (Sztein et al., 1995; Bartel, 1997; Sztein et al., 1999). Es wird vermutet, dass die Konjugation an ein bestimmtes Molekül eine Art Adressierung darstellt, welche das Schicksal - Katabolismus oder Speicherung - des angehängten Auxinmoleküles festlegt (Bandurski et al., 1995).

Die Bildung von IAA-Glucose erfolgt zumeist in unreifen Samen und Blättern, in geringeren Umfang auch in reifen Samen, unreifen Früchten und im Stamm (Aloni et al., 2003; Jakubowska and Kowalczyk, 2004). Die Bildung von IAA-Asparaginsäure und IAA-Glutaminsäure als erste Schritte der Detoxifikation von IAA findet vor allem in Wurzeln, Blättern, Stengeln und in keimenden Samen nach Einsetzen der *de novo* Synthese von IAA statt (Zelena, 2000; Ljung et al., 2001).

Da einige Auxinkonjugate nur eine vorübergehende Form der Speicherung von Auxin darstellen, und Proteinextrakte von Pflanzen in der Lage sind, radioaktiv markierte Auxinkonjugate in freies Auxin zu spalten, wurde gezielt nach Mutanten gefahndet, welche Defizite in der Hydrolysierung von Auxinkonjugaten aufweisen (Bartel and Fink, 1995; Davies et al., 1999; Kowalczyk et al., 2003). Durch diese Arbeiten wurden einige Auxinamidohydrolasen und deren Substrate entdeckt (Campanella et al., 2003a). In *Arabidopsis thaliana* existieren 7 Gene, die dem ILR1-Gen („IAA-Leucin resistent“), der ersten identifizierten Auxinamidohydrolase, ähnlich sind (ILR1, ILL1, ILL2, ILL3, ILL5, ILL6 und IAR3). Davon ist ILL5 ein Pseudogen, d.h. eine Duplikation von IAR3 ohne nachgewiesenes mRNA-Transcript (LeClere et al., 2002). Für ILL3 in *Arabidopsis thaliana* wurde bisher keine Funktion nachgewiesen. Eine Zusammenstellung der bisher entdeckten Sequenzen von Auxinamidohydrolasen in vielen Pflanzenarten liefert Campanella et al. (2003a).

Interessanterweise lassen sich bei den bisher bekannten Auxinamidohydrolasen aufgrund der Homologie keine oder nur begrenzte Aussagen über die Substratspezifität machen: ILR1 aus *Arabidopsis thaliana* spaltet effizient IAA-Konjugate mit Leucin, Phenylalanin, Alanin, Aspartat und Glycin. sILR1 aus *Arabidopsis suecica*, welches auf Proteinebene zu 98% homolog zu ILR1 ist (Campanella et al., 2003b) spaltet dagegen effektiv nur IAA-Alanin und IAA-Glycin. *A. suecica* ist ein natürlicher Hybrid aus *A. thaliana* und *A. arenosa,* der vor etwa 5-10000 Jahren entstand (O´Kane et al., 1996).Ebenso unterschieden sich die beiden Enzyme im pH-Optimum (pH 7,5 bei ILR1 und pH 8-8,5 bei sILR1, gemessen mit IAA-Alanin). Auch die Expression in unterschiedlichen Geweben unterschiedet sich zwischen beiden Homologen (LeClere et al., 2002; Bakllamaja and Campanella, 2003; Campanella et al., 2003a, c). Es ist daher nicht verwunderlich, dass

TaIAR3 aus Weizen (*Triticum aestivum*) und IAR3 aus *Arabidopsis thaliana* (Proteinhomologie von 64,1%) komplett unterschiedliche Substratspezifitäten aufweisen (Davies et al., 1999; LeClere et al., 2002; Campanella et al., 2004).

Auxinamidohydrolasen werden in fast allen Pflanzenorganen exprimiert (Davies et al., 1999; Campanella et al., 2003c; Campanella et al., 2004; Rampey et al., 2004). AtIAR3 wurde zuerst als Jasmonat-reguliertes Gen (JR3) klassifiziert, welches bei Verwundung schnell an der Verwundungsstelle selbst und ebenfalls systemisch exprimiert wird (Titarenko et al., 1997). Da Auxin die Expression einiger Jasmonat-induzierter Gene behindert, könnte IAR3 an der negativen Feedbacksteuerung der Wundreaktion beteiligt sein, indem IAA-Konjugate gespalten werden, damit die IAA-Konzentration erhöht wird

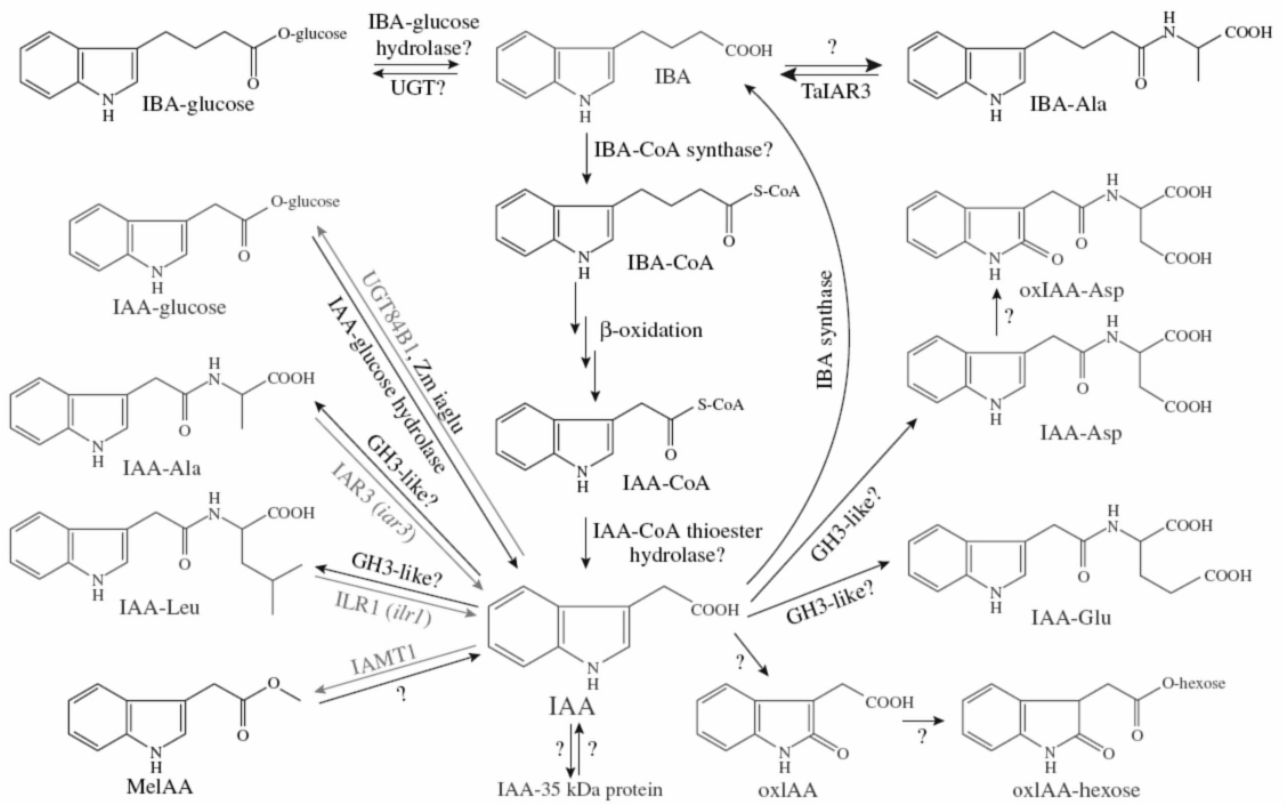

Abb. 2: *Mögliche Wege des IAA-Metabolismus/Katabolismus. Aus Woodward and Bartel (2005). Über und unter den Reaktionspfeilen sind die Namen der für diese Reaktion identifizierten Gene vermerkt: ILR1 – „IAA-leucine resistant“; IAR3 – „IAA-alanine resistant“; GH3 – Familie auxininduzierter Gene; IAMT1 – IAA-Methylsynthetase; Zmiaglu – IAA-Glucosesynthetase aus Mais; TaIAR3 – IAR3-Homolog aus Weizen; UGT84B1 – Homolog zu Zmiaglu aus A. thaliana. Kleingedruckt und kursiv unter den Reaktionspfeilen sind die Namen der genspezifischen Knockoutmutanten angegeben. Fragezeichen neben Reaktionspfeilen geben noch nicht identifizierte Gene an. Unter den Verbindungen steht der jeweilige Name: IAA-Ala – IAA-Alanin; IAA-Asp – IAA-Asparaginsäure; IAA-Glu – IAA-Glutaminsäure; IAA-Leu – IAA-Leucin; IBA – Indolbuttersäure; IBA-Ala – IBA-Alanin; IBA-CoA – an CoA gebundene IBA; MeIAA – methylierte IAA; oxIAA – oxidierte IAA; oxIAA-Asp – oxidierte IAA-Asparaginsäure. IAA-35kDa-Protein – Speicherprotein für IAA.*

und die Expression bestimmter Jasmonat-induzierter Gene reduziert wird (Titarenko et al., 1997; Rojo et al., 1998). ILR1, ILL2 und ILL3 werden stark in den Kotyledonen von *Arabidopsis thaliana* exprimiert. Außerdem werden ILL3 und IAR3 in Blättern und Samen gebildet. Es konnte gezeigt werden, dass 5 von 7 Auxinamidohydrolasen in Blütenblättern synthetisiert werden (Rampey et al., 2004). Andere Organe weisen ein begrenzteres Set an exprimierten Auxinamidohydrolasen auf.

Neben Pflanzen besitzen auch Mikroorganismen, z.B: *Agrobacterium tumefaciens,* eigene IAA-Synthesegene (*iaaH* und *iaaM*) für Auxinsynthese über Tryptophan oder Indolacetamid (Yamada et al., 1985; Thomashaw et al., 1986; Manulis et al., 1998) und Auxinkonjugathydrolasen (*iaaspH*) (Costacurta and Vanderleyden, 1995). Diese Enzyme sind für diese Organismen notwendig, um eine starke Akkumulation von Auxin (500 fach) (Kado, 1984) in der Umgebung der Zelle zu erreichen und dadurch die Bildung der Wurzelhalsgalle anzuregen (Kado, 1984; Vareecke et al., 2000). Des weiteren dient einigen pflanzenassoziierten Mikroorganismen (z.B. *Bacillus megatherium* oder *Clostridia* spp.) im Wurzelraum der Pflanze die Konjugation von Aminosäuren an Indol-3-Propionsäure (IPA) zur Entgiftung dieses Stoffes, der auf einige Arten hemmend wirkt und von Pflanzen zur Pathogenabwehr eingesetzt wird (Tabone, 1958; Matsuda et al., 1998; Walker et al., 2003). Die Homologien zwischen pflanzlichen und bakteriellen Auxinamidohydrolasen sind mit etwa 20% auf Proteinebene sehr gering. Bakterielle Auxinamidohydrolasen gehören zur Proteinfamilie der M20 Peptidasen (Zink-Metallopeptidasen), von welcher die pflanzlichen Auxinamidohydrolasen lediglich eine Untergruppe darstellen. Pflanzliche Hydrolasen haben mit den M20 Peptidasen hauptsächlich die Peptidasedomänen gemeinsam. Auxinamidohydrolasen von Moosen und Farnen lassen sich über eine Blast-Datenbankabfrage nicht ermitteln, was am vorhandenen, sehr limitierten Datenbestand, als auch an fehlenden Homologien liegen kann (Campanella et al., 2003).

Erst 2005 wurden 6 Auxinamidosynthetasen von Staswick et al. (2005) beschrieben. Dabei handelt es sich um Homologe zu dem von Hagen et al. (1985 und 1991) beschriebenen GH3-Proteinen aus Soja (*Glycine max*). Die Expression dieser Synthetasen wird zumeist durch Auxin induziert und die einzelnen Proteine zeigen ein stark überlappendes Produktspektrum sowohl für die meisten Aminosäuren, außer für die natürlich ebenfalls nicht als auxinkonjugiert anzutreffenden Histidin, Serin, Threonin, Arginin und Lysin, als auch für einige nichthalogenierte Auxine (IAA, IBA, IPA, PAA (Phenylessigsäure) und NAA). Die halogenierten Auxine 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (künstlich) und 4-Chloroindol-3-Essigsäure (natürlich) werden durch diese Enzyme nicht

konjugiert. Für andere Proteine aus dieser Genfamilie wurde gezeigt, dass sie Jasmonsäure mit Aminosäuren konjugieren können (Staswick and Tiryaki, 2004).

In Bäumen wurden bisher keine Auxinhydrolasen beschrieben, obwohl auch hier in einigen Arten (*Populus*, *Pinus* und *Citrus*, in Blättern, Stamm und Wurzel) Auxinkonjugate nachgewiesen wurden (Goren et al., 1986; Sundberg et al., 1990, 1994; Savidge, 1994; Tuominen et al., 1995, Teichmann unpubl. Daten). Lediglich in einigen Pappel und Pinus-EST-Banken traten Sequenzen von Auxinhydrolasen zutage (EST-Banken für Blüten, Zugholz, Pathogenbefall; Sterky et al., 1998, 2004; Sederoff, 2000 unpubl.; Unneberg et al., 2002 unpubl.; Kohler et al., 2003; Ranjan et al., 2003 unpubl. Dejardin et al., 2004; Huang et al., 2004 unpubl.). Speziell in einigen kambiumspezifischen Datenbanken wurden Auxinamidohydrolasesequenzen gefunden, obwohl in diesem Gewebe nur sehr geringe Mengen Auxinamidokonjugate vorhanden sind (Tuominen et al., 1995).

Weiterhin wurde nachgewiesen, dass durch die Behandlung von holzigen Pflanzen mit Auxintransportinhibitoren verstärkt Auxinkonjugate gebildet werden (Sundberg et al., 1994; Goren et al., 1986). Die Frage liegt nahe, welche Rolle Auxinamidokonjugate in Bäumen, speziell bei der Reaktivierung des Kambiums, beziehungsweise in der zusätzlichen Belieferung des Stammes mit Auxin in der Wachstumsphase und Dormanz, spielen.

Um dieser Frage nachzugehen ist die Pappel (*Populus* spec.) als Modellpflanze bei molekularbiologischen Untersuchungen an angiospermen Bäumen geeignet (Stettler et al., 1996; Klopfenstein et al., 1997; Bradshaw et al., 2000; Mellerowicz et al., 2001). Sie zeichnet sich durch ein kleines Genom von 520 Mbp auf 19 Chromosomen und durch die Verfügbarkeit eines routinemäßigen Transformationssystems aus (Tuskan et al., 2002). Durch das Poplar-Genome Project (URL: http://genome.jgi-psf.org/Poptr1), der Sequenzierung des Genoms von *Populus trichocarpa* (Nisqually-1), wird es nun möglich, alle Mitglieder einer Genfamilie in der Pappel zu bestimmen. Außerdem können durch diese Sequenzierung einmalige, lediglich bei holzigen Pflanzen vorkommende Gene durch den Vergleich mit krautigen Pflanzen bestimmt werden (Tuskan et al., 2003). Daneben gibt es bereits einige cDNA und EST-Datenbanken anderer Pappelarten (z.B. POPEST, URL: http://sputnik.btk.fi/; PopulusDB, URL: http://www.populus.db.umu.se/; EUROFACE, URL: http://www.lukac.plus.com/euroface/; POOPWOOD, URL: http://www.isv.cnrs-gif.fr/cr/popwood/; COPOL, URL: http://www2.rhbnc.ac.uk/~uhbc0069/CopolWEB/copol.htm; POPYOMICS, URL: http://www.soton.ac.uk/~popyomic), welche die Genexpression unter bestimmten Bedingungen oder von bestimmten Geweben betrachten. Außerdem wurden Microarrays mit Pappelsequenzen entwickelt und für die

Expressionsanalyse eingesetzt. Auch wurde durch den Vergleich von 3 Pappelarten aus 3 Sektionen (*Populus euphratica* Sektion Turanga und *P. x canescens* Sektion Populus und *P. trichocarpa* Sektion Tacamahaca) der genetische Vergleich von 3 nahe verwandten Arten möglich.

1.1 Ziele der Arbeit

Auxin spielt eine bedeutende Rolle bei der Holzbildung und in der Entwicklung der ganzen Pflanze. Die mengenmäßige Steuerung erfolgt im Wesentlichen über die Konjugation an Aminosäuren, bzw die Hydrolyse der Auxinkonjugate durch spezielle Auxinamidohydrolasen. Es sollen daher im Rahmen dieser Arbeit folgende Punkte näher untersucht werden.

- Wirkungen von Auxintransportinhibitoren auf die Holzanatomie der Pappel.
- Fähigkeit verschiedener Pflanzenorgane von Pappel und *Arabidopsis*, angebotene Auxinamidokonjugate durch Hydrolysierung als Auxinquelle zu nutzen.
- Isolierung und Charakterisierung einiger Mitglieder aus der Genfamilie der Auxinamidohydrolasen.
- Nachweis der *in vivo* Funktionalität ausgewählter Auxinamidohydrolasen.
- Untersuchung, welche Pflanzenorgane der Pappel Transkripte von Auxinamidohydrolasen enthalten.
- Analyse des jahreszeitlichen Verlaufs der Expression ausgewählter Auxinamidohydrolasen im Kambium der Pappel.