

Technische Universität München

Lehrstuhl für Systembiologie der Pflanzen

Die Gibberellinsignaltransduktion bei *Arabidopsis thaliana* und ihr *Crosstalk* mit dem Auxintransport

Björn Christopher Willige

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. W. Liebl

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. C. Schwechheimer
2. Univ.-Prof. Dr. R. Hüchelhoven
3. apl. Prof. Dr. R. A. Torres Ruiz

Die Dissertation wurde am 04.10.2011 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 24.11.2011 angenommen.

„Zweifel ist die Essenz der Wissenschaft.“

Bertrand Russell

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis	IV
Abkürzungen	V
Zusammenfassung	1
Summary	2
1 Einleitung	3
1.1 Die Gibberellinsignaltransduktion	3
1.1.1 Gibberelline	3
1.1.2 DELLA-Proteine, Repressoren der GA-Signaltransduktion	4
1.1.3 Der GA-Rezeptor GID1	7
1.2 Auxin	9
1.2.1 Die Auxinsignaltransduktion	9
1.2.2 Der Auxintransport	10
1.2.3 Die Rolle der AGCVIII-Kinasen für den Auxintransport	12
1.3 Der GA-Auxintransport-Crosstalk	13
1.4 Zielsetzung dieser Arbeit	14
2 Material und Methoden	16
2.1 Materialien	16
2.1.1 Bakterienstämme	16
2.1.2 Pflanzenlinien und –mutanten	16
2.1.3 Primer	17
2.1.4 Vektoren	19
2.1.5 Antikörper	19
2.1.5 Chemikalien	19
2.1.6 Sonstige Materialien und Enzyme	21
2.1.7 Verwendete Software	21
2.2 Methoden	21
2.2.1 Pflanzenarbeiten	21
2.2.2 Physiologische Experimente	23
2.2.3 Histologische Untersuchungen	24
2.2.4 Molekularbiologische Methoden	25
2.2.5 Biochemische Methoden	27
3 Ergebnisse	31
3.1 Die Gibberellinsignaltransduktion	31
3.1.1 Die DELLA-Domäne ist notwendig für den GA-abhängigen Abbau der DELLA-Proteine	31
3.1.2 Der GA-abhängige Abbau der DELLA-Proteine erfordert den GA-Rezeptor GID1	35
3.2 GA-Auxin-Crosstalk: Die GA-abhängige Regulierung des Auxintransports und der PIN-Abundanz	38
3.2.1 In Gibberellinmutanten ist der Auxintransport reduziert	38
3.2.2 GA reguliert die Menge an PIN-Protein	39
3.2.3 GA-regulierte <i>PIN</i> -Transkription und PIN-Abundanz korrelieren nicht	43
3.2.4 GA-Defizienz fördert den Transport von PIN2 in die Vakuole	44
3.2.5 GA-Defizienz beeinträchtigt die Embryogenese	45
3.2.6 GA-Defizienz beeinträchtigt den Wurzelgravitropismus	46
3.3 GA-Auxin-Crosstalk: Die GA-abhängige Regulierung der <i>WAG2</i> -Expression und der Apikalhakenentwicklung	49
3.3.1 GA aktiviert die Transkription von <i>WAG2</i>	49
3.3.2 <i>WAG2</i> verzögert die Öffnung des Apikalhakens	50
3.3.3 GA ist notwendig für die <i>WAG2</i> -Expression innerhalb des Apikalhakens	52

3.3.4 Die Expression von <i>WAG2</i> wird PIF-abhängig reguliert	53
3.3.5 <i>WAG2</i> phosphoryliert die PIN-Auxintransporter	55
3.3.6 GA und <i>WAG2</i> sind an der Ausbildung des Auxinmaximums innerhalb des Apikalhakens beteiligt	57
4 Diskussion	60
4.1 Die Gibberellinsignaltransduktion	60
4.2 Der Crosstalk zwischen der Gibberellinsignaltransduktion und dem Auxintransport	68
4.2.1 Die GA-abhängige Regulierung des Auxintransports und der PIN-Abundanz	68
4.2.2 Die GA-abhängige Regulierung der <i>WAG2</i> -Expression und der Apikalhakenentwicklung	75
4.3 Schlussfolgerung	84
5 Quellenverzeichnis	86
Danksagung	
Anhang	
Willige et al., 2007	
Willige et al., 2011	

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Gibberelline steuern während des gesamten Lebenszyklus einer Samenpflanze eine Vielzahl von Wachstums- und Entwicklungsprozessen.	3
Abbildung 2: Domänenstruktur der DELLA-Proteine.	4
Abbildung 3: DELLA-Domänenmutationen aus verschiedenen Pflanzenspezies.	6
Abbildung 4: Modell der GA-Signaltransduktion.	8
Abbildung 5: Die Phänotypen der <i>gid1</i> -Mutanten.	8
Abbildung 6: Beispiele für auxinabhängige Wachstums- und Entwicklungsprozesse.	9
Abbildung 7: Modell für den Auxinin- und -efflux	10
Abbildung 8: Modell für den PIN-abhängigen Auxinfluss innerhalb der Wurzelspitze.	11
Abbildung 9: Modell für die Regulierung des PIN-abhängigen Auxinflusses durch die AGC3- und D6PK-Familie.	12
Abbildung 10: Die Expression der mutanten <i>gai</i> -Varianten führt zum Zwergwuchs von <i>Arabidopsis thaliana</i> .	32
Abbildung 11: Transgene <i>GAI:gai</i> -Linien zeigen eine GA-Insensitivität des Wachstums und der DELLA-Proteine.	33
Abbildung 12: GID1 ist notwendig für den GA-abhängigen Abbau der DELLA-Proteine.	36
Abbildung 13: Der reduzierte Auxintransport in GA-Biosynthese- und GA-Signaltransduktionsmutanten.	39
Abbildung 14: Zellbiologischer Nachweis der durch GA-Mangel verringerten PIN-Proteinabundanz.	40
Abbildung 15: Suppression der PIN:GFP-Abundanzreduzierung in <i>ga1</i> durch GA3.	41
Abbildung 16: Biochemischer Nachweis der durch GA-Mangel verringerten PIN-Proteinabundanz.	42
Abbildung 17: Die <i>PIN</i> -Transkription erklärt nicht die durch GA-Mangel hervorgerufene Reduzierung der PIN-Proteinmengen in Wurzelspitzen.	43
Abbildung 18: GA-Mangel fördert den vakuolären Abbau von PIN2.	44
Abbildung 19: GA-Biosynthese ist notwendig für die Keimblattentwicklung.	46
Abbildung 20: GA-Mangel beeinträchtigt den Wurzelgravitropismus.	47
Abbildung 21: Die Expression des AGC-Kinasegens <i>WAG2</i> wird durch GA und Licht reguliert.	49
Abbildung 22: <i>wag1</i> - und <i>wag2</i> -Mutanten zeigen keine veränderte Hypokotyllänge.	50
Abbildung 23: <i>WAG2</i> reguliert die Apikalhakenentwicklung.	51
Abbildung 24: Die Expression von <i>WAG2</i> in etiolierten Keimlingen ist GA-abhängig.	53
Abbildung 25: PIFs regulieren die Expression von <i>WAG2</i> .	54
Abbildung 26: <i>WAG2</i> phosphoryliert die PIN-Auxintransporter.	56
Abbildung 27: GA und <i>WAG2</i> regulieren das Auxinsignalmaximum innerhalb des Apikalhakens.	58
Abbildung 28: Die Interaktion zwischen den DELLA-Proteinen und GID1 ist Voraussetzung für den Ablauf der GA-Signaltransduktion.	61
Abbildung 29: Mechanismus des DELLA-Proteinabbaus.	62
Abbildung 30: Mögliche Suppressoren einer DELLA-Domänenmutation.	63
Abbildung 31: Die möglichen Funktionsweisen der Allele <i>Rht-B1b</i> und <i>Rht-D1b</i> aus Weizen.	65
Abbildung 32: Modell zur Regulierung der DELLA-Proteine RGA und GAI.	66
Abbildung 33: Mögliche Mechanismen der GA-abhängigen PIN2-Abundanzregulierung.	70
Abbildung 34: Modell zur Regulierung des Auxintransports durch die GA-Signaltransduktion.	72
Abbildung 35: Modell für die auxinabhängige Krümmung der Wurzelspitze und für die Veränderung der Wachstumsrichtung nach Gravistimulierung.	73
Abbildung 36: Modell für die Wurzelkrümmung aufgrund eines gewebespezifischen GA-Gehalts.	74
Abbildung 37: Modell für die GA-abhängige Regulierung der Apikaldominanz.	75
Abbildung 38: Schemata der Promotoren von <i>WAG1</i> und <i>WAG2</i> .	77

Abbildung 39: Umverteilung von PIN3 in Endodermiszellen des Hypokotyls.	78
Abbildung 40: Modell für die WAG2-abhängige Öffnung des Apikalhakens.	81
Abbildung 41: Modell zur GA-abhängigen Regulierung der Apikalhakenentwicklung.	82
Abbildung 42: Modell zum Crosstalk zwischen der GA-Signaltransduktion und dem Auxintransport.	84

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Arabidopsis-Mutantenallele.	16
Tabelle 2: Verwendete transgene Linien.	17
Tabelle 3: Primer für die Genotypisierung von Arabidopsis-Mutanten.	17
Tabelle 4: Primer für Klonierungen.	18
Tabelle 5: Primer für qRT-PCRs.	18
Tabelle 6: Verwendete Antikörper.	19
Tabelle 7: Verwendete Chemikalien.	19
Tabelle 8: Liste von weiteren Materialien und Enzymen, die genutzt wurden.	21
Tabelle 9: Liste der verwendeten Software.	21

Abkürzungen

6-BA	6-Benzylaminopurin
ABP1	AUXIN BINDING PROTEIN 1
ACC	1-Aminocyclopropan-1-carbonsäure
ACS5	ACC SYNTHASE 5
AFB1	AUXIN SIGNALING F-BOX 1
ALC	ALCATRAZ
ARF	AUXIN RESPONSE FACTOR
ATP	Adenosintriphosphat
Aux/IAA	AUXIN/INDOLE-3-ACETIC ACID
AUX1	AUXIN RESISTANT 1
AuxRE	<i>auxin response element</i>
CBB	Coomassie-Brillant-Blau
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CHX	Cycloheximid
CoIP	Co-Immunpräzipitation
Col-0	Columbia-0
ConA	Concanamycin A
COP1	CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC 1
CRY1	CRYPTOCHROME 1
Cs	<i>Cucumis sativus</i>
D6PK	D6 PROTEIN KINASE
d8	dwarf8
D8-Mpl	D8-Miniplant
DMF	N,N-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxyribonukleosid-Triphosphate
EDTA	Ethylendiaminetetraessigsäure
EE	<i>early endosomes</i>
G	Glykosylierung
GA	Gibberellin
GA1	<i>GA REQUIRING1</i>
GA3	Gibberellinsäure 3
GAI	GA INSENSITIVE
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GID1	GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF1
GM	<i>growth medium</i>
GST	Glutathion-S-Transferase
GUS	β -Glucuronidase
HA	Hämagglutinin
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethan-sulfonsäure
HKG	<i>house keeping gene</i>
HLS1	HOOKLESS 1
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
HY5	ELONGATED HYPOCOTYL 5
IES	Indol-3-essigsäure
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
JAZ1	JASMONATE-ZIM-DOMAIN PROTEIN 1
LAX1	LIKE AUX1 1
Ler	Landsberg <i>erecta</i>
MAX3	MORE AXILLARY GROWTH 3
MDR	MULTIDRUG RESISTANCE
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MS-Medium	Murashige & Skoog-Medium
NPA	N-1-Naphthylphthalaminsäure

ox	<i>overexpression</i>
P	Phosphorylierung
PAC	Paclobutrazol
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PGP	P-GLYCOPROTEIN
PHOT1	PHOTOTROPIN 1
phyA	phytochrome A
PI	Propidiumiodid
PID	PINOID
PIF1	PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR 1
PIL5	PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR 3-LIKE 5
PIN1	PIN-FORMED 1
PK3	Protein Kinase 3
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
<i>Ps</i>	<i>Pisum sativum</i>
PttPin1	Pin1 aus <i>Populus tremula</i> X <i>tremuloides</i>
PVC	<i>prevacuolar compartment</i>
(q)RT-PCR	(quantitative) Real Time-PCR
RGA	REPRESSOR OF <i>ga1-3</i>
RGL1	RGA-LIKE 1
Rht-A1a	Reduced height-A1a
RNA	Ribonukleinsäure
SCR	SCARECROW
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
SHY2	SHORT HYPOCOTYL 2
SKP2A	S-PHASE KINASE-ASSOCIATED PROTEIN 2A
Sln1	Slender1
SLR1	SLENDER RICE1
SLY	SLEEPY1
SLY1H	SLEEPY1 Homolog
SNE	SNEEZY
SNX1	SORTING NEXIN1
SPT	SPATULA
SPY	SPINDLY
<i>Ta</i>	<i>Triticum aestivum</i>
TAA1	TRYPTOPHAN AMINOTRANSFERASE OF ARABIDOPSIS 1
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TAR2	TRYPTOPHAN AMINOTRANSFERASE RELATED 2
T-DNA	Transfer-DNA
TGN	trans-Golgi-Netzwerk
TIR1	TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE 1
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UBC21	UBIQUITIN-CONJUGATING ENZYME 21
UTR	untranslatierte Region
VPS29	VACUOLAR PROTEIN SORTING 29
WAG2in	inaktive WAG2-Kinase
WEI8	WEAK ETHYLENE INSENSITIVE 8
WM	Wortmannin
X-Gluc	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-glucuronid
YFP	<i>yellow fluorescent protein</i>

Zusammenfassung

DELLA-Proteine sind die Repressoren der Gibberellinsignalübertragung bei Pflanzen. Während der GA-Antwort werden die DELLA-Proteine abgebaut und so deren Repressoraktivität aufgehoben. Es sind diverse GA-insensitive *Arabidopsis thaliana*-, *Triticum aestivum*-, *Zea mays*- und *Hordeum vulgare*-Mutanten bekannt, die Mutationen in der namensgebenden DELLA-Domäne tragen und einen unterschiedlich stark ausgeprägten Zwergwuchs aufweisen. Während die Arabidopsis- und Gerstemutanten zuvor bereits biochemisch charakterisiert worden waren, konnte ich hier zum ersten Mal zeigen, dass die Mutationen aus Weizen und Mais in einem einheitlichen genetischen Hintergrund zu einem gleichermaßen stark ausgeprägten Zwergwuchs sowie zur GA-Insensitivität des mutanten DELLA-Proteins führen. Dies erklärt die Phänotypen der Getreidemutanten, nicht aber deren unterschiedlich starke Ausprägung, dessen Ursache vermutlich in dem genetischen Hintergrund der jeweiligen Getreidemutanten zu suchen ist. Außerdem wurden in dieser Arbeit die Funktionsverlustmutanten der drei *GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF1 (GID1)*-Gene biochemisch charakterisiert, welche für die GA-Rezeptoren von *Arabidopsis thaliana* kodieren. Hierbei wurde die Stabilisierung der DELLA-Proteine REPRESSOR OF *ga1-3* (RGA) und GA INSENSITIVE (GAI) als die molekulare Ursache für die blockierte GA-Signaltransduktion der *gid1*-Tripelmutante identifiziert.

Eine Reihe von physiologischen Studien spricht dafür, dass es eine Hormonwechselwirkung zwischen der GA-Signaltransduktion und dem Auxintransport gibt. Dieser *Crosstalk* wurde hier untersucht. Ich konnte z.B. zeigen, dass diverse GA-Mutanten einen reduzierten Auxintransport aufweisen. Eine zellbiologische und biochemische Analyse von PIN-FORMED (PIN) Auxineffluxtransportern ergab, dass die Proteine posttranskriptionell durch GA reguliert werden. Zumindest im Fall von PIN2 fand ich, dass GA-Defizienz den vakuolären Abbau des Proteins fördert. Zusätzlich konnte ich durch genetische und physiologische Untersuchungen zeigen, dass GA mit der Regulierung der Embryogenese und des Wurzelgravitropismus PIN-abhängige Prozesse steuert, was die physiologische Bedeutung meiner Befunde untermauert. Außerdem konnte ich zeigen, dass das AGCVIII-Kinasegen *WAG2*, das an der Regulierung des Auxintransports beteiligt ist, durch GA, Licht, GAI und PHYTOCHROME INTERACTING FACTORS (PIFs) reguliert wird. Des Weiteren zeigen meine Untersuchungen, dass *WAG2* mit der Apikalhakenöffnung einen GA- und auxintransportkontrollierten Prozess steuert. Diese geht mit der *WAG2*-abhängigen Regulierung eines lokalen Auxinmaximums innerhalb des Hypokotylhakens einher. Somit liegt *WAG2* an einem Knotenpunkt der Gibberellin- und Lichtsignaltransduktion sowie des Auxintransports.

Summary

DELLA proteins are repressors of GA signaling in plants. During GA response DELLA proteins are degraded and so their repressive activity is relieved. Several GA insensitive mutants from *Arabidopsis thaliana*, wheat (*Triticum aestivum*), maize (*Zea mays*) and barley (*Hordeum vulgare*) are known. They all carry mutations in the DELLA domain of DELLA repressors and show differently severe dwarfed phenotypes. The Arabidopsis and barley mutants were previously characterized. Here, I have shown for the first time that in a homogenous genetic background the mutations from wheat and maize confer an equally dwarfed phenotype and lead to the synthesis of GA-insensitive DELLA proteins. This finding explains the dwarfism of the cereal mutants but not their divergent severity, which might be determined by the specific genetic background of the different cereal mutants. Additionally, in this work Arabidopsis mutants lacking the three GA INSENSITIVE DWARF1 (*GID1*) GA receptor genes were biochemically characterized. The molecular cause for the repressed GA signaling in the *gid1* triple mutant was found in the stabilization of the DELLA proteins REPRESSOR OF *ga1-3* (RGA) and GA INSENSITIVE (GAI).

Several physiological studies indicate the existence of an interaction between GA signaling and auxin transport. In my study I have analyzed this hormonal crosstalk. For example, I demonstrated that several GA mutants show reduced auxin transport. My cell biological and biochemical analyses of PIN-FORMED (PIN) auxin efflux transporters indicate a posttranscriptional PIN regulation by GA. At least in the case of PIN2, GA deficiency leads to an increased vacuolar degradation of the protein. Furthermore, I could show by genetic and physiological studies that GA regulates two PIN-dependent processes, namely embryogenesis and root gravitropism. In addition, I have shown that the expression of the AGCVIII kinase gene *WAG2*, that regulates auxin transport, is controlled by GA, light, GAI and PHYTOCHROME INTERACTING FACTORS (PIFs). Furthermore, my analyses show that *WAG2* regulates apical hook opening, which is a GA- and auxin transport-dependent developmental process. This hypocotyl hook opening is associated with the *WAG2*-dependent regulation of a local auxin maximum, indicating that *WAG2* defines a link between GA and light signaling as well as auxin transport.

1 Einleitung

1.1 Die Gibberellinsignaltransduktion

1.1.1 Gibberelline

Gibberelline (GAs) sind tetrazyklische Diterpenoide, die ursprünglich in dem pathogenen Pilz *Gibberella fujikuroi* identifiziert wurden (Akai, 1974). Dieser führt in befallenen Reispflanzen zu einem Symptom, das als *bakanae* (dummer Keimling) bezeichnet wird: Die Pflanze durchgeht ein starkes Streckungswachstum, das schließlich ein Umknicken des Sprosses bewirkt. Spätere Untersuchungen zeigten, dass Gibberelline auch von Pflanzen selbst synthetisiert werden. Derzeit sind über 130 verschiedene Gibberelline aus Pilzen, Bakterien und Pflanzen bekannt, aber nur GA₁, GA₃, GA₄ und GA₇ sind biologisch aktive Hormone in Pflanzen. Diese steuern eine Vielzahl von Wachstums- und Entwicklungsprozessen (Hedden und Phillips, 2000; MacMillan, 2001; <http://www.plant-hormones.info/gibberellins.htm>). Zum Beispiel fördern GAs die Keimung, das Streckungswachstum unterschiedlicher Gewebe, die Blütenbildung und -entwicklung sowie die Apikaldominanz (Abbildung 1; Richards et al., 2001). In den letzten Jahren

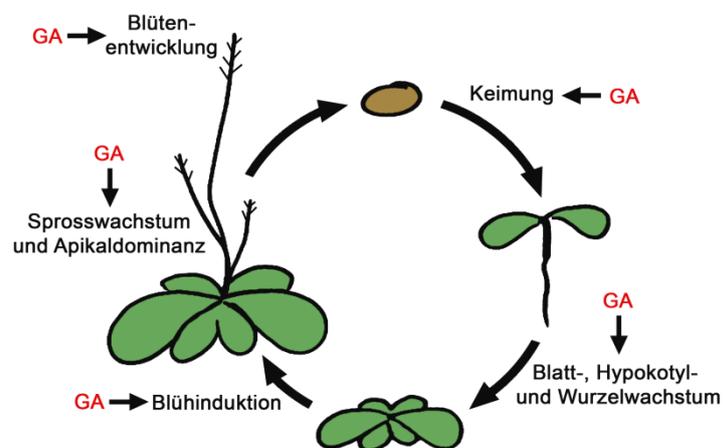


Abbildung 1: Gibberelline steuern während des gesamten Lebenszyklus einer Samenpflanze eine Vielzahl von Wachstums- und Entwicklungsprozessen.

konnten immer mehr durch GA regulierte Vorgängen identifiziert werden. Dazu gehören u.a. die Regulierungen der Skotomorphogenese, der Meristemaktivität und der Apikalhakenentwicklung sowie die Antwort auf biotischen und abiotischen Stress (Achard et al., 2003; Vriezen et al., 2004; Achard et al., 2006; Achard et al., 2007; Alabadí et al., 2008; Navarro et al., 2008; Achard et al., 2009; Ubeda-Tomás et al., 2009). Diese Vielzahl an unterschiedlichen Prozessen weist auf die essentielle Bedeutung von Gibberellinen für den Lebenszyklus einer Samenpflanze hin. Dafür sprechen auch die

Phänotypen von GA-Biosynthesemutanten, die sich durch GA-Gabe vollständig normalisieren lassen. Zum Beispiel katalysiert das Enzym *ent*-Copalyl-Diphosphatsynthase einen frühen Schritt der GA-Synthese und wird in *Arabidopsis thaliana* nur durch ein einziges Gen (*GA REQUIRING1* [*GA1*]) kodiert. *ga1*-Funktionsverlustmutanten sind dunkelgrüne, extrem zwergwüchsige Pflanzen, die nicht in der Lage sind, zu keimen oder fertile Blüten auszubilden (Koornneef und van der Veen, 1980; Sun und Kamiya, 1994).

1.1.2 DELLA-Proteine, Repressoren der GA-Signaltransduktion

Die DELLA-Proteine stellen Repressoren der GA-Signaltransduktion dar und wurden ursprünglich in *Arabidopsis thaliana* identifiziert (Peng et al., 1997; Silverstone et al., 1998). Das Genom von *Arabidopsis* kodiert für fünf hochhomologe DELLA-Proteine, die überlappende, aber auch unterschiedliche Funktionen ausüben. Dies lässt sich durch ihr abweichendes Expressionsmuster erklären (Lee et al., 2002; Wen und Chang, 2002; Tyler et al., 2004; Gallego-Bartolomé et al., 2010): *GA INSENSITIVE* (*GAI*) und *REPRESSOR OF ga1-3* (*RGA*) werden ubiquitär exprimiert, und beide DELLA-Proteine reprimieren das Streckungswachstum der verschiedenen Gewebe, steuern aber auch eine

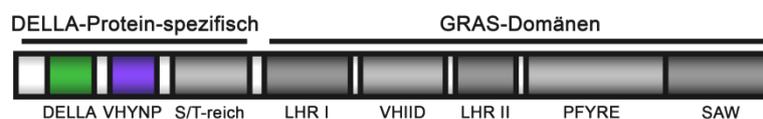


Abbildung 2: Domänenstruktur der DELLA-Proteine.

Der in allen DELLA-Proteinen konservierte N-Terminus besteht aus der namensgebenden DELLA-Domäne, der VHYNP-Domäne (die beide nach ihren fünf ersten Aminosäureresten benannt wurden) und einem Serin- und Threonin-reichen Abschnitt (S/T-reich). Der den GRAS-Proteinen gemeinsame C-Terminus setzt sich aus zwei Leucinheptadwiederholungen (LHR I und II) sowie den VHIIID-, PFYRE- und SAW-Domänen zusammen. Letztere sind nach mehr oder weniger stark konservierten Aminosäureresten in den Domänen benannt.

Vielzahl weiterer Prozesse (Dill und Sun, 2001; King et al., 2001). Die Transkription der *RGA-LIKE*-Gene *RGL1*, *RGL2* und *RGL3* ist vor allem in Samen, Blüten und Schoten aktiv, und dies deckt sich mit ihrer Beteiligung an der Inhibierung der Samenkeimung und der Beeinträchtigung der Blütenentwicklung (Lee et al., 2002; Tyler et al., 2004; Yu et al., 2004; Cao et al., 2005; Piskurewicz et al., 2008; Piskurewicz und Lopez-Molina, 2009; Piskurewicz et al., 2009). Somit blockieren die DELLA-Proteine durch GA geförderte Prozesse. Aufgehoben wird diese Repression durch die Aktivität von GA, die den Abbau dieser Proteine durch das 26S-Proteasom fördert. Die hierfür notwendige Ubiquitinierung der DELLA-Proteine wird in *Arabidopsis* hauptsächlich durch eine E3-Ubiquitinligase mit

dem F-box-Protein SLEEPY1 (SLY1) vermittelt (Fu et al., 2002; McGinnis et al., 2003; Dill et al., 2004; Fu et al., 2004; Schwechheimer et al., 2009). Teilweise ist aber auch das verwandte Protein SNEEZY (SNE) an diesem Prozess beteiligt (Strader et al., 2004; Ariizumi et al., 2011; Ariizumi und Steber, 2011).

Die DELLA-Proteine gehören zu einer Gruppe von pflanzenspezifischen Transkriptionsregulatoren, den GRAS-Proteinen (der Name setzt sich aus den ersten drei identifizierten Proteinen dieser Familie zusammen: GAI, RGA und SCR). Im Genom von Arabidopsis konnten 32 GRAS-Gene identifiziert werden. Die GRAS-Proteine verfügen über konservierte C-terminale Domänen, weisen aber einen variablen N-Terminus auf (Pysh et al., 1999; Bolle, 2004). In den DELLA-Proteinen sind die Domänen des N-Terminus ebenfalls konserviert (Abbildung 2). Dieser besteht aus der namensgebenden DELLA-Domäne, der VHYNP-Domäne sowie einer Serin- und Threonin-reichen Region. Dieser N-Terminus spielt eine wichtige Rolle für die Inaktivierung der DELLA-Proteine, da diverse Deletions- oder Aminosäureaustauschmutationen in der DELLA- und VHYNP-Domäne zu einem GA-insensitiven Wuchs führen. Dies äußert sich in der Arabidopsismutante *gai-1* in einer Akkumulierung von Chlorophyll, einem verzögerten Blühen, einer verringerten Apikaldominanz und einem Zwergwuchs (Koorneef et al., 1985). In dem Protein *gai* liegt eine Deletion von 17 Aminosäureresten in der DELLA-Domäne vor, die das Leseraster nicht verändert (Abbildung 3; Peng et al., 1997). Anhand transgener Linien konnte gezeigt werden, dass die so verkürzten sowie GFP-markierten GAI- und RGA-Proteine nicht durch GA-Gabe abgebaut werden (Dill et al., 2001; Fu et al., 2004).

Neben dem Arabidopsisallel *gai-1* sind verschiedene zwergwüchsige, GA-insensitive Getreidemutanten bekannt. Ein bedeutendes Beispiel sind Weizensorten, die seit den 1950er Jahren in großem Umfang in der Weizenzüchtung genutzt werden, und deren Einsatz einen starken Anstieg der weltweiten Weizenproduktion ermöglichte. Neben einem besonders hohen Ernteertrag verfügen diese Weizensorten über einen schwachen, GA-insensitiven Zwergwuchs, eine Eigenschaft, die aus der in Japan gezüchteten Weizensorte Norin 10 stammt (Hedden, 2003; Borojevic und Borojevic, 2005). Das verringerte Streckungswachstum gibt den Pflanzen eine höhere Stabilität, was Ernteauffälle bei widrigen Wetterbedingungen reduziert. Weizen (*Triticum aestivum*) verfügt über drei Chromosomensätze, die mit A, B und D bezeichnet werden und die jeweils für ein DELLA-Protein kodieren (Rht-A1a, Rht-B1a und Rht-D1a). In Norin 10 liegen Mutationen in zwei der drei DELLA-Loci vor, die im C-terminalen Bereich der DELLA-Domäne ein Stopcodon einfügen, ohne das Leseraster zu verändern. Dadurch kommt es vermutlich jeweils zur Synthese eines um die N-terminale DELLA-Domäne verkürzten DELLA-Proteins (Rht-B1b und Rht-D1b), das für den schwachen Zwergwuchs der Mutanten verantwortlich sein könnte (Abbildung 3; Peng et al., 1999b).

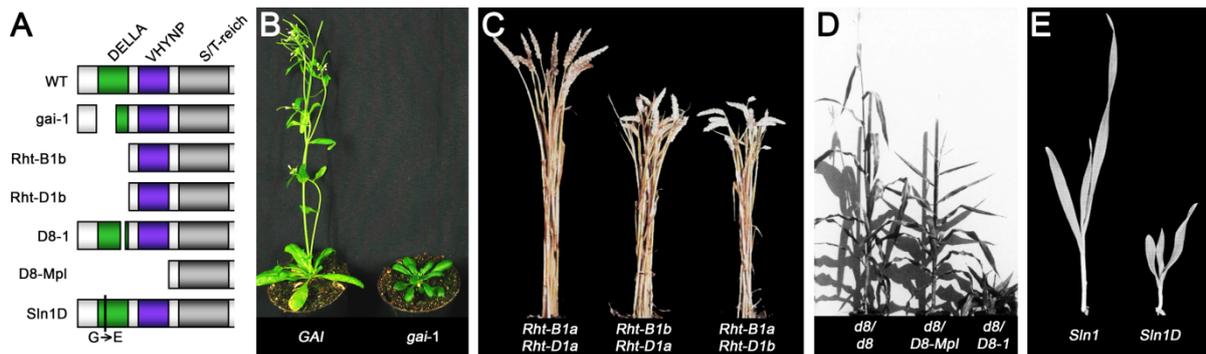


Abbildung 3: DELLA-Domänenmutationen aus verschiedenen Pflanzenspezies.

(A) Schematische Darstellung der N-Termini der in den unterschiedlichen DELLA-Domänenmutanten synthetisierten DELLA-Proteine.

(B) bis (E) Phänotypen der DELLA-Domänenmutanten aus Arabidopsis (B), Weizen (C), Mais (D) und Gerste (E).

Abbildungen (C) bis (E) stammen aus Peng et al., 1999b; Harberd und Freeling, 1989 und Chandler et al., 2002 und wurden leicht modifiziert.

Auch in Gerste (*Hordeum vulgare*) ist eine semidominante, zum Zwergwuchs führende DELLA-Domänenmutation bekannt (Abbildung 3). Dieses Allel verursacht keine vollständige, aber eine reduzierte GA-Sensitivität, die aufgrund eines Aminosäureaustauschs (G46E) innerhalb der DELLA-Domäne zustande kommt. Im Gegensatz zu den anderen hier beschriebenen Getreidemutanten wurde *Sln1D* biochemisch untersucht, und es konnte gezeigt werden, dass *Sln1D* im Gegensatz zum wildtypischen *Sln1*-Protein nach GA-Gabe verzögert abgebaut wird. Dies könnte die verringerte GA-Sensitivität der Mutante erklären (Chandler et al., 2002).

Das Genom von Mais (*Zea mays*) kodiert für die beiden DELLA-Proteine *d8* und *d9* (Lawit et al., 2010). Auch für *d8* sind DELLA-Domänenmutationen bekannt, welche zu einem GA-insensitiven Wuchs führen und nicht das Leseraster verändern. In *D8-1* liegt eine vier Aminosäurereste umfassende Deletion innerhalb der DELLA-Domäne vor (Peng et al., 1999b). Dieses Allel hat einen starken Zwergwuchs der Maispflanze zur Folge. Bei *D8-Mpl* handelt es sich um eine 330 bp umfassende Deletion, die dazu führt, dass die kodierende Sequenz dieses *d8*-Allels mit einem ATG-Codon am 3'-Ende der VHYNP-Domäne beginnt. Somit wird in dieser Mutante vermutlich ein DELLA-Proteinfragment ohne DELLA- sowie VHYNP-Domäne synthetisiert (Peng et al., 1999b). Auffällig ist, dass diese umfangreiche Deletion im Gegensatz zum *D8-1*-Allel nur zu einem schwachen GA-insensitiven Zwergwuchs führt. So verfügt *d8/D8-Mpl* im Vergleich mit *d8/d8* über eine Sprosshöhe von 71%, während *d8/D8-1*-Pflanzen nur eine Höhe von 22% aufweisen (Abbildung 3; Harberd und Freeling, 1989). Dies zeigt, dass zwischen dem Ausmaß der DELLA-Domänenmutation und der Beeinträchtigung des Streckungswachstums keine direkte Korrelation existiert. Daher galt es, in meiner Arbeit zu untersuchen, wie sich die unterschiedlichen Mutationen auf die repressorischen Eigenschaften der DELLA-Proteine auswirken (siehe 3.1).

Wie oben erwähnt, verfügen nicht nur die DELLA-Repressoren, sondern alle GRAS-Proteine über einen konservierten C-Terminus. Dieser umfasst zwei Leucinheptadwiederholungen, welche durch die VHIID-Domäne voneinander getrennt sind, sowie die PFYRE- und SAW-Domäne (Abbildung 2). Mutationen innerhalb dieses C-Terminus führen meist zu einem Funktionsverlust der DELLA-Proteine und so zu einer Aktivierung der GA-Signaltransduktion (Hirano et al., 2010). Zum Beispiel wurden *rga*-Mutationen als Suppressoren von *ga1-3* identifiziert (Silverstone et al., 1997; Silverstone et al., 1998). Daher dient der C-Terminus vor allem der Repression der GA-Signaltransduktion. Wie dies funktioniert, war lange Zeit unklar. Zwar sind die DELLA-Proteine im Zellkern lokalisiert, verfügen aber über keine bekannte DNA-Bindedomäne. Es konnte aber in Arabidopsis gezeigt werden, dass die DELLA-Repressoren mit anderen Proteinen interagieren und so deren Aktivität inhibieren. Bisher konnte die Interaktion mit zwölf Transkriptionsregulatoren nachgewiesen werden. Dazu gehören mit den meisten PHYTOCHROME INTERACTING FACTORS (PIF1, 3, 4, 5 und 6) sowie SPATULA (SPT) und ALCATRAZ (ALC) *basic-helix-loop-helix*-Transkriptionsfaktoren, die u.a. die Keimung, die Skotomorphogenese und das Öffnen der Schoten regulieren (de Lucas et al., 2008; Feng et al., 2008; Arnaud et al., 2010; Gallego-Bartolomé et al., 2010; Gallego-Bartolomé et al., 2011; Josse et al., 2011). Des Weiteren binden die DELLA-Proteine an unterschiedliche Transkriptionsregulatoren: Durch die Interaktion mit SCARECROW-LIKE 3 und ENHYDROUS regulieren die DELLA-Proteine die GA-Signaltransduktion, während die Bindung an JASMONATE-ZIM-DOMAIN-Proteine (JAZ1, JAZ3 und JAZ9) der Aktivierung des Jasmonsäuresignalweges dient (Feurtado et al., 2011; Heo et al., 2011; Hou et al., 2011; Zhang et al., 2011).

1.1.3 Der GA-Rezeptor GID1

Das Gen *GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF1* (*GID1*) wurde zuerst in Reis (*Oryza sativa*) identifiziert (Ueguchi-Tanaka et al., 2005). Die Sequenz von GID1 ist homolog zu denen von hormonsensitiven Lipasen. Das Protein verfügt aber aufgrund einer Mutation in der katalytischen Triade über keine enzymatische Aktivität. Die Analyse der *gid1*-Mutanten und des GID1-Proteins zeigte, dass es sich bei GID1 um einen GA-Rezeptor handelt: So verfügen Funktionsverlustmutanten über einen GA-insensitiven Zwergwuchs. Des Weiteren ist *SLENDER RICE1* (kodiert für das einzige DELLA-Protein in Reis) epistatisch zu *GID1* (*slr1* supprimiert den *gid1*-Phänotyp) und das DELLA-Protein wird nicht nach Gabe von GA in *gid1* abgebaut. Außerdem konnte gezeigt werden, dass das lösliche, vor allem im Zellkern lokalisierte GID1-Protein in der Lage ist, GA zu binden und in Gegenwart von GA mit SLR1 zu interagieren. Aus diesen Untersuchungen ergibt sich das in Abbildung 4 dargestellte Modell.

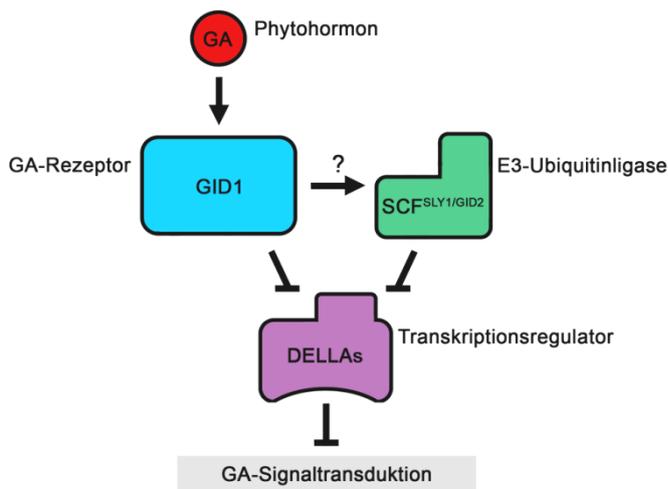


Abbildung 4: Modell der GA-Signaltransduktion.

Der durch GA aktivierte GA-Rezeptor GID1 sowie die E3-Ubiquitinligase SCF^{S^{LY1}} bzw. SCF^{GID2} (GID2 ist das zu SLY1 homologe F-box-Protein in Reis) sind in der Lage, mit den DELLA-Proteinen zu interagieren und deren Abbau einzuleiten. Dieser hebt die Repression der GA-Signaltransduktion auf, worauf der Ablauf GA-abhängiger Wachstums- und Entwicklungsprozesse erfolgt.

Dieser bedeutende Fund in Reis brachte zu Tage, warum in Arabidopsis bis dahin keine GA-Rezeptormutanten identifiziert werden konnten. Das Genom von Arabidopsis kodiert für drei GID1-Proteine, GID1a, GID1b und GID1c, die in der Lage sind, GA zu binden (Nakajima et al., 2006). Unsere Arbeitsgruppe gehörte zu den ersten, die *gid1*-Mutanten charakterisierte. So konnten Claus Schwechheimer und Carola Nill zeigen, dass Einzelmutanten über keine offensichtliche Beeinträchtigung des GA-abhängigen Wachstums verfügen, was für eine hohe funktionelle Redundanz der drei Gene spricht.



Abbildung 5: Die Phänotypen der *gid1*-Mutanten.

gid1-Einzelmutanten zeigen keinen Phänotyp. Von allen Doppelmutanten weist *gid1a gid1c* die stärkste Beeinträchtigung des Streckungswachstums auf. *gid1*-Tripelmutanten sind vollständig GA-insensitiv. Dies äußert sich in einem extremen Zwergwuchs und einer ausbleibenden Blütenbildung.

Das abgebildete Photo stammt von Claus Schwechheimer (Willige et al., 2007).

Dahingegen weisen Doppelmutanten eine verringerte Keimungsfähigkeit und ein reduziertes Streckungswachstum auf, aber nur die Tripelmutante zeigt nach GA-Gabe keine Wachstumsreaktion. Außerdem sind die Samen der Mutante ohne manuelle Öffnung der Samenschale nicht keimungsfähig. Weiter zeigen die Pflanzen einen extremen Zwergwuchs und bilden keine Blüten aus (Abbildung 5; Willige et al., 2007). Diese Untersuchungen sprechen dafür, dass *gid1*-Tripelmutanten vollständig GA-

insensitiv sind, klären aber noch nicht die dafür verantwortliche molekulare Ursache auf. Aus diesem Grund wurden die GA-Rezeptormutanten in der vorliegenden Arbeit biochemisch analysiert (siehe 3.1).

1.2 Auxin

1.2.1 Die Auxinsignaltransduktion

Das Phytohormon Auxin reguliert nahezu alle Aspekte des Wachstums und der Entwicklung von Samenpflanzen. Dazu gehören u.a. die Embryo- und Organogenese, die Apikalhakenentwicklung, der Gravitropismus sowie die Apikaldominanz (Abbildung 6; Thimann und Skoog, 1933; Okada et al., 1991; Bennett et al., 1996; Lehman et al., 1996; Muller et al., 1998; Friml et al., 2003). Das häufigste Auxin ist Indol-3-Essigsäure,

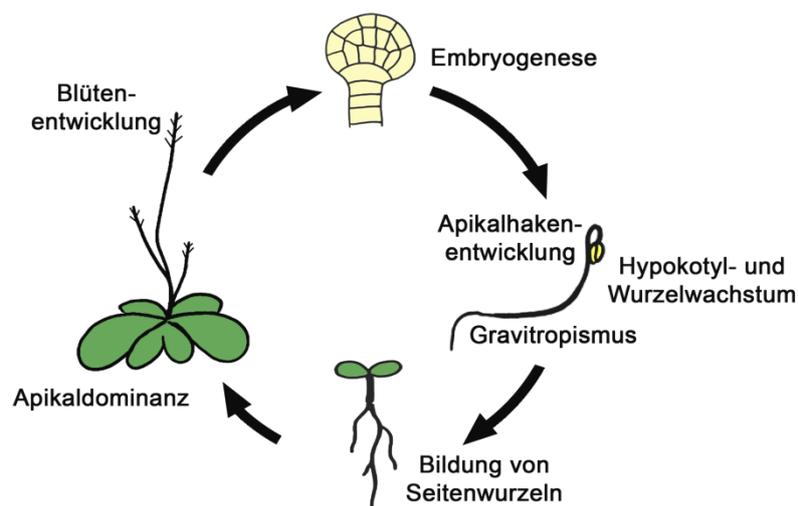


Abbildung 6: Beispiele für auxinabhängige Wachstums- und Entwicklungsprozesse.

welche vor allem im Spross- und Wurzelapex sowie in jungen Blättern über Tryptophan-abhängige und -unabhängige Synthesewege produziert wird (Ljung et al., 2001; Ljung et al., 2005; Petersson et al., 2009; Normanly, 2010). In Arabidopsis existieren mindestens drei Auxinrezeptorsysteme. Die F-box-Proteine TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE 1 (TIR1) sowie die AUXIN SIGNALING F-BOX-Proteine (AFBs) sind die am intensivsten untersuchten Auxinrezeptoren und steuern die auxinabhängige Transkription. Die Bindung von Auxin ermöglicht ihnen mit AUXIN/INDOLE-3-ACETIC ACID-Proteinen (Aux/IAAs) zu interagieren und so deren Abbau einzuleiten (Gray et al., 2001; Dharmasiri et al., 2003; Kepinski und Leyser, 2004; Dharmasiri et al., 2005a; Dharmasiri et al., 2005b; Tan et al., 2007). Aux/IAAs bilden mit AUXIN RESPONSE FACTOR-Transkriptionsfaktoren (ARFs) Heterodimere. Der Abbau der Aux/IAAs führt zur

Freisetzung und damit zur Aktivierung der ARFs, die in der Lage sind, die Transkription von Genen zu induzieren oder zu reprimieren (Ulmasov et al., 1997a; Ulmasov et al., 1997b; Guilfoyle und Hagen, 2007; Vernoux et al., 2011). Auch ein anderes F-box-Protein ist in der Lage Auxin zu binden: S-PHASE KINASE-ASSOCIATED PROTEIN 2A (SKP2A) leitet den Abbau von Transkriptionsfaktoren ein und reguliert so die Zellteilung (Jurado et al., 2010). Daneben existiert mit AUXIN BINDING PROTEIN 1 (ABP1) ein weiterer löslicher Auxinrezeptor. Funktionsverlustmutanten von *ABP1* sind embryoletal, was die Bedeutung des u.a. an der Steuerung der Zytoskelettanordnung und der Endozytose beteiligten Rezeptors unterstreicht (Chen et al., 2001; Robert et al., 2010; Xu et al., 2010).

1.2.2 Der Auxintransport

Von entscheidender Bedeutung für die Regulierung auxinabhängiger Prozesse ist es, dass Auxin vom Ort der Synthese zum Zielgewebe aktiv transportiert wird. So entstehen lokale Auxingradienten, -minima und -maxima, die innerhalb von Geweben und Zellen in eine entsprechende Antwort umgewandelt werden (Friml et al., 2002; Benková et al., 2003; Friml et al., 2003; Ottenschläger et al., 2003; Sorefan et al., 2009). Das im Sprossapex und jungen Blättern synthetisierte Auxin wird im Parenchym der Leitbündel basipetal entlang des Sprosses transportiert. In der Wurzel erfolgt der acropetale Transport innerhalb der Stele, und vom Wurzelapex ausgehend wird Auxin in der seitlichen Wurzelhaube und der Epidermis basipetal weitergeleitet (Moore, 2002). Die nur innerhalb des relativ sauren Apoplasten protonierte und somit apolare Indol-3-Essigsäure ist in der Lage durch Diffusion in Zellen einzudringen (Rubery und Shelldrake, 1973, 1974; Raven, 1975). Daneben existieren verschiedene in der Zellmembran lokalisierte

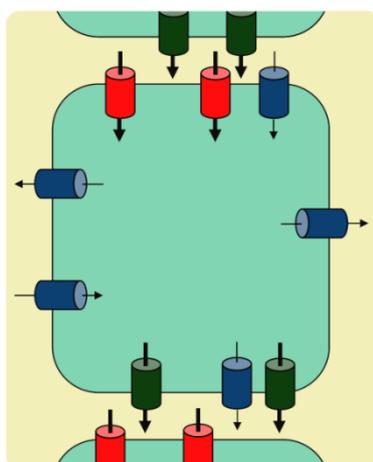


Abbildung 7: Modell für den Auxinin- und -efflux

Neben der Diffusion der protonierten Indol-3-Essigsäure (nicht abgebildet) wird Auxin durch die Aktivität von AUX1, LAX1, LAX2 und LAX3 (in rot) sowie PGP4 in die Zelle hineintransportiert. PGPs (blau dargestellt) und PIN-Proteine (in dunkelgrün) steuern den Auxinefflux in den Apoplasten.

Transportsysteme, welche Auxin aktiv in die Zelle oder aus dieser heraus transportieren (Abbildung 7). Bei AUXIN RESISTANT 1 (AUX1) und den verwandten LIKE AUX1-Proteinen (LAX1, 2 und 3) handelt es sich um Auxinfluxtransporter (Bennett et al., 1996; Marchant et al., 1999; Yang et al., 2006; Bainbridge et al., 2008; Swarup et al., 2008). Auch einige Mitglieder der MULTIDRUG RESISTANCE/P-GLYCOPROTEIN-Familie (MDRs/PGPs) sind in der Lage Auxin zu transportieren. So stellen PGP1 und PGP19 Effluxtransporter dar, während PGP4 Influx- sowie Effluxaktivität aufweist (Geisler et al., 2005; Terasaka et al., 2005; Geisler und Murphy, 2006; Petrásek et al., 2006; Cho et al., 2007; Yang und Murphy, 2009). Von besonderer Bedeutung für den Auxintransport ist die PIN-FORMED-Familie (PINs). Bei PIN1, 2, 3, 4 und 7 handelt es sich um Auxineffluxtransporter, die aufgrund ihrer polaren Lokalisierung innerhalb der Zellmembran die Richtung des Auxinflusses bestimmen (Galweiler et al., 1998; Friml et al., 2002; Benková et al., 2003; Friml et al., 2003; Grieneisen et al., 2007; Kleine-Vehn et al., 2010). Dies ist innerhalb der Wurzelspitze am besten untersucht (Abbildung 8). So

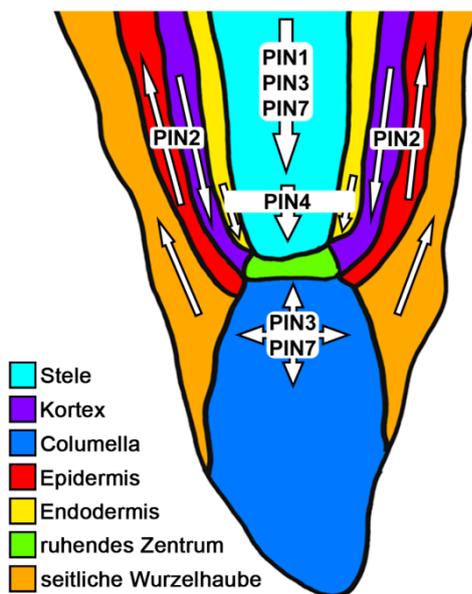


Abbildung 8: Modell für den PIN-abhängigen Auxinfluss innerhalb der Wurzelspitze.

Die dargestellten Pfeile geben die Lokalisierung der PIN-Proteine sowie die Richtung des Auxinflusses innerhalb der verschiedenen Gewebe der Wurzelspitze an. Das dargestellte Modell orientiert sich an Kleine-Vehn und Friml, 2008.

sind PIN1, PIN3, PIN4 und PIN7 innerhalb der Stele basal (d.h. in Richtung des Wurzelapex zeigend) lokalisiert, wodurch ein acropetaler Auxintransport zustande kommt. Innerhalb der Kolumella liegen PIN3 und PIN7 apolar vor, was zu einer gleichmäßigen Verteilung des Auxins in diesem Gewebe führt. Die basale Lokalisierung von PIN2 innerhalb der Kortexzellen führt hier zu einem acropetalen Auxintransport, wohingegen das Protein in der seitlichen Wurzelhaube und der Epidermis apikal vorliegt (d.h. in Richtung des Sprossapex zeigend) und so einen basipetalen Auxinfluss innerhalb der äußeren Gewebe der Wurzelspitze erzeugt. Die polare Lokalisierung der PIN-Proteine ist die Voraussetzung für die Steuerung von auxinabhängigen Prozessen wie Wurzelmeristemwachstum und Wurzelgravitropismus (Müller et al., 1998; Ottenschläger

et al., 2003; Blilou et al., 2005; Grieneisen et al., 2007; Kleine-Vehn et al., 2010).

Da eine Vielzahl von auxintransportabhängigen Prozessen ebenfalls durch GA gesteuert werden (z.B. Apikaldominanz, Streckungswachstum und Apikalhakenentwicklung), könnte die Wechselwirkung beider Phytohormone von essentieller Bedeutung für die Entwicklung von Samenpflanzen sein. Daher beschäftigt sich meine Arbeit mit der Aufklärung solcher Wechselwirkungen in Arabidopsis (siehe 3.2 und 3.3).

1.2.3 Die Rolle der AGCVIII-Kinasen für den Auxintransport

Die pflanzlichen AGC-Kinasen sind Serin/Threonin-Kinasen, und sie wurden aufgrund ihrer Verwandtschaft zur cAMP-abhängigen Kinase, zur cGMP-abhängigen Kinase und zur phospholipidabhängigen Kinase C aus Säugern und Hefen benannt. Basierend auf der Sequenz ihrer katalytischen Domänen erfolgt die Einteilung der AGC-Kinasen aus Arabidopsis in mehrere Gruppen (Bogre et al., 2003; Galvan-Ampudia und Offringa, 2007). Für die Regulierung des Auxintransports spielt die 23 Kinasen umfassende AGCVIII-Familie eine besondere Rolle, da diverse AGCVIII-Kinasen auxintransportabhängige Wachstums- und Entwicklungsprozesse steuern. Drei AGCVIII-Unterfamilien wurden bisher am intensivsten untersucht: Die AGC3-Unterfamilie, zu der PINOID (PID), PID2, WAG1 und WAG2 gehören, die D6PK-Familie sowie die Phototropine (PHOT1 und 2). PID, WAG1 und WAG2 sind an der Zellmembran lokalisiert und steuern durch die Phosphorylierung der PINs, die PIN-Polarität und damit die Richtung des Auxinflusses (Abbildung 9). Dies zeigt sich in *PID*-, *WAG1*- und *WAG2*-Überexpressoren in einer Apikalisierung von (im Wildtyp) basal lokalisierten PINs (Friml et al., 2004; Dhonukshe et al., 2010). Funktionsverlustmutanten der AGC3-Unterfamilie weisen eine

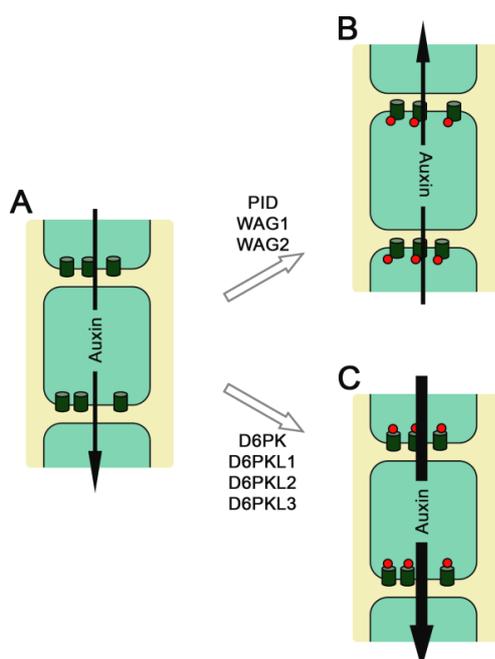


Abbildung 9: Modell für die Regulierung des PIN-abhängigen Auxinflusses durch die AGC3- und D6PK-Familie.

(A) Die unphosphorylierten PIN-Proteine (dunkelgrün) sind basal lokalisiert und zeigen eine reduzierte Auxintransportaktivität.

(B) Die Phosphorylierung (rot) durch PID, WAG1 und WAG2 führt zu einer Veränderung der PIN-Polarität und damit zu einer Richtungsänderung des Auxineffluxes.

(C) Durch die D6PKs phosphorylierte PINs verfügen über eine erhöhte Auxintransportaktivität, ohne eine veränderte Polarität aufzuweisen.

gestörte Embryogenese und Sprossdifferenzierung sowie einen beeinträchtigten Gravi- und Phototropismus auf (Christensen et al., 2000; Benjamins et al., 2001; Friml et al., 2004; Cheng et al., 2008; Dhonukshe et al., 2010; Ding et al., 2011). Auch Mitglieder der in unserem Labor charakterisierten D6PK-Familie phosphorylieren die PIN-Proteine und sind an der Steuerung der Embryogenese, der Seitenwurzelbildung, der Sprossdifferenzierung sowie des Gravitropismus beteiligt. Im Gegensatz zu PID, WAG1 und WAG2 regulieren D6PKs nicht die PIN-Polarität, sondern scheinbar die Stärke des Auxinflusses (Abbildung 9; Zourelidou et al., 2009; Dhonukshe et al., 2010).

Die Phototropine sind Blaulichtrezeptoren und steuern mit dem Phototropismus mindestens einen auxintransportabhängigen Prozess (Liscum und Briggs, 1995; Huala et al., 1997; Briggs et al., 2001; Sakai et al., 2001). Eine Phosphorylierung der PINs durch die PHOTs konnte bisher nicht nachgewiesen werden, jedoch ist PHOT1 in der Lage, den Auxintransporter PGP19 posttranslational zu modifizieren (Christie et al., 2011; Ding et al., 2011). Andere bisher weniger gut charakterisierte AGCVIII-Kinasen sind ebenfalls an der Regulierung von auxinabhängigen Abläufen beteiligt: So regulieren AGC1-5, 1-6 und 1-7 das polare Wachstum der Pollenschläuche bzw. der Wurzelhaare (Won et al., 2009; Zhang et al., 2009). All diese Beispiele untermauern die Bedeutung der AGCVIII-Kinasen für die Steuerung von auxintransportabhängigen Prozessen. Welche Rolle diese Proteine für die GA-regulierte Entwicklung von *Arabidopsis* einnehmen, ist bisher nicht bekannt. Daher wurde dies in der vorliegenden Arbeit untersucht (siehe 3.3).

1.3 Der GA-Auxintransport-Crosstalk

Eine Reihe von physiologischen Studien spricht dafür, dass es eine Hormonwechselwirkung (*Crosstalk*) zwischen der GA-Signaltransduktion und dem Auxintransport gibt. So gab es schon in den 1960er Jahren physiologische Studien in Erbse (*Pisum sativum*), die einen durch GA geförderten Auxintransport und eine so stimulierte Apikaldominanz aufzeigten (Jacobs und Case, 1965; Scott et al., 1967). Neuere Untersuchungen zeigen eine ähnliche Wechselwirkung in Pappel (*Populus tremula* X *tremuloides*): Hier stimuliert GA-Gabe den Auxintransport (und die *PttPin1*-Transkription) im Sprossgewebe (Björklund et al., 2007), während GA-Defizienz das Gegenteil bewirkt (Mauriat et al., 2011). GA-abhängige Auxintransportmessung in *Arabidopsis* existieren nicht, obwohl die Vielzahl an GA-Biosynthese- und GA-Signaltransduktionsmutanten ein sehr gutes Werkzeug zur Entschlüsselung des *Crosstalks* darstellen würde. Dies könnte darin begründet sein, dass Auxin in *Arabidopsis* die GA-Signaltransduktion stimuliert, und daher möglicherweise die Sichtweise bestand, dass es eine einfache lineare Verbindung statt einer gegenseitigen Wechselwirkung zwischen den beiden Phytohormonen gibt. So wurde in einer Studie gezeigt, dass ein

reduzierter Auxintransport das DELLA-Protein RGA stabilisiert und somit das Wurzelwachstum reprimiert (Fu und Harberd, 2003). Ursache dafür könnte eine auxinabhängige Aktivierung von GA-Synthesegenen sein, wie sie zuerst in Erbse beschrieben wurde, die aber auch in Arabidopsis existiert (Ross et al., 2000; O'Neill und Ross, 2002; Frigerio et al., 2006; O'Neill et al., 2010). Dagegen sprechen neuste Untersuchungen auch für eine GA-abhängige, transkriptionelle Steuerung des Auxintransports. So deuten Studien in Pappel darauf hin, dass GA-Mangel durch Aktivierung der *PIN*-Expression die Seitenwurzelbildung fördert (Gou et al., 2010). Umgekehrt wurde in Arabidopsis ein Modell vorgeschlagen, in dem GA-Defizienz in der Übergangszone des Wurzelmeristems die *PIN*-Transkription und damit das Meristemwachstum reprimiert (Moubayidin et al., 2010). Auch eine GA-stimulierte *PIN*-Expression innerhalb des Apikalhakens wurde diskutiert (Gallego-Bartolomé et al., 2011). Allerdings beschränken sich alle bisherigen Studien auf die Quantifizierung der *PIN*-Transkription. Eine GA-abhängige Analyse von Auxintransportproteinen wurde bisher noch in keiner Spezies durchgeführt. Aufgrund dessen habe ich in meiner Arbeit untersucht, ob und auf welche Weise GA die PIN-Proteine reguliert (siehe 3.2).

1.4 Zielsetzung dieser Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit bestand darin, die Funktion der DELLA-Domäne für die GA-Signaltransduktion zu untersuchen und Mechanismen der GA-abhängigen Regulierung des Auxintransports aufzudecken.

Wie in 1.1.2 dargestellt, waren DELLA-Domänenmutationen aus diversen Pflanzenspezies beschrieben worden. Für die in *gai-1* aus Arabidopsis vorliegende Mutation war gezeigt worden, dass sie zu einer Insensitivität des DELLA-Proteins gegenüber GA-abhängigem Abbau führt. Damit ergab sich die Fragestellung, ob der Abbau der uncharakterisierten DELLA-Proteinmutanten aus anderen Spezies ebenfalls gestört ist. Des Weiteren konnte zwischen dem Ausmaß der verschiedenen DELLA-Domänenmutationen und den damit verbundenen Phänotypen keine direkte Korrelation beobachtet werden. Dies warf die Frage auf, ob die Art der Mutation oder der entsprechende genetische Hintergrund für diese fehlende Korrelation verantwortlich ist. Um diese beiden Fragestellungen zu beantworten, wurden im Vorfeld dieser Arbeit die entsprechenden DELLA-Domänenmutationen in einen einheitlichen genetischen (*Arabidopsis thaliana*) und biochemischen (GAI) Hintergrund eingebracht. Meine Aufgabe bestand darin, die beiden oben genannten Fragestellungen durch die phänotypische und biochemische Analyse dieser transgenen Linien zu beantworten. Des Weiteren sollten GA-Rezeptormutanten von Arabidopsis biochemisch charakterisiert werden, um so die molekulare Ursache für die blockierte GA-Signaltransduktion in der *gid1*-Tripelmutante zu identifizieren.

Des Weiteren setzte ich mich damit auseinander, wie der GA-Signalweg das pflanzliche Wachstum reguliert. Hierzu habe ich den Auxintransport und seine GA-abhängige Kontrolle untersucht. Dazu wurde zuerst der Auxintransport in verschiedenen GA-Mutanten gemessen. Diese Analyse ergab, dass sowohl eine reprimierte GA-Biosynthese als auch eine reprimierte GA-Signaltransduktion den Auxintransport beeinträchtigen. Um die dafür verantwortliche molekulare Ursache aufzudecken, wurden Auxintransportproteine mittels zellbiologischer und biochemischer Ansätze untersucht und die Ursache für deren GA-abhängige Regulierung aufgedeckt. Außerdem wurde die Beteiligung des GA-Signalwegs an auxintransportabhängigen Prozessen analysiert, um den Crosstalk der beiden Mechanismen auf Entwicklungsebene zu studieren.

Diverse AGCVIII-Kinasen sind an der Kontrolle von PIN-regulierten Prozessen beteiligt. Um weitere Einblicke in den *Crosstalk* zwischen der GA-Signaltransduktion und dem Auxintransport zu erhalten, sollten GA-regulierte AGCVIII-Kinasen identifiziert und deren Rolle für die GA- und auxingesteuerte Entwicklung von Arabidopsis untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Bakterienstämme

Folgende *Escherichia coli*-Stämme (Invitrogen) wurden im Rahmen dieser Arbeit verwendet: DH5α (Genotyp: F⁻ Φ80*lacZ*ΔM15 Δ(*lacZYA-argF*) U169 *recA1 endA1 hsdR17* (rK⁻, mK⁺) *phoA supE44 λ- thi-1 gyrA96 relA1*; Bethesda Research Laboratories, 1986) wurde für Klonierungen und die Vermehrung von Plasmiden verwendet. Im Falle von Gateway-Vektoren wurde DB3.1 (Genotyp: F⁻ *gyrA462 endA1 Δ(sr1-recA) mcrB mrr hsdS20*(rB⁻, mB⁻) *supE44 ara-14 galK2 lacY1 proA2 rpsL20*(SmR) *xyl-5 λ- leu mtI1* ; Hartley et al., 2000) zur Vermehrung genutzt. BL21 (DE3 [Genotyp: F⁻ *ompT hsdSB*(rB⁻, mB⁻) *gal dcm* (DE3); Studier und Moffatt, 1986]) diente zur Gewinnung von rekombinanten Proteinen. Für die Transformation von *Arabidopsis* wurde der *Agrobacterium tumefaciens*-Stamm GV3101 (pMP90 [Koncz und Schell, 1986]) genutzt.

2.1.2 Pflanzenlinien und –mutanten

Für alle beschriebenen Experimente mit Pflanzen wurden die Ökotypen Columbia-0 sowie Landsberg *erecta* der Spezies *Arabidopsis thaliana* verwendet.

Tabelle 1: Verwendete Arabidopsis-Mutantenallele.

Name	Locus	Beschrieben in
<i>ga1</i> (Salk_109115)	<i>At4g02780</i>	Willige et al., 2007
<i>gai-1</i>	<i>At1g14920</i>	Koornneef et al., 1985
<i>gid1a-1</i> (Salk_044317)	<i>At3g05120</i>	Willige et al., 2007
<i>gid1b-1</i> (SM_3_30227)	<i>At3g63010</i>	Willige et al., 2007
<i>gid1c-2</i> (Gabi_639F05)	<i>At5g27320</i>	Willige et al., 2007
<i>pif1-1 = pil5-2</i> (Salk_131872)	<i>At2g20180</i>	Huq et al., 2004
<i>pif1-2 = pil5-1</i> (Salk_072677)	<i>At2g20180</i>	Huq et al., 2004
<i>pif3-3</i>	<i>At1g09530</i>	Monte et al., 2004
<i>pif4-101</i> (Garlic_114_G06)	<i>At2g43010</i>	Lorrain et al., 2008
<i>pif4-2</i> (Sail_1288_E07)	<i>At2g43010</i>	Leivar et al., 2008
<i>pif5-2</i> (Salk_072306)	<i>At3g59060</i>	Khanna et al., 2007
<i>pif5-3 = pil6-1</i> (Salk_087012)	<i>At3g59060</i>	Fujimori et al., 2004
<i>pin1</i> (Salk_047613)	<i>At1g73590</i>	Zourelidou et al., 2009
<i>pin2</i> (Salk_042899)	<i>At5g57090</i>	Willige et al., 2011
<i>pin3-4</i> (Salk_038609)	<i>At1g70940</i>	Zadnikova et al., 2010
<i>sly1-10</i>	<i>At4g24210</i>	Steber und McCourt, 2001
<i>wag1-1</i> (Salk_002056)	<i>At1g53700</i>	Santner und Watson, 2006
<i>wag1-2</i> (Salk_102906)	<i>At1g53700</i>	Santner und Watson, 2006
<i>wag2-1</i> (Salk_070240)	<i>At3g14370</i>	Santner und Watson, 2006

Tabelle 2: Verwendete transgene Linien.

Name	Beschrieben in
<i>35S:GID1A:GFP</i>	Willige et al., 2007
<i>35S:PIF5:HA</i>	Lorrain et al., 2008
<i>AUX1:YFP:AUX1</i>	Swarup et al., 2004
<i>DR5rev:GFP</i>	Friml et al., 2003
<i>DR5:GUS</i>	Ulmasov et al., 1997b
<i>GAI:D8-1</i>	Willige et al., 2007
<i>GAI:D8-Mpl</i>	Willige et al., 2007
<i>GAI:GAI</i>	Willige et al., 2007
<i>GAI:gai</i>	Willige et al., 2007
<i>GAI:Rht-1b</i>	Willige et al., 2007
<i>GAI:Sln1D</i>	Willige et al., 2007
<i>PIN1:GUS</i>	Benková et al., 2003
<i>PIN1:PIN1:GFP</i>	Benková et al., 2003
<i>PIN2:GUS</i>	Benková et al., 2003
<i>PIN2:PIN2:GFP</i>	Abas et al., 2006
<i>PIN3:GUS</i>	Benková et al., 2003
<i>PIN3:PIN3:GFP</i>	Zadnikova et al., 2010
<i>PIN4:GUS</i>	Benková et al., 2003
<i>PIN7:GUS</i>	Vieten et al., 2005
<i>WAG1:GUS</i>	diese Arbeit
<i>WAG2:GUS</i>	diese Arbeit

2.1.3 Primer

Tabelle 3: Primer für die Genotypisierung von Arabidopsis-Mutanten.

Name	Sequenz	T-DNA	Allele
LB3	TAGCATCTGAATTTTCATAACCAATCTCGATACAC		Sail
LBb1.3	ATTTTGCCGATTTTCGGAAC		Salk
<i>pif3-3 del-F</i>	GGTGTGTATGTGAGAAGGTACATCCATCG		<i>pif3-3</i>
<i>pif3-3 del-R</i>	AAGCTTAGCTTTGGTGAGCCTGAAAAGCTC		
<i>pif3-3 wt-F</i>	AGAAGCAATTTGGTCACCATGCTC		
<i>pif3-3 wt-R</i>	TGCATACAAATAGTCGATCGTATG		
PIF5 3'	GATCATCTAGAGCAGCGTAGTTAGG		<i>pif5-2</i>
PIF5 5'	GAGTGTTGCAGATAAGGTACAGATC	LBb1.3	<i>pif5-3</i>
PIL5 LP	AGATCGTCGAAGACCTTGTG		<i>pif1-2</i>
PIL5 RP	GGGTGAAGATGATGATCTTATGG	LBb1.3	
PIN1 LP	CAAAAACACCCCCAAAATTC		<i>pin1</i>
PIN1 RP	AATCATCACAGCCACTGATCC	LBb1.3	
<i>pin2 LP</i>	AACCCTGCTACTGATTTCCG		<i>pin2</i>
<i>pin2 RP</i>	TATGGTCAGTCCGTCGTACC	LBb1.3	
<i>pin3-4 LP</i>	TGCCACCTTCAATTCAAAAAC		<i>pin3-4</i>
<i>pin3-4 RP</i>	TGATTTTCTTGAGACCGATGC	LBb1.3	
PLR60	CGAGATAACCGGTACATCGTCATC	LB3	<i>pif1-1</i>
PLR62	CATGTGAGTTTGTGTAGGCAAGGTC		
SAIL_1288_E07 LP	AATACATTTTGCAGGCAATCG		<i>pif4-2</i>
SAIL_1288_E07 RP	CGTAATGAAGTTGCACGTTTACTC	LB3	
WAG1-ASa	CTATCAAATCCTTGGCTTCAACC		<i>wag1-1</i>
WAG1-Sa	CGATCTCAGCTTCACCTCCACAG	LBb1.3	<i>wag1-2</i>
WAG2 5a	CTGACACCGATCTTGATCTCAGC		<i>wag2-1</i>
WAG2-ASa	CCGTTACAGGCTCTGCCGCAAAC	LBb1.3	

Tabelle 4: Primer für Klonierungen. Eingelegte Mutationen sind rot markiert und verwendete Restriktionsschnittstellen grau unterlegt.

Name	Sequenz	Konstrukt
WAG1+7	CTTCCATGGTTCCGGTGAA	<i>proWAG1: GUS</i>
WAG1-2565	TAAAATAATTATACTATGGAATTCCACATA	<i>proWAG1: GUS</i>
WAG2+13	CTTCTTGTTCCATGGTTTTCTTTCTTG	<i>proWAG2: GUS</i>
WAG2-2901	CGTAATATAAAAGAATTCTAACTAAG	<i>proWAG2: GUS</i>
attB1 WAG2	GGGGattB1TCATGGAACAAGAAGATTTCTATTTTC	<i>GST: WAG2(in)</i>
attB2 WAG2	GGGGattB2TTAAACGCGTTTGCGACTCGC	<i>GST: WAG2(in)</i>
WAG2mut5a	GATTCGCTTTAGAGGTCATCGACCG	<i>GST: WAG2in</i>
WAG2mut3a	CGGTCGATGACCTCTAAAGCGAATC	<i>GST: WAG2in</i>

Tabelle 5: Primer für qRT-PCRs.

Name	Sequenz	Zielgen	PCR-Schritte
D6 3a	CGAATTCTTCGACAAGCCTTCGG	<i>D6PK (At5g55910)</i>	3
D6 5a	GTCCTGGTGGTGATTTGCATAC		
D6L1 3a	CACATGTCCATCATCTCTAACAAG	<i>D6PKL1 (At4g26610)</i>	3
D6L1 5a	GCAATGAAGGTTATGGACAAAGG		
D6L2 3a	CAGAGAGCATTATATGTCCGTC	<i>D6PKL2 (At5g47750)</i>	3
D6L2 5a	CTTTGGATCATCCATTTCTCCC		
D6L3 3a	CCATAGCAAGAAGAAGCTTCAGC	<i>D6PKL3 (At3g27580)</i>	3
D6L3 5a	GCGAGGAAGAAGCTTGTTAGAGC		
HKG 2step-LP	TTTAATCGGAGCGTTGGAAG	<i>At3g50685</i>	2
HKG 2step-RP	TACAAAGACCAGCCCACGAT		
PHOT1 3a	GTTGGCATCAGGAAGTTCTCG	<i>PHOT1 (At3g45780)</i>	3
PHOT1 5a	CTACAAGGTCCAGAGACTGATC		
PHOT2 3a	GATGCACGCTCGGTGAGCCTTG	<i>PHOT2 (At5g58140)</i>	3
PHOT2 5a	GAGCTTCCAGATGCTAATACGC		
PID 3a	GTCTAGCGAGACGAGTGAATCG	<i>PID (At2g34650)</i>	3
PID 5a	CTCTCTCCGTCATAGACAACCTC		
PID2 3a	CCATCATGTGGAGATACTCTAAGG	<i>PID2 (At2g26700)</i>	3
PID2 5a	CATCGGAAGTGTGTACCTCTGCC		
TAA1 2stp 3	TGTACATACCCGACCGAACA	<i>TAA1 (At1g70560)</i>	2
TAA1 2stp 5	GCCGCTCCTTTTTACTCCA		
TAR2 2stp 3	GGACCAACATATTCCTCCAAGA	<i>TAR2 (At4g24670)</i>	2
TAR2 2stp 5	TCTGCCTGCAATTCTACAGTTT		
UBC21 2step-LP	TCCTCTTAAGTGCAGACTCAGG	<i>UBC21 (At5g25760)</i>	2
UBC21 2step-RP	GCGAGGCGTGATACATTTG		
UBC21 LP	ATGCAGGCATCAAGAGCGCG	<i>UBC21 (At5g25760)</i>	3
UBC21 RP	AGACATATTTCTCCTGTCTTG		
WAG1 2stp 3	AGATACTCCAAGGCGACGAG	<i>WAG1 (At1g53700)</i>	2
WAG1 2stp 5	GTTACCGATTTCCCCGGTTA		
WAG1 3a	GGAGATACTCCAAGGCGACGAG	<i>WAG1 (At1g53700)</i>	3
WAG1 5a	CACCTCCGTGATTGCCCTAAC		
WAG2 2stp 3	CGAGGAGGCGAATGTACG	<i>WAG2 (At3g14370)</i>	2
WAG2 2stp 5	GACACCGATCTTGATCTCAGC		
WAG2 3a	GCGAATCTTGCGGAAGAGTCACG	<i>WAG2 (At3g14370)</i>	3
WAG2 5a	CTGACACCGATCTTGATCTCAGC		

2.1.4 Vektoren

Für das Klonieren der *proWAG:GUS*-Konstrukte wurde der Vektor pCAMBIA1391Z genutzt. pDONR201 sowie pDEST15 wurden verwendet, um die *GST:WAG2*-Konstrukte zu erstellen. Der offene Leserahmen von *WAG2* lag als cDNA-Klon (U84295) im Vektor pUNI51 (Arabidopsis Biological Resource Center, Ohio State University) vor.

2.1.5 Antikörper

Tabelle 6: Verwendete Antikörper.

Name	Verdünnung	Ursprung	Beschrieben in/Quelle
α -GAI	1:1000	Kaninchen	Willige et al., 2007
α -GFP	1:3000	Kaninchen	Invitrogen, Darmstadt
α -GID1A	1:1000	Kaninchen	Willige et al., 2007
α -GST	1:3500	Ziege	GE Healthcare, München
α -Huhn-HRP	1:6000	Kaninchen	Sigma-Aldrich, München
α -Kaninchen-HRP	1:2000	Ziege	Sigma-Aldrich, München
α -PIN1	1:4000	Schaf	NASC
α -PIN2	1:3000	Huhn	Men et al., 2008; Agrisera
α -RGA	1:1000	Kaninchen	Willige et al., 2007
α -Ziege-HRP	1:8000	Kaninchen	Sigma-Aldrich, München

2.1.5 Chemikalien

Tabelle 7: Verwendete Chemikalien.

Name	Hersteller
[5- ³ H]-Indol-3-essigsäure ([5- ³ H]-IES)	GE Healthcare, München
[γ - ³² P]-Adenosintriphosphat ([γ - ³² P]-ATP)	Hartmann Analytic, Braunschweig
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)	Applichem, Darmstadt
2-(<i>N</i> -Morpholino)ethansulfonsäure (MES)	Applichem, Darmstadt
5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-glucuronid (X-Gluc)	Duchefa, Haarlem, Niederlande
6-Benzylaminopurin (6-BA)	Duchefa, Haarlem, Niederlande
Acrylamid 4K-Lösung (30%) Mix 29:1	Applichem, Darmstadt
Agar für die Bakteriologie	Applichem, Darmstadt
Agarose	Peqlab Biotechnologie, Erlangen
Ampicillin Natriumsalz	Roth, Karlsruhe
β -Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	Roth, Karlsruhe
Calciumhypochlorid	Roth, Karlsruhe
Chlorophorm	Roth, Karlsruhe
Concanamycin A (ConA)	Enzo Life Sciences, Lörrach
Coomassie-Brillant-Blau R-250	Applichem, Darmstadt
Cycloheximid	Applichem, Darmstadt
Desoxyribonukleosid-Triphosphate (dNTPs)	Fermentas, St. Leon-Rot
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth, Karlsruhe
di-Natriumhydrogenphosphat	Applichem, Darmstadt
Essigsäure	Roth, Karlsruhe

Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Ethylendiaminotetraessigsäure (EDTA)	Applichem, Darmstadt
Formaldehyd	Roth, Karlsruhe
Gentamycinsulfat	Duchefa, Haarlem, Niederlande
Gibberellinsäure 3 (GA3)	Duchefa, Haarlem, Niederlande
Glucose	Applichem, Darmstadt
Glycerin	Applichem, Darmstadt
Glycin	Applichem, Darmstadt
Hefeextrakt	Roth, Karlsruhe
Heptan	Applichem, Darmstadt
Hyaminhydroxid	Zynsser Analytic, Frankfurt
Hygromycin B	Sigma-Aldrich, München
Indol-3-essigsäure (IES)	Duchefa, Haarlem, Niederlande
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Applichem, Darmstadt
K ₃ Fe(CN) ₆	Applichem, Darmstadt
K ₄ Fe(CN) ₆	Applichem, Darmstadt
Kaliumacetat	Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid	Applichem, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Applichem, Darmstadt
Kaliumhydroxid	Applichem, Darmstadt
Kanamycinsulfat	Applichem, Darmstadt
L-Glutathion (L-GSH)	Sigma-Aldrich, München
Magermilchpulver	Applichem, Darmstadt
Magnesiumchlorid	Applichem, Darmstadt
Methanol	Roth, Karlsruhe
MG132	Enzo Life Sciences, Lörrach
Murashige & Skoog Medium & B5 Vitamine	Duchefa, Haarlem, Niederlande
N,N-Dimethylformamid (DMF)	Roth, Karlsruhe
N-1-Naphthylphthalaminsäure (NPA)	Chem Service, West Chester, USA
Natriumacetat	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid	Applichem, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Natriumfluorid	Applichem, Darmstadt
Natriumhydroxid	Applichem, Darmstadt
Natriumlaurylsulfat (SDS)	Applichem, Darmstadt
Natriumorthovanadat	Applichem, Darmstadt
Natronlauge	Applichem, Darmstadt
Paclobutrazol	Duchefa, Haarlem, Niederlande
Pflanzenagar	Duchefa, Haarlem, Niederlande
Phenol	Roth, Karlsruhe
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich, München
Propidiumiodid (PI)	Applichem, Darmstadt
Rifampicin	Duchefa, Haarlem, Niederlande
Rotiphorese Gel (37,5:1)	Roth, Karlsruhe
Saccharose	Applichem, Darmstadt
Salzsäure	Applichem, Darmstadt
Schwefelsäuredodecylester-Natriumsalz	Roth, Karlsruhe
Silwet-77	Witco Europe, Genf, Schweiz
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Applichem, Darmstadt
Triton X-100	Applichem, Darmstadt
Trypton	Applichem, Darmstadt
Tween 20	Applichem, Darmstadt
Wortmannin (WM)	Applichem, Darmstadt

2.1.6 Sonstige Materialien und Enzyme

Tabelle 8: Liste von weiteren Materialien und Enzymen, die genutzt wurden.

Name	Hersteller
Amersham Hybond-ECL	GE Healthcare, München
Bio-Rad Protein Assay	Bio-Rad Laboratories, München
BP Clonase II Enzyme Mix	Invitrogen, Darmstadt
FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase	Fermentas, St. Leon-Rot
GeneRuler 1kb DNA Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot
Glutathione Sepharose 4B	GE Healthcare, München
iQ SYBR Green Supermix	Bio-Rad Laboratories, München
Liquid Scintillator Quicksafe A	Zynsner Analytic, Frankfurt
LR Clonase II Enzyme Mix	Invitrogen, Darmstadt
Magic Mark XP Western Protein Standard	Invitrogen, Darmstadt
M-MuLV Reverse Transcriptase	Fermentas, St. Leon-Rot
NucleoSpin RNA Plant	Macherey-Nagel, Düren
PageRuler Plus Prestained Protein Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot
Phusion High-Fidelity DNA Polymerase	Fisher Scientific, Schwerte
Protease Inhibitor Cocktail	Sigma-Aldrich, München
rDNase	Macherey-Nagel, Düren
Restriktionsenzyme (div.)	Fermentas, St. Leon-Rot
RNaseA	Roth, Karlsruhe
Super Signal West Femto Max. Sens. Substrate	Thermo Fisher Scientific, Bonn
T4 DNA Ligase	Fermentas, St. Leon-Rot
Vector Fusion-Aid GFP Kit	Axxora, Lörrach
Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System	Promega, Mannheim

2.1.7 Verwendete Software

Tabelle 9: Liste der verwendeten Software.

Name	Vertreiber
MS Office	Microsoft, Unterschleißheim
ImageJ	NIH, Bethesda, USA
cellSens Dimension	Olympus, Hamburg
Fluoview	Olympus, Hamburg
Photoshop	Adobe Systems, München

2.2 Methoden

2.2.1 Pflanzenarbeiten

2.2.1.1 Sterilisierung von Samen und Wachstumsbedingungen

Arabidopsis-Samen wurden für 10-20 min in gesättigter Calciumhypochloridlösung (plus 1% Silwet-77) inkubiert und anschließend fünfmal mit sterilem Wasser gewaschen. Standardmäßig wurden die Samen 2 bis 3 Tage stratifiziert. Für Experimente, welche die Mutante *ga1* einbezogen, wurden die Samen für 5 Tage stratifiziert. Dabei wurden diese Samen in 100 μ M GA3 inkubiert und vor dem Ausplattieren fünfmal mit sterilem Wasser

gewaschen.

Für Experimente unter Lichtbedingungen wurden die Samen auf GM (Growth Medium: 4,3 g/l Murashige & Skoog Medium [plus B5 Vitamine], 10 g/l Saccharose, 0,5 g/l MES, 5,5 g/l Pflanzenagar, pH 5,8 [mittels KOH eingestellt]) ausplattiert und unter Dauerlicht (120 bis 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) bei 21°C angezogen. Für Experimente mit etiolierten Keimlingen wurden die Samen auf ½-MS-Medium (2,15 g/l Murashige & Skoog Medium [plus B5 Vitamine], 0,5 g/l MES, 8 g/l Pflanzenagar, pH 5,8 [mittels KOH eingestellt]) ausplattiert und für 6 bis 8 h dem Licht ausgesetzt. Anschließend wurden diese lichtdicht verpackt. Bei Experimenten mit der *ga1*-Mutante wurden die Samen 20 bis 24 h (statt 6 bis 8 h) dem Licht ausgesetzt.

Für die Gewinnung von Samen und für Experimente mit adulten Pflanzen wurden 7 Tage alte Keimlinge auf Standarderde übertragen und im Dauerlicht angezogen.

2.2.1.2 Behandlung mit Gibberellinsäure und diversen Inhibitoren

Für die Analyse von *AUX1:YFP:AUX1*, *PIN:GUS*- sowie *PIN:PIN:GFP*-Linien wurden 10 μM GA3- und 10 μM PAC-haltige Agarplatten (GM) eingesetzt. Dafür wurden die transgenen Linien 4 Tage auf GM angezogen, für 2 Tage auf GM plus PAC übertragen und 24 h vor der Untersuchung auf GM plus PAC bzw. GM plus PAC und GA3 transferiert. Keimlinge mit *ga1*-Hintergrund wurden nach sechstägigem Wachstum auf GM für einen Tag auf GM plus GA3 angezogen. Für die Analyse von etiolierten Keimlingen wurden diese auf ½-MS-Medium angezogen, welches mit 0,1 bzw. 1 μM GA3 und/oder 0,1 bzw. 1 μM PAC ergänzt worden war. In allen Fällen wurde darauf geachtet, gleichzeitig entsprechende Lösungsmittelkontrollen zu analysieren.

Um den Einfluss von Gibberellindefizienz auf die Embryogenese zu untersuchen, wurden Pflanzenlinien mit *ga1*-Mutantenhintergrund bis zu der Bildung erster Blüten einmal wöchentlich mit 100 μM GA3 besprüht. Um einen GA-Mangel während der Samenbildung zu erzeugen, wurde danach die GA-Gabe und damit die Komplementierung des *ga1*-Phänotyps unterbunden.

Für die Behandlung mit Wortmannin (33 μM) und Concanamycin A (1 μM) wurden 6 Tage alte Keimlinge für 6 bzw. 7 h auf entsprechend ergänzte oder das jeweilige Lösungsmittel enthaltende Medien übertragen.

2.2.1.3 Stabile Transformation von Arabidopsis

Für die Transformation von Arabidopsis wurde das Standardprotokoll der Floral Dip-Methode (Clough und Bent, 1998) variiert: Um die *proWAG:GUS*-Konstrukte stabil in *Arabidopsis thaliana* zu exprimieren, wurden die entsprechenden pCAMBIA1391Z-Konstrukte mittels Elektroporation in Agrobakterien eingebracht. Nach Selektion mittels

Gentamycin (20 µg/ml), Rifampicin (50 µg/ml) und Kanamycin (50 µg/ml) wurden täglich sukzessiv größere Volumina von flüssigem LB-Medium (10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l NaCl, pH 7 [mittels NaOH eingestellt]) inokuliert. Die Bakterien einer 500 ml-Kultur wurden geerntet und in Transformationspuffer (2,2 g/l Murashige & Skoog Medium [plus B5 Vitamine], 50 g/l Glucose, 0,5 g/l MES, 50 µl/l 6-BA [1 mg/ml], 500 µl/l Silwett-77) suspendiert. In dieser Suspension wurden die Infloreszenzen von intakten Columbia-0-Pflanzen für 30 s inkubiert. Anschließend wurden die Pflanzen lichtdurchlässig über Nacht verpackt und die Blüten am nächsten Tag mit Wasser leicht gereinigt. Die nach dem Abreifen erhaltenen T₁-Samen wurden auf hygromycinhaltigem Medium selektiert. Es wurden mindestens sechs transgene Linien je *proWAG:GUS*-Konstrukt analysiert.

2.2.2 Physiologische Experimente

2.2.2.1 Auxintransportmessung

Für die Messung des Auxintransports wurden basale, 2,5 cm lange Segmente der primären Infloreszenz von 6 bis 7 Wochen alten Pflanzen mit einer Skalpellklinge isoliert und mit der apikalen Seite für 30 min in 30 µl Transportpuffer (500 pM IES, 1% Saccharose, 5 mM MES [pH 5,5]) inkubiert. Anschließend wurden diese Segmente in 30 µl Transportpuffer, welcher 417 nM [5-³H]-Indol-3-essigsäure (11 kBq) enthielt, übertragen. Nach 2 h wurden die Sprossabschnitte in fünf je 5 mm große Fragmente aufgetrennt. Das letzte Fragment, welches direkten Kontakt mit dem Transportpuffer hatte, wurde verworfen. Um die Menge an transportierter [5-³H]-Indol-3-essigsäure zu bestimmen, wurden die anderen vier Fragmente in Hyaminhydroxid (300µl) über Nacht mazeriert. Dann erfolgte die Neutralisierung der Lösung mittels 300 µl Essigsäure und die Zugabe von 4 ml Szintillationscocktail. Am nächsten Tag wurde die Radioaktivität durch Bestimmung der Zerfälle pro Minute mittels Szintillationszähler (Wallac WinSpectral 1414, Perkin-Elmer Life Science) quantifiziert. Pro Experiment und Genotyp wurden je drei Replikate analysiert. Jedes Experiment wurde dreimal wiederholt. Da die Mutante *ga1* keine Infloreszenzen ausbildet, wurde der Phänotyp durch wöchentliches Sprühen mit 100 µM GA3 komplementiert. Um trotzdem GA-defiziente Pflanzen zu erhalten, wurde diese Behandlung 3 Wochen vor der Analyse gestoppt.

2.2.2.2 Messung des Wurzelgravitropismus

Für die Messung des Wurzelgravitropismus wurden Keimlinge auf vertikal stehenden Agarplatten angezogen. Nach siebentägigem Wachstum wurden die Keimlinge umgesetzt, sodass deren Wurzelspitzen auf den vertikal stehenden Agarplatten parallel zum Gravitationsvektor ausgerichtet waren. Anschließend wurden die Agarplatten lichtdicht

verpackt, und nach 2 h wurden diese um 135° gedreht. Nach 6 h wurden die Platten gescannt und der Winkel der Wurzelspitze zum Gravitationsvektor mittels ImageJ Software bestimmt.

2.2.2.3 Messung der Hypokotylllänge und des Apikalhakenwinkels

Für die Messung der Hypokotylllänge und des Apikalhakens wurden etiolierte Keimlinge nach zwei- bis viertägigem Wachstum eingescannt. Die Hypokotylllänge von mindestens 32 Keimlingen pro Genotyp wurde mittels ImageJ Software bestimmt. Die Messung des Apikalhakenwinkels erfolgte ebenfalls mittels ImageJ Software. Dabei wurde der Winkel eines vollständig geschlossenen Hakens als 180° und der eines vollständig geöffneten Hypokotylhakens als 0° definiert. Somit wurde der äußere Winkel zwischen der Hypokotylachse und den Keimblättern bestimmt. Für jedes Experiment wurden mindestens 20 Keimlingen pro Genotyp und Behandlung untersucht. Die dargestellten Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus den Mittelwerten zweier unabhängiger Experimente berechnet.

2.2.3 Histologische Untersuchungen

2.2.3.1 GUS-Färbung

Für GUS-Färbungen wurden Keimlinge für 15 min in Heptan fixiert und nach dem Trocknen in GUS-Färbelösung A (100 mM Natriumphosphatpuffer [pH 7,0], 2 mM $K_4Fe(CN)_6$, 2 mM $K_3Fe(CN)_6$, 0,1% Triton-X100 und 1 mg/ml X-Gluc) bei 37°C inkubiert. Die Färbedauer betrug 30 min (*PIN2:GUS*), 2 h (*PIN3:GUS*, *PIN4:GUS* und *PIN7:GUS*), 2,5 h (*WAG1:GUS* und *WAG2:GUS*) bzw. 16 h (*PIN1:GUS* und *DR5:GUS*). Im Licht gewachsene Keimlinge wurden mit 70% Ethanol entfärbt. Zur Färbung von *DR5:GUS*-Linien nach Gravistimulierung wurden die Keimlinge für 16 h in GUS-Färbelösung B (100 mM Natriumphosphatpuffer [pH 7,0], 0,5 mM $K_4Fe(CN)_6$, 0,5 mM $K_3Fe(CN)_6$, 0,5% Triton-X100 und 1 mg/ml X-Gluc) gefärbt. Die gefärbten Keimlinge wurden mittels Leica MZ16 Stereomikroskop und PLAN-APOX1 Objektiv (Leica) fotografiert.

2.2.3.2 Mikroskopie

Mikroskopie wurde mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops (Olympus BX61 mit der schwarz-weiß Digitalkamera XM10, Olympus) bzw. eines konfokalen Mikroskops (FV1000/IX81 mit den Objektiven UPLFL 10x, UPLFLN 20x, PLAPO 40xW und UPLSAPA 60xW, Olympus) durchgeführt. Zum Erstellen und Bearbeiten von Bildern diente cellSens Dimension bzw. FluoView Software.

Für die Messung der PIN:GFP-Signale innerhalb des Wurzelmeristems wurde die Fluoreszenzintensität von basalen Zellmembranen in der Stele (PIN1:GFP und PIN3:GFP) bzw. von apikalen Zellmembranen der Epidermiszellen (PIN2:GFP) mittels FluoView Software quantifiziert.

2.2.4 Molekularbiologische Methoden

2.2.4.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Für die Extraktion von Plasmid-DNA wurden die Bakterien einer über Nacht gewachsenen, mit einer einzelnen Kolonie inokulierten 3 ml-Flüssigkultur geerntet. Nach Resuspendierung der Zellen in 300 µl Puffer (50 mM Tris/HCl [pH 8] und 10 mM EDTA) erfolgte der Aufschluss der Bakterien durch Zugabe von 300 µl 200 mM NaOH (Birnboim und Doly, 1979). Nach sechsmaligem Invertieren und einer Inkubierung für 5 min bei 4°C wurde die Lösung neutralisiert, indem 300 µl Kaliumacetatlösung (3 M, pH 5,5) zugegeben wurden. Anschließend wurde zentrifugiert und der Überstand mit 750 µl Phenol/Chloroform (1:1) vermischt. Die hydrophile und die hydrophobe Phase wurden durch eine darauf folgende Zentrifugierung voneinander getrennt. Danach wurde der Überstand mit 700 µl Isopropanol gemischt. Im Anschluss an eine Zentrifugierung wurde das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen. Nach dem Trocknen des Pellets erfolgte die Aufnahme in sterilem Wasser.

2.2.4.2 Extraktion genomischer DNA aus Pflanzen

Um genomische DNA aus *Arabidopsis thaliana* zu gewinnen, wurde Pflanzenmaterial (ca. 0,5 cm² Blattgewebe) gemörsert und in 300 µl Extraktionspuffer (250 mM NaCl, 200 mM Tris/HCl [pH 7,5], 25 mM EDTA [pH 8] und 0,5% SDS) aufgenommen. Nach einer 20-minütigen Inkubation bei 65°C wurde zentrifugiert und 300 µl Phenol/Chloroform (1:1) zum Überstand zugegeben. Mittels Zentrifugation wurden die hydrophile und die hydrophobe Phase voneinander getrennt und danach die Nukleinsäuren aus der oberen Phase mittels Isopropanol (200 µl) gefällt. Anschließend wurde eine Zentrifugation durchgeführt und danach das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen. Nach dem Trocknen wurde dieses in 200 µl sterilem Wasser aufgenommen.

2.2.4.3 RNA-Extraktion aus Pflanzen

Gesamt-RNA aus Keimlingen wurde entsprechend den Anweisungen des Herstellers mit Hilfe des NucleoSpin RNA Plant Kits (Machery-Nagel) extrahiert. Die Ausnahme bildete der DNA-Verdau mittels rDNase (Macherey-Nagel), der um 5 min verlängert wurde.

2.2.4.4 cDNA-Synthese

cDNA wurde hergestellt, indem zuerst 2 µg RNA in 10 µl Wasser aufgenommen und 1 µl oligo-dT-Primer (20 µM, Sequenz: TTTTTTTTTTTTTTTTTTTVN) zugesetzt wurden. Zum Denaturieren wurde die Lösung für 10 min bei 65°C inkubiert und dann auf Eis abgekühlt. Für die Synthese wurden 1 µl H₂O, 2 µl dNTPs (bestehend aus je 2,5 mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP), 4 µl 5x Reaktionspuffer und 2 µl (40 U) M-MuLV Reverse Transcriptase (Fermentas) hinzugegeben und der Ansatz für 70 min bei 42°C inkubiert. Die Transkriptase wurde inaktiviert (10 min bei 65°C), und nach dem Abkühlen des Ansatzes auf Eis wurden 20 µl H₂O zugegeben.

2.2.4.5 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Für die Genotypisierung von Arabidopsis-Mutanten mittels PCR wurde 10x Polymerase-Puffer (200 mM Tris/HCl [pH 8,4], 500 mM KCl und 25 mM MgCl₂) und im Labor hergestellte Taq-Polymerase verwendet. Es wurden 20 µl-Ansätze (11 µl H₂O, 4 µl genomische DNA, 2 µl Polymerase-Puffer, 2 µl dNTPs [bestehend aus je 2,5 mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP], je 0,4 µl Primer [20 µM] und 0,2 µl Taq-Polymerase) und ein PCR-Programm mit, je nach PCR-Produktlänge, variiertes Synthesedauer (Schritt 1: 94°C für 4 min, Schritt 2: 94°C für 1 min, Schritt 3: 58°C für 1 min, Schritt 4: 72°C für 1-2,5 min, Schritt 2-4 35 Mal wiederholt, Schritt 5: 72°C für 6 min, Schritt 6: Inkubierung bei 10°C) genutzt.

2.2.4.6. (Semi)quantitative Real Time-PCR ([s]qRT-PCR)

Für semiquantitative RT-PCRs wurden 3-Schritt-Primer verwendet. Zunächst wurden 25 µl-Ansätze hergestellt (1 µl cDNA [siehe 2.2.4.4], 2,5 µl 10x Polymerase-Puffer, 2,5 µl dNTPs, je 0,5 µl Primer [20 µM], 0,5 µl Taq-Polymerase), diese auf zwei 12 µl Proben aufgeteilt und anschließend die PCR durchgeführt (95°C für 4 min, 95°C für 20 s, 58,5°C für 20 s, 72°C für 30 s, Schritt 2-4 30 Mal wiederholt, 72°C für 30 s, Inkubierung bei 10°C).

Bei der Durchführung von quantitativen RT-PCRs wurde iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad) und der CFX96 Real-Time System Cyler (Bio-Rad) genutzt. Es wurde sowohl 2-Schritt- als auch 3-Schritt-Primer verwendet. Während für beide PCR-Methoden die Zusammensetzung des PCR-Ansatzes (20 µl SYBR Green Supermix, 10,4 µl H₂O, je 4 µl Primer [2 µM] und 1,6 µl cDNA [siehe 2.2.4.4]) dieselbe war, unterschieden sich die verwendeten PCR-Programme (2-Schritt-Programm: Schritt 1: 95°C für 10 min, Schritt 2: 95°C für 10 s, Schritt 3: 60°C für 30 s, Schritt 2+3 39 Mal wiederholt, Schritt 4: 95°C für 10 s, Schritt 5: 68°C bis 95°C in 5°C-Schritten in je 5 s; 3-Schritt-Programm: Schritt 1:

95°C für 10 min, Schritt 2: 95°C für 20 s, Schritt 3: 58,5°C für 20 s, Schritt 4: 72°C für 25 s, Schritt 2-4 39 Mal wiederholt, Schritt 5: 95°C 10 s, Schritt 6: 58,5°C bis 95°C in 5°C-Schritten in je 5 s). Für die Läufe wurden 10 µl-Proben verwendet. Die Ergebnisse der Experimente sind als Mittelwerte und Standardfehler dargestellt. Pro (s)qRT-PCR-Experiment wurden mindestens zwei biologische und mindestens drei technische Replikate ausgewertet.

2.2.4.7 Klonierung

Die *WAG:GUS*-Konstrukte wurden wie folgt kloniert: Für die Amplifikation mittels PCR wurde die Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (Finnzymes) nach Angaben des Herstellers verwendet. Dazu wurden im Falle von *WAG1* ca. 2,5 kb des Promotorbereichs mittels der Primer *WAG1+7* und *WAG1-2565* amplifiziert. Für das Promotorkonstrukt von *WAG2* wurden mit Hilfe der Primer *WAG2+13* und *WAG2-2901* ca. 2,9 kb amplifiziert. In beiden Fällen wurde je eine bereits vorhandene oder neu eingefügte *EcoRI*- und *NcoI*-Schnittstelle verwendet, um die Promotorbereiche in die Multiple Cloning Site des Vektors *pCAMBIA1391Z* in 5´-Position vor dem *gusA*-Reportergen einzubringen.

Für das Klonieren des *GST:WAG2*-Konstrukts wurde der entsprechende cDNA-Klon mittels der Primer *attB1 WAG2* und *attB2 WAG2* und mit Hilfe der Phusion High-Fidelity DNA Polymerase amplifiziert. Um das Konstrukt *GST:WAG2in*, welches für eine inaktive *WAG2*-Kinase kodiert, zu erstellen, wurden ein 5´-Fragment (Primerkombination: *attB1 WAG2* und *WAG2mut3a*) und ein 3´-Fragment (Primerkombination: *WAG2mut5a* und *attB2 WAG2*) amplifiziert. Bei einem nachfolgenden PCR-Lauf wurden diese Fragmente als Matrize sowie die Primer *attB1 WAG2* und *attB2 WAG2* genutzt. Dadurch wurde ein vollständiger cDNA-Klon mit eingefügter Mutation erstellt (Adenin 349 zu Guanin). Durch das Verwenden von Primern mit *attB1*- und *attB2*-Überhängen konnte das Gateway-Klonierungssystem (Invitrogen) genutzt werden. Dies geschah nach Angaben des Herstellers. Dazu wurden die cDNA-Klone mit *attB*-Überhängen zuerst über Rekombination mittels *BP-Clonase* in den Vektor *pDONR201* eingebracht. Nach Selektion und Aufreinigung des Plasmids konnten anschließend beide cDNAs in 3´-Position hinter den offenen Leserahmen des *GST*-Gens von *pDEST15* eingefügt werden (unter Verwendung der *LR-Clonase*).

2.2.5 Biochemische Methoden

2.2.5.1 Proteinextraktion

Für die Herstellung von Proteinextrakten wurde Pflanzenmaterial in Extraktionspuffer A (50 mM Tris-HCl [pH 7,5], 150 mM NaCl, 0,5% Triton X-100, 10 µM MG132, 0,1 µM

PMSF und 0,1 μM Protease Inhibitor Cocktail [Sigma-Aldrich]) homogenisiert. Durch Zentrifugieren bei 4°C wurden Zelltrümmer und löslicher Extrakt voneinander getrennt. Die Proteinkonzentration wurde mittels Bradford-Reagenz (Bradford, 1976) bestimmt und der Extrakt mit 5x Laemmli-Puffer (310 mM Tris-HCl [pH 6,8], 50% Glycerin, 10% SDS, 0,5% Bromphenolblau und 3,5% β -Mercaptoethanol) gemischt. Anschließend wurde dieser auf 95°C (für die Detektion von löslichen Proteinen) bzw. 45°C (für den Nachweis von Membranproteinen) für 5 min erhitzt.

2.2.5.2 Membranaufreinigung

Da der verwendete α -PIN2-Antikörper im Westernblot von mehreren kreuzreagierenden Proteinen gebunden wurde, mussten Gesamtmembranfraktionen aufgereinigt werden, um PIN2 in Gesamtwurzelextrakten nachzuweisen. Dazu wurde das Wurzelmaterial in Extraktionspuffer B (50 mM Tris-HCl [pH 7,5], 150 mM NaCl, 50 mM EDTA, 50 mM NaF, 10 mM NaVO_3 , 10 μM MG132, 0,1 μM PMSF und 0,1 μM Protease Inhibitor Cocktail) homogenisiert. Durch eine 5-minütige Zentrifugation (4°C, 10.000 g) konnten Zelltrümmer entfernt und anschließend die Gesamtmembranfraktion aus dem Überstand mittels Ultrazentrifugation (4°C, 1 h, 100.000 g ; Sorval MTX 500 [ThermoScientific]) pelletiert werden. Dieses Pellet wurde in 2x Laemmli-Puffer homogenisiert und für 5 min bei 45°C erhitzt.

2.2.5.3 Immunpräzipitation

Für die Co-Immunpräzipitation (CoIP) von RGA mittels GID1A:GFP wurden je 400 μg Proteinextrakt aus 7 Tage alten Keimlingen (Col-O und 35S:*GID1A:GFP*) hergestellt (siehe 2.2.4.1). Die Extrakte wurden mittels Extraktionspuffer A (siehe 2.2.4.1, ohne Triton X-100) auf 350 μl verdünnt und zusammen mit 20 μl α -GFP-Agarose (Vector Laboratories) für 2 h rotierend inkubiert. Danach wurde die Agarose dreimal mit Puffer (50 mM Tris-HCl [pH 7,5] und 150 mM NaCl) gewaschen und zusammen mit 200 μg Proteinextrakt von 7 Tage alten *sly1-10*-Keimlingen für 3,5 h mit und ohne 100 μM GA3 rotierend inkubiert. Abschließend wurde die Agarose dreimal gewaschen und nach Zugabe von Laemmli-Puffer bei 95°C für 5 min erhitzt

2.2.5.4 SDS-PAGE

Gesamtproteinextrakte, Membranfraktionen sowie CoIPs wurden mittels SDS-PAGE (Laemmli, 1970) aufgetrennt. Dazu wurden 5%ige Sammelgele sowie 8 bis 12%ige Trenngele genutzt. Für das Ansetzen der Gele wurde ein 30%iges Acrylamid/Bisacrylamid-Gemisch von 29:1 verwendet. Die Gelläufe fanden in Mini

Protean III Zellen (Bio-Rad) statt.

2.2.5.5 Coomassie-Färbung

Zum Nachweis von gleichmäßiger Gelbeladung wurden Kontrollgele mit Coomassie-Lösung (2,5 g Coomassie-Brillant-Blau R-250, 500 ml Methanol, 100 ml Essigsäure, 400 ml H₂O) gefärbt. Hintergrundfärbung wurde mittels Entfärberlösung (500 ml Methanol, 100 ml Essigsäure, 400 ml H₂O) beseitigt.

2.2.5.6 Westernblots

Für die Übertragung von Proteinen auf Nitrozellulosemembran wurden ein Semidryblotter und ein entsprechender Puffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20% Methanol, 1,3 mM SDS, pH 8,3 [mittels NaOH eingestellt]) verwendet. Anschließend wurde die Membran in Blockierungspuffer (139 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 12,5 mM NA₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄, 0,5% Tween 20, 0,5% Magermilchpulver) inkubiert und nach 30 min in Blockierungspuffer mit beigefügtem Antikörper über Nacht inkubiert. Nach dreimaligem zehninütigem Waschen (mit Blockierungspuffer ohne Magermilchpulver) wurde die Membran in Blockierungspuffer und dem entsprechenden sekundären Antikörper für 3 bis 5 h inkubiert. Nach drei weiteren Waschschrritten wurden die von den Antikörpern gebundenen Proteine über eine Peroxidasereaktion mittels Super Signal West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermo Fisher Scientific) und Luminescent Image Analyzer LAS-4000 mini series (Fujifilm) detektiert.

2.2.5.7 Aufreinigung von rekombinanten Proteinen

Für die Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen wurden entsprechende pDEST15-Plasmide via Elektroporation in den *E. coli*-Stamm BL21 (DE3) eingebracht. Die Expression in 50 ml-Kulturen wurde durch IPTG-Zugabe induziert. Für die Bindung der Proteine an die Glutathione Sepharose 4B (GE Healthcare) wurde nach Angaben des Herstellers (Procedure B: Batch Purification) vorgegangen. Die Eluierung wurde mittels 10 mM Glutathion (in 50 mM Tris-HCl [pH 8,0]) erreicht.

2.2.5.8 *in vitro*-Phosphorylierung

Die für die *in vitro*-Phosphorylierung verwendeten *GST:PIN*-Konstrukte wurden von Melina Zourelidou erstellt. Damit gleiche Mengen der rekombinanten Proteine eingesetzt werden konnten, wurden zuerst relative Proteinmengen der aufgereinigten *GST:WAG2*-sowie *GST:PIN*-Proteine mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung bestimmt. Die

Proteine wurden zusammen mit 5x Kinasepuffer (125 mM Tris-HCl [pH 7,5], 25 mM MgCl₂ und 1 mM EDTA [pH 8]) und 1 µl [γ-³²P]-ATP (370 kBq) pro 12 µl Ansatz für 1 h bei 28°C inkubiert. Anschließend wurden die Proben nach Zugabe von 5x Laemmli für 5 min bei 95°C erhitzt. Nach der Auftrennung der Proben mittels SDS-PAGE wurde das Polyacrylamidgel getrocknet und die Radioaktivität mit Hilfe eines Röntgenfilms detektiert.

3 Ergebnisse

3.1 Die Gibberellinsignaltransduktion

3.1.1 Die DELLA-Domäne ist notwendig für den GA-abhängigen Abbau der DELLA-Proteine

DELLA-Proteine stellen Repressoren der GA-Signalübertragung dar. Charakterisiert werden diese u.a. durch die namensgebende N-terminale DELLA-Domäne. Während der GA-Antwort werden DELLA-Proteine abgebaut und so deren Repressoraktivität aufgehoben (Silverstone et al., 2001). In der zwergwüchsigen Mutante *gai-1* liegt eine Deletion von 51 Basenpaaren in der für die DELLA-Domäne kodierenden Sequenz vor (Peng et al., 1997). Die aus der Mutation resultierende Veränderung der DELLA-Domäne führt im Gegensatz zum wildtypischen Protein zu einer Insensitivität gegenüber dem GA-abhängigen Abbau (Dill et al., 2001; Fu et al., 2004). Dies zeigt, dass die DELLA-Domäne eine wichtige Rolle für diesen Abbauprozess spielt. Welche biochemische Funktion die DELLA-Domäne hierbei einnimmt, war zu Beginn dieser Arbeit ungeklärt.

Neben *gai-1* aus *Arabidopsis* waren diverse zum Zwergwuchs führende DELLA-Allele aus Weizen, Mais und Gerste bekannt. Diese tragen ebenfalls Mutationen in der für die DELLA-Domäne kodierenden Sequenz, die nicht das Leseraster der entsprechenden Gene verändern (Abbildung 3; Gale und Marshall, 1976; Harberd und Freeling, 1989; Peng et al., 1999b; Chandler et al., 2002). So konnte im Fall von *Slh1D* aus Gerste ein DELLA-Protein nachgewiesen werden, welches einen verzögerten GA-abhängigen Abbau zeigt (Gubler et al., 2002). Aus den Beobachtungen zu den DELLA-Domänenmutationen aus *Arabidopsis* und Gerste ergab sich die Fragestellung, ob der GA-abhängige Abbau der biochemisch uncharakterisierten DELLA-Repressoren aus den Mais- und Weizenmutanten ebenfalls gestört ist. Es galt somit zu klären, ob dieser Mechanismus ein übergreifendes Erklärungsmodell für den Zwergwuchs von DELLA-Domänenmutanten darstellt.

Zudem war mit der Identifizierung der DELLA-Domänenmutationen aus Mais und Weizen die Frage aufgetaucht, ob zwischen dem Ausmaß der DELLA-Domänenmutation und der Stärke des Zwergwuchses eine Korrelation besteht. Dies ergab sich aus der Beobachtung, dass *Rht-B1b*, *Rht-D1b* und *D8-Mpl* leicht zwergwüchsig sind, während *D8-1* über einen starken Zwergwuchs verfügt. Dem gegenüber steht, dass in den DELLA-Proteinen *Rht-B1b*, *Rht-D1b* und *D8-Mpl* die komplette DELLA-Domäne fehlt, während in *D8-1* nur eine kleine, vier Aminosäurereste umfassende Deletion vorliegt (Abbildung 3 und Abbildung 10A; Harberd und Freeling, 1989; Peng et al., 1999b). Diese Beobachtung warf die Frage auf, ob einerseits die Art der Mutation oder andererseits der entsprechende genetische

Hintergrund für diese fehlende Korrelation verantwortlich ist.

Um diese zwei hier beschriebenen Fragestellungen beantworten zu können, wurde ein einheitlicher genetischer und biochemischer Hintergrund gewählt. Dazu wurden die entsprechenden DELLA-Domänenmutationen im Vorfeld dieser Arbeit aus Gerste, Mais und Weizen durch Claus Schwechheimer und Carola Nill in ein genomisches Fragment von *GAI* eingefügt und diese *GAI:GAI*-Konstrukte (sowie das unmodifizierte Wildtypkonstrukt) mittels Transformation in *Arabidopsis thaliana* Col-0 eingebracht (Abbildung 10A; Willige et al., 2007).

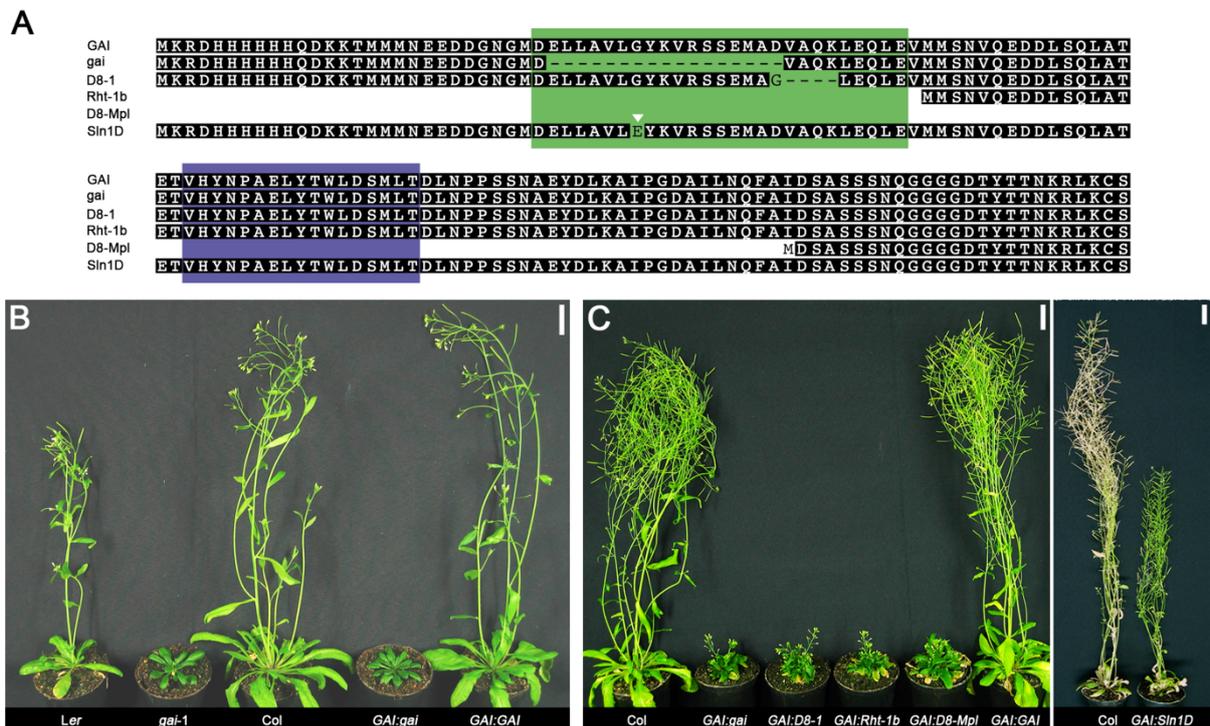


Abbildung 10: Die Expression der mutanten *gai*-Varianten führt zum Zwergwuchs von *Arabidopsis thaliana*.

(A) Vergleich zwischen der N-Termini von GAI und deren Mutantenvarianten. Diese sind *gai* aus *Arabidopsis*, D8-1 und D8-Mpl aus Mais, Rht-1b aus Weizen und Sin1D aus Gerste. Gezeigt werden die ersten 140 Aminosäurereste. Die DELLA-Domäne ist grün und die VHYNP-Domäne blau unterlegt.

(B) Vergleich zwischen einer transgenen *GAI:gai*-Linie und der Landsberg *erecta*-Mutante *gai-1*. Ebenfalls gezeigt werden die Wildtypen Landsberg *erecta* (*Ler*) und Columbia-0 (*Col*) sowie eine transgene *GAI:GAI*-Linie. Gezeigt werden vier Wochen alte Pflanzen.

(C) Vergleich zwischen Wildtyp (*Col*) und den transgenen *gai*-Linien. Die abgebildeten Pflanzen waren 7,5 (linkes Photo) bzw. 8,5 (rechtes Photo) Wochen alt.

Die Größenbalken entsprechen je 2 cm.

Um zu untersuchen, wie die Expression dieser *GAI*-Varianten das Wachstum von Col-0 beeinflussen, wurden die verschiedenen Linien von mir zunächst phänotypisch charakterisiert. Zur Prüfung des zugrundeliegenden experimentellen Ansatzes wurde auch die Mutation des *Ler*-Allels *gai-1* in Col-0 eingebracht und die entsprechenden transgenen Linien mit der *gai-1*-Mutante verglichen. Wie man in Abbildung 10B sieht,

zeigten sowohl *gai-1* und als auch die transgenen *GAI:gai*-Linien einen sehr ähnlichen Mutantenphänotyp. Beide stellten dunkelgrüne, spät blühende, zwergwüchsige Pflanzen dar, während *GAI:GAI*-Linien einen wildtypischen Phänotyp aufzeigten. Dies zeigt, dass der Mutantenphänotyp von *gai-1* durch das Einbringen des *GAI:gai*-Transgens nachgeahmt werden kann. Des Weiteren führten die unterschiedlichen Mutationen aus Mais (*GAI:D8-1* und *GAI:D8-Mpl*) und Weizen (*GAI:Rht-1b*) in Arabidopsis ebenfalls zu einem Phänotyp, der von dem *GAI:gai*-Phänotyp nicht zu unterscheiden war (Abbildung 10C). Im Gegensatz hierzu verfügten die *GAI:Slh1D*-Linien zwar über ein zum Wildtyp verringertes Wachstum sowie eine verzögerte Blühinduktion, beides war aber viel schwächer als in den anderen zwergwüchsigen, transgenen Linien ausgeprägt (Abbildung 10C). Um zu testen, ob dem veränderten Wuchs der zwergwüchsigen transgenen Linien eine GA-Insensitivität (wie sie für *gai-1* beschrieben war [Koorneef et al., 1985; Peng et al., 1997]) zugrunde liegt, wurden die Linien mit GA behandelt. In allen Fällen konnte der Zwergwuchs nicht durch eine Behandlung mit Gibberellinsäure unterdrückt werden (Abbildung 11A). Somit führt die Expression von *gai*, *Rht-1b*, *D8-1* und *D8-Mpl* zu einem *gai-1*-ähnlichen, GA-insensitiven Wachstum. *GAI:Slh1d*-Linien zeigen hingegen nur einen schwachen Phänotyp (Abbildung 10C).

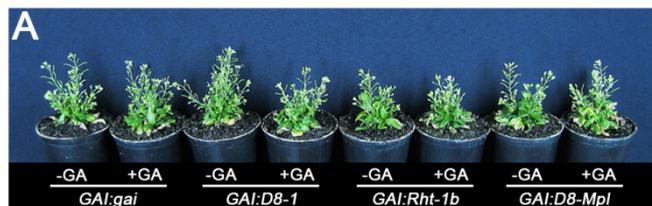
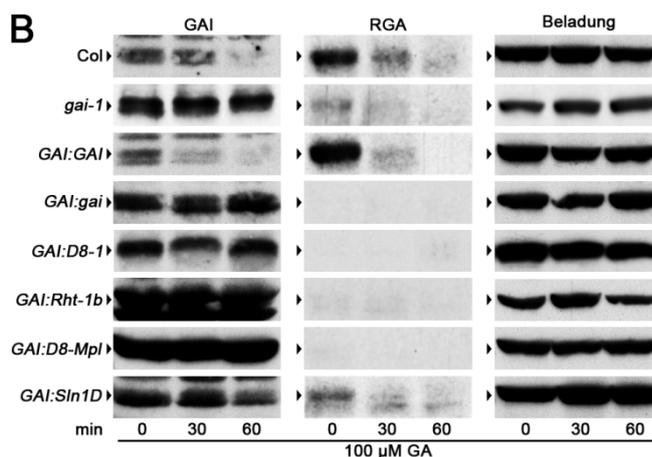
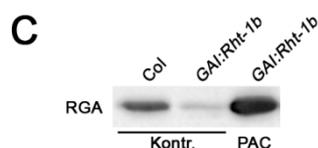


Abbildung 11: Transgene *GAI:gai*-Linien zeigen eine GA-Insensitivität des Wachstums und der DELLA-Proteine.



(A) GA-Behandlung der transgenen Linien, die *gai*, *D8-1*, *Rht-1b* oder *D8-Mpl* exprimieren. Die Pflanzen wurden zwei Mal pro Woche mit 100 µM GA3 behandelt. Die abgebildeten Pflanzen waren 9 Wochen alt. Der Größenbalken entspricht 2 cm. Für die Wirksamkeit der GA-Behandlung siehe Willige et al., 2007 (Supplemental Figure 4).

(B) Immunoblots mit Extrakten von Col, der *Ler*-Mutante *gai-1* sowie den verschiedenen transgenen *GAI*-Linien. Infloreszenzen wurden für die angegebenen Zeiträume mit 100 µM GA3 behandelt.



(C) PAC-Behandlung von *GAI:Rht-1b* führte im Vergleich mit der Kontrollprobe (Kontr.) zu einer Abundanz des RGA-Proteins. In (A) und (B) wurden je 45 µg Proteinextrakt aufgetrennt. Eine kreuzreagierende Bande diente als Ladekontrolle. Die Proteine wurden mit spezifischen Antikörpern gegen GAI und RGA nachgewiesen.

Als nächstes wurden die GAI-Varianten auf biochemischer Ebene analysiert und so untersucht, inwieweit der Phänotyp der transgenen Pflanzen mit dem GA-abhängigen Abbau der GAI-Varianten korreliert (Abbildung 11B). In der *Ler*-Mutante *gai-1* ist das DELLA-Protein *gai* auch in Gegenwart von GA stabilisiert. Somit galt es zu testen, ob die GAI-Varianten der zwergwüchsigen transgenen Linien ein ähnliches Abbauverhalten aufzeigen. Sowohl im Wildtyp als auch in *GAI:GAI* konnte ein Abbau von GAI nach GA-Behandlung beobachtet werden, während in den GA-insensitiven, stark zwergwüchsigen transgenen Pflanzen kein Abbau nachweisbar war. In *GAI:SlN1D* war ein GA-abhängiger, aber im Vergleich mit dem wildtypischen Protein verzögerter Abbau erkennbar, der das Verhalten des SLN1D-Proteins in Gerste widerspiegelt (Gubler et al., 2002). Somit kann im Fall der stark zwergwüchsigen transgenen Linien der GA-insensitive Wuchs mit einer GA-Insensitivität des entsprechenden DELLA-Proteins erklärt werden. Im Falle von *GAI:SlN1D* korreliert die schwache Beeinträchtigung des GA-abhängigen Wachstums (Blühzeitpunkt und Streckungswachstum) wiederum mit einer Hyposensitivität gegenüber dem GA-abhängigen Proteinabbau.

Neben der Menge an GAI-Protein wurde auch die Abundanz des DELLA-Proteins RGA untersucht (Abbildung 11B). Interessanterweise waren in *gai-1* sowie in den zwergwüchsigen, transgenen Linien stark reduzierte RGA-Proteinmengen nachweisbar. Von *gai-1* und Getreidemutanten mit GA-insensitiven Wuchs ist bekannt, dass diese über erhöhte Mengen an aktiven Gibberellinen verfügen (Fujioka et al., 1988; Talon et al., 1990; Chandler et al., 2002), was in den transgenen, zwergwüchsigen Pflanzen zu einem Abbau von RGA führen könnte. Um dies zu testen, wurden exemplarisch *GAI:Rht-1b*-Pflanzen mit dem GA-Biosyntheseinhibitor Paclobutrazol (PAC [Rademacher, 2000]) behandelt, und in Hinblick auf die RGA-Abundanz untersucht (Abbildung 11C). Die PAC-Behandlung führte zu einem starken Anstieg des RGA-Proteins. Dies spricht dafür, dass in *GAI:Rht-1b* und den anderen zwergwüchsigen transgenen Linien eine Gibberellinakkumulierung einen verstärkten RGA-Abbau fördert.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass hier gezeigt werden konnte, dass die transgenen Linien, welche die DELLA-Domänenmutationen aus Arabidopsis, Mais und Weizen tragen, über einen GA-insensitiven Wuchs und über ein GA-insensitives DELLA-Protein verfügen. Somit kann der Zwergwuchs der entsprechenden Getreidemutanten durch dieses veränderte Abbauverhalten der DELLA-Proteine erklärt werden. Im Falle von *SlN1D* liegt nur eine Punktmutation in der DELLA-Domäne vor. Diese Mutation führt sowohl in Gerste als auch, wie hier gezeigt, in Arabidopsis zu einer reduzierten Sensitivität gegenüber dem GA-abhängigen Abbau.

3.1.2 Der GA-abhängige Abbau der DELLA-Proteine erfordert den GA-Rezeptor GID1

GID1 aus Reis war der erste beschriebene GA-Rezeptor (Ueguchi-Tanaka et al., 2005). Das Reisgenom kodiert für ein GID1-Protein. Anders verhält es sich mit *Arabidopsis thaliana*. Das Arabidopsis-Genom kodiert für drei GID1-Proteine (*GID1A*, *GID1B* und *GID1C*). Unsere Arbeitsgruppe war eine der ersten, welche den GA-Rezeptor in Arabidopsis charakterisierte. In diesem Zusammenhang analysierten Claus Schwechheimer und Carola Nill die Phänotypen der Funktionsverlustmutanten und konnten so u.a. zum ersten Mal nachweisen, dass nur der komplette Verlust aller drei GID1-Funktionen eine vollständige physiologische GA-Insensitivität bewirkt (Willige et al., 2007). So zeigt die Mutante *gid1a gid1b gid1c* (*gid1abc*) einen Verlust der Keimfähigkeit, einen extremen Zwergwuchs und eine fehlende Blütenbildung. Dahingegen sind *gid1*-Tripelmutanten mit einer verbliebenen geringen *GID1*-Aktivität in der Lage, Blüten auszubilden (Griffiths et al., 2006). Außerdem konnte in unserer Arbeitsgruppe durch Esther Dohmann gezeigt werden, dass die GA-gesteuerte Genexpression *GID1*-Aktivität erfordert. Dies spricht dafür, dass die drei *GID1*-Proteine die einzigen GA-Rezeptoren in *Arabidopsis thaliana* darstellen. Mein Beitrag zur Untersuchung von *GID1* war die biochemische Charakterisierung der Funktionsverlustmutanten, um die molekulare Ursache für die GA-Insensitivität aufzudecken.

Wie in 3.1.1 beschrieben, führt die Stabilisierung der DELLA-Proteine zu einem GA-insensitiven Wachstum, was sich in einem dunkelgrünen Zwergwuchs äußert. Auch die diversen *gid1*-Mutantenkombinationen zeigen eine Beeinträchtigung des GA-abhängigen Wachstums, wobei *gid1*-Tripelmutanten einen vollständig GA-insensitiven Wuchs vorweisen. Dies wirft die Frage auf, ob die Phänotypen der *gid1*-Mutanten ebenfalls durch ein verändertes Abbauverhalten der DELLA-Proteine erklärt werden können. Zunächst wurden in Einfach- und Mehrfachmutanten (T-DNA-Insertionslinien) die GAI- und RGA-Proteinmengen bestimmt (Abbildung 12A). Dabei konnte beobachtet werden, dass die DELLA-Proteinabundanz in *gid1*-Einfach- und Zweifachmutanten nicht von der des Wildtyps abwich (geringe Unterschiede zum Wildtyp waren nicht reproduzierbar). Im Gegensatz dazu besaß die Mutante *gid1abc* deutlich mehr RGA-Protein, aber dieselbe Menge GAI wie der Wildtyp. Dies deutet an, dass zumindest RGA in *gid1abc* stabilisiert ist. Dahingegen könnte GAI in *gid1abc* wie im Wildtyp durch einen *GID1*-unabhängigen Mechanismus abgebaut werden. Eine andere Erklärung wäre, dass auch GAI wie RGA in *gid1abc* stabilisiert ist. In diesem Fall müsste die GAI-Abundanz aber zusätzlich über einen Mechanismus kontrolliert sein, der sich nicht im selben Maße auf RGA auswirkt. Um zwischen beiden Möglichkeiten zu unterscheiden, wurde als nächstes der GA-abhängige Abbau der DELLA-Proteine in *gid1*-Tripelmutanten untersucht (Abbildung 12B). Während im Wildtyp ein deutlicher Abbau von GAI und RGA nach GA-Behandlung sichtbar war,

waren beide DELLA-Proteine in *gid1abc* vollständig stabilisiert. Somit korreliert das GA-unabhängige Wachstum der *gid1*-Tripelmutante mit einer GA-Insensitivität von RGA und GAI. Dies zeigt, dass der GA-Rezeptor GID1 eine wichtige Rolle für den GA-abhängigen Abbau der DELLA-Proteine einnimmt, und dass der Phänotyp der *gid1*-Tripelmutanten mit der Stabilisierung dieser Repressoren erklärt werden kann. Zusätzlich scheinen die RGA- und GAI-Abundanz durch weitere voneinander abweichende Mechanismen reguliert zu sein.

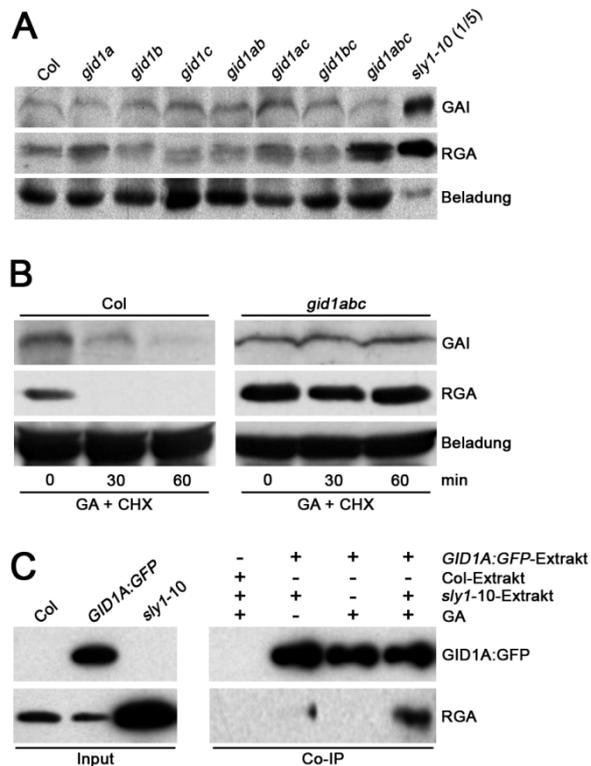


Abbildung 12: GID1 ist notwendig für den GA-abhängigen Abbau der DELLA-Proteine.

(A) GAI- und RGA-Proteinmengen in den verschiedenen *gid1*-Mutantenkombinationen. Aufgetrennt wurden je 45 μ g Proteinextrakt aus Keimlingen. Im Falle der Kontrolle *sly1-10* wurden 9 μ g aufgetrennt. Eine kreuzreagierende Bande diente als Ladekontrolle.

(B) GAI- und RGA-Proteinmengen in Col-0 und *gid1abc* nach Behandlung mit 50 μ M Cycloheximid (CHX) und 100 μ M GA3. Kreuzreagierende Banden dienten als Ladekontrolle.

(C) GA-abhängige Co-Immunpräzipitation von RGA mittels GID1A:GFP. Für die Inputkontrollen wurden 45 μ g Protein aufgetrennt.

Die Proteine wurden mit spezifischen Antikörpern gegen GAI, RGA und GID1A nachgewiesen.

Da sowohl DELLA-Proteine mit einer Deletion der DELLA-Domäne als auch die DELLA-Proteine in *gid1abc* nicht GA-abhängig abgebaut werden, wurde spekuliert, ob die DELLA-Domäne wichtig für eine den Abbau einleitende Interaktion mit dem GA-Rezeptor ist. In der Tat konnte (u.a. in unserer Arbeitsgruppe durch Soumya Ghosh) im Yeast-two-hybrid-System eine GA-abhängige Interaktion zwischen DELLA-Proteinen und GID1 nachgewiesen werden (Ueguchi-Tanaka et al., 2005; Griffiths et al., 2006; Willige et al., 2007). Um zu testen, ob diese Interaktion auch *in planta* stattfindet, wurde von mir eine Co-Immunpräzipitation von RGA mit GID1a durchgeführt (Abbildung 12C). Da es sich bei den DELLA-Repressoren um nicht abundante Proteine mit geringer Halbwertszeit handelt, wurde die F-box-Protein-Mutante *sly1-10*, welche große Mengen an DELLA-Proteinen akkumuliert (McGinnis et al., 2003; Dill et al., 2004), für dieses Experiment verwendet. Dazu wurde GID1A:GFP aus transgenen Pflanzen mittels α -GFP-Agarose immunpräzipitiert und anschließend mit Proteinextrakt aus *sly1-10* in An- und

Abwesenheit von GA inkubiert. Es konnte so eine deutliche GA-abhängige Interaktion zwischen GID1A:GFP und RGA nachgewiesen werden, was darauf hindeutet, dass die DELLA-Proteine und GID1A auch *in planta* miteinander interagieren.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass GA GID1A aktiviert, sodass eine Bindung mit RGA stattfindet. Ein aktiver GA-Rezeptor sowie die DELLA-Domäne sind notwendig für den Abbau der DELLA-Proteine. Fehlt einer dieser beiden Schlüsselfaktoren, unterbleibt der GA-abhängige Abbau, und die DELLA-Proteine sind stabilisiert. Diese Zusammenhänge lassen sich so interpretieren, dass die GID1-DELLA-Repressor-Interaktion eine Bedingung für den Abbau der DELLA-Proteine darstellt. Sind die Voraussetzungen für die Bindung nicht gegeben, führt dies zu einer Inhibierung des GA-Signalwegs, was sich u.a. in dem Zwergwuchs der GA-Signaltransduktionsmutanten äußert.

3.2 GA-Auxin-Crosstalk: Die GA-abhängige Regulierung des Auxintransports und der PIN-Abundanz

3.2.1 In Gibberellinmutanten ist der Auxintransport reduziert

In Erbse und Pappel konnten Hinweise auf einen Einfluss von Gibberellinen auf den Transport von Auxin beobachtet werden (Jacobs und Case, 1965; Björklund et al., 2007; Mauriat et al., 2011). So konnte gezeigt werden, dass die Gabe von Gibberellinen den basipetalen Auxintransport innerhalb des Sprosses stimuliert. Zusätzlich zeigen Gibberellinmutanten von *Arabidopsis thaliana* eine reduzierte Apikaldominanz (Koorneef et al., 1985; Silverstone et al., 1997; Dill et al., 2004). Die Apikaldominanz stellt ein auxintransportabhängiges Entwicklungsmerkmal dar (Thimann und Skoog, 1933; Snyder, 1949). Somit stellte sich die Frage, ob auch in *Arabidopsis thaliana* eine GA-abhängige Regulierung des Auxintransports besteht. Für eine solche Untersuchung verwendete ich GA-Biosynthese- und GA-Signaltransduktionsmutanten zweier Ökotypen. Da Auxintransport am besten in Infloreszenzen gemessen werden kann (Lewis und Muday, 2009), konnten starke Gibberellinmutanten wie *gid1abc* oder *ga1* für dieses Experiment nicht ohne weiteres verwendet werden, da sie keine Infloreszenzen ausbilden. In *ga1* ist die GA-Biosynthese in einem frühen Schritt blockiert (Sun und Kamiya, 1994), weshalb die Mutante im Vorfeld mit GA behandelt wurde. Dies komplementierte den starken Phänotyp, sodass Infloreszenzen ausgebildet wurden. Diese Behandlung wurde drei Wochen vor der Messung des Auxintransports eingestellt. Ein GA-Mangel war zum Zeitpunkt der Transportmessung aufgrund der reduzierten Apikaldominanz und der stärkeren Chlorophyllakkumulierung im Vergleich zum Wildtyp erkennbar. Eine in der Mutante ablaufende GA-Signaltransduktion aufgrund verbliebener Gibberellinsäure konnte aber nicht ausgeschlossen werden. Zusätzlich wurden noch die GA-Signaltransduktionsmutanten *gai-1* und *gid1ac* untersucht, welche im Vergleich mit *gid1abc* und *ga1* einen relativ schwachen Phänotyp vorweisen. Von den drei möglichen *gid1*-Doppelmutantenkombinationen wurde *gid1ac* gewählt, da in unserem Labor durch Claus Schwechheimer und Carola Nill gezeigt werden konnte, dass diese Mutante die stärkste Beeinträchtigung des Sprosswachstums aufweist (Willige et al., 2007), da *GID1B* im Spross schwächer exprimiert wird als *GID1A* und *GID1C* (Suzuki et al., 2009). Die Messung des Auxintransports zeigte, dass in allen untersuchten GA-Mutanten ein zum jeweiligen Wildtyp reduzierter Auxintransport vorlag (Abbildung 13). Durch Verwendung des Auxintransportinhibitors N-1-Naphthylphthalaminsäure (NPA [Thomson et al., 1973; Lewis und Muday, 2009]) konnte sichergestellt werden, dass aktiver Auxintransport und nicht passive Diffusion gemessen wurde. Dies deutet darauf hin, dass eine Beeinträchtigung der GA-Biosynthese und der GA-Signaltransduktion in *Arabidopsis thaliana* zu einer Reduzierung des aktiven Auxintransports führen.

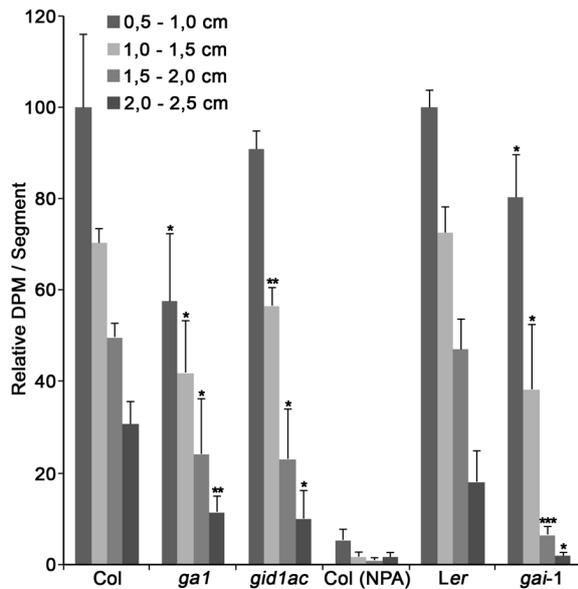


Abbildung 13: Der reduzierte Auxintransport in GA-Biosynthese- und GA-Signaltransduktionsmutanten.

Auxintransport wurde in 2,5 cm langen Segmenten der primären Infloreszenz von 6 bis 7 Wochen alten Pflanzen mittels radioaktiv markierter IES gemessen. Anschließend wurde das Gewebe in 0,5 cm-Abschnitte aufgeteilt und deren Radioaktivität bestimmt (DPM: *disintegrations per minute* [Zerfälle pro Minute]). Angegeben ist die Entfernung des Abschnitts zur Auxinquelle. Die NPA-Behandlung diente als Negativkontrolle. Die Werte sind relativ zum ersten Segment des jeweiligen Wildtyps angegeben. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen. Die Signifikanz wurde mittels Student's *t*-Test bestimmt (* $0,01 < p < 0,05$; ** $0,001 < p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

3.2.2 GA reguliert die Menge an PIN-Protein

Die in 3.2.1 beschriebene Auxintransportmessung zeigte, dass die Gibberellinsignaltransduktion einen Einfluss auf den gerichteten Auxintransport in Arabidopsis ausübt. Für den Auxintransport sind Auxininflux- sowie -effluxtransporter verantwortlich. Zur ersten Gruppe gehören AUX1 sowie LAX1, LAX2 und LAX3, während die PIN-Proteine Effluxtransporter darstellen. Somit stellt sich die Frage, ob die GA-abhängige Regulierung des Auxintransports über eine Veränderung der Auxintransporterabundanz oder –membranpolarität verläuft. Um dies zu untersuchen, wurde in Wurzelmeristemen von etablierten transgenen Linien die Menge an AUX1, PIN1, PIN2 und PIN3 nach Behandlung mit dem GA-Biosyntheseinhibitor Paclobutrazol (PAC) untersucht. Die Analyse mittels konfokaler Mikroskopie zeigte im Fall von *AUX1:YFP:AUX1* keine deutlichen Unterschiede zwischen Kontrollkeimlingen und PAC-behandelten Keimlingen (Abbildung 14A). Im Gegensatz dazu war in den Linien *PIN1:PIN1:GFP*, *PIN2:PIN2:GFP* und *PIN3:PIN3:GFP* eine quantifizierbare, signifikante Reduzierung des GFP-Signals nach PAC-Behandlung zu erkennen (Abbildung 14B und C). Diese Unterschiede beschränkten sich aber auf die Wurzelspitze und waren im differenzierten Gewebe der Wurzelhaarzone nicht nachweisbar. Des Weiteren war sichtbar, dass die für die einzelnen PIN-Proteine charakteristische polare Membranpolarität durch die PAC-Behandlung nicht verändert wurde. Somit könnte die durch eine Störung der GA-Signaltransduktion hervorgerufene Beeinträchtigung des Auxintransports durch eine GA-abhängige Regulierung der PIN-Proteinabundanz erklärt werden.

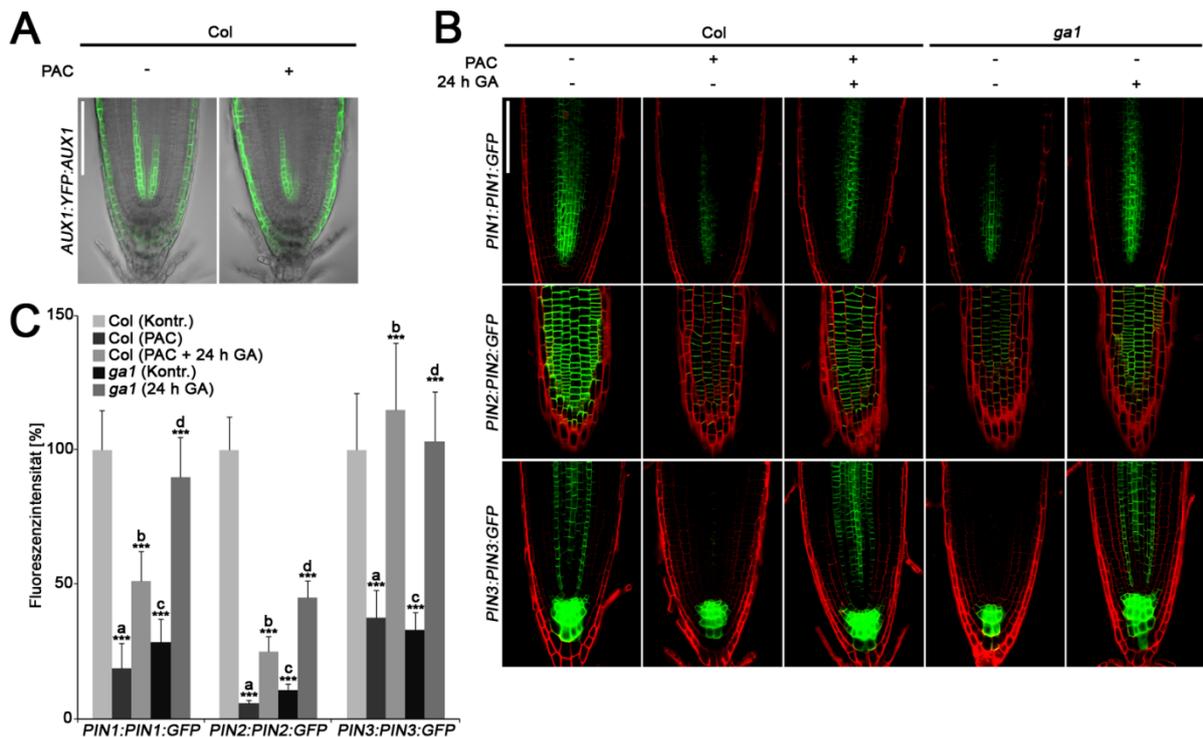


Abbildung 14: Zellbiologischer Nachweis der durch GA-Mangel verringerten PIN-Proteinabundanz.

(A) Konfokale Aufnahme der Wurzelspitze von sieben Tage alten *AUX1:YFP:AUX1*-Keimlingen nach PAC-Behandlung. Die Fokusebene befindet sich innerhalb der Stele.

(B) Konfokale Aufnahme der Wurzelspitze von sieben Tage alten *PIN:PIN:GFP*-Keimlingen nach PAC- und GA-Behandlung. Die Fokusebenen befinden sich im Zentrum der Stele (*PIN1:GFP* und *PIN3:GFP*) oder in der Epidermis (*PIN2:GFP*). Die Wurzelspitzen wurden mit Propidiumiodid (PI) gefärbt. Das GFP-Signal ist grün, während die PI-Färbung rot dargestellt ist.

(C) Quantifizierung von Fluoreszenzsignalen, wie sie in **(B)** dargestellt werden. Für jede Quantifizierung wurde die Fluoreszenzintensität der apikalen (*PIN2:GFP*) oder basalen (*PIN1:GFP* und *PIN3:GFP*) Zellmembran von mindestens 60 Zellen gemessen. Die Werte sind relativ zur Wildtypkontrolle angegeben. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen. Die Signifikanz wurde mittels Student's *t*-Test bestimmt (***p* < 0,001). a, b, c und d bezeichnet die verglichenen Probenpaare: a: Col (Kontr.) und Col (PAC); b: Col (PAC) und Col (PAC+GA); c: Col (Kontr.) und *ga1* (Kontr.); d: *ga1* (Kontr.) und *ga1* (GA).

Kontrollkeimlinge (- bzw. Kontr.) wuchsen auf den entsprechenden Lösungsmitteln. Die Größenbalken entsprechen 100 μ m.

PAC blockiert neben der GA-Synthese auch weitere Biosyntheseprozesse (Rademacher, 2000). Somit kann nicht sichergestellt werden, dass der beobachtete PAC-Effekt auf die PIN-Abundanz wirklich der beeinträchtigten GA-Biosynthese zuzuschreiben ist. Um die Beteiligung anderer GA-unabhängiger Einflüsse auf die PIN-Abundanz auszuschließen, kreuzte ich die *PIN:PIN:GFP*-Linien in die GA-Biosynthesemutante *ga1* ein. Auch in der *ga1*-Mutante war im Vergleich zum Wildtyp eine signifikante, auf die Wurzelspitze beschränkte Reduzierung des GFP-Signals in allen drei Linien sichtbar (Abbildung 14B und C). Des Weiteren konnte beobachtet werden, dass eine 24-stündige GA-Behandlung die Reduzierung der PIN:GFP-Mengen in GA-defizienten Keimlingen (PAC-behandelte

Wildtypkeimlingen bzw. *ga1*-Keimlingen) partiell aufhob (Abbildung 14B und C). Zusätzlich konnte die Reduzierung der PIN-Proteinmenge in *ga1* durch eine Langzeitbehandlung mit GA vollständig supprimiert werden (Abbildung 15). Dass zum einen der PAC-Effekt auf die PIN-Proteine auch in unbehandelten *ga1*-Keimlingen sichtbar war, und dass zum anderen die GA-Behandlung diesen Effekt aufhob, zeigt, dass Gibberelline die Menge an PIN:GFP-Protein in der Wurzelspitze kontrollieren.

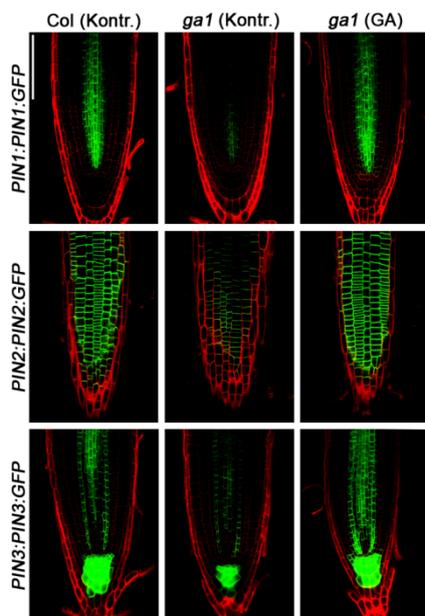


Abbildung 15: Suppression der PIN:GFP-Abundanz-reduzierung in *ga1* durch GA3.

Konfokale Aufnahmen der Wurzelspitzen von *PIN:PIN:GFP*-Keimlingen. *ga1*-Keimlinge wurden für sieben Tage auf 1 μ M GA3 angezogen. Außerdem wurden Col-0 und *ga1* mit dem entsprechenden Lösungsmittel behandelt (Kontr.). Die Fokusebenen befinden sich im Zentrum der Stele (PIN1:GFP und PIN3:GFP) oder in der Epidermis (PIN2:GFP). Die Wurzelspitzen wurden mit Propidiumiodid (PI) gefärbt. Das GFP-Signal ist grün, während die PI-Färbung rot dargestellt ist. Der Größenbalken entspricht 100 μ m.

Das Proteinverhalten in transgenen Linien muss nicht notwendigerweise das Verhalten der endogenen Proteine widerspiegeln, da zum einen genomische Transgenkonstrukte eventuell nicht alle regulatorischen Elemente umfassen und da zum anderen Fusionsproteine gegenüber dem unmarkierten Protein veränderte Eigenschaften (Proteinsyntheserate, intrazellulärer Proteintransport und Proteinabbau) aufweisen können (Snapp, 2009; Yewdell et al., 2011). Aus diesem Grund wurden die PIN-Proteinmengen direkt mittels Westernblots überprüft. Zuerst wurde getestet, ob die Reduzierung von PIN1:GFP in Wurzelspitzen von *ga1* auch mit Hilfe dieses Ansatzes nachweisbar ist. Dazu wurden zum einen Proteinextrakte der gesamten Wurzel angefertigt. Zum anderen wurden Proteinextrakte aus jeweils ca. 100 Primärwurzelspitzen hergestellt (Abbildung 16A). Im Gegensatz zum Gesamtwurzelextrakt konnte in Extrakten der Wurzelspitzen ein deutlicher Unterschied in der PIN1:GFP-Menge zwischen dem Wildtyp und *ga1* nachgewiesen werden (Abbildung 16B und C). Somit konnte mittels dieses biochemischen Ansatzes die mikroskopische Beobachtung bestätigt werden. Des Weiteren zeigte die Analyse der endogenen Proteine PIN1 und PIN2 ebenfalls eine in *ga1* auf die Wurzelspitze beschränkte Reduzierung der Proteinabundanz (Abbildung 16D bis G). Durch eine Quantifizierung von je drei

Westernblots pro untersuchtem PIN-Protein (PIN1:GFP, PIN1 und PIN2) konnte in *ga1* eine Reduzierung der Proteinmengen um jeweils ca. 30% nachgewiesen werden. Dies zeigt, dass auch die Menge an endogenem PIN-Protein durch GA reguliert wird.

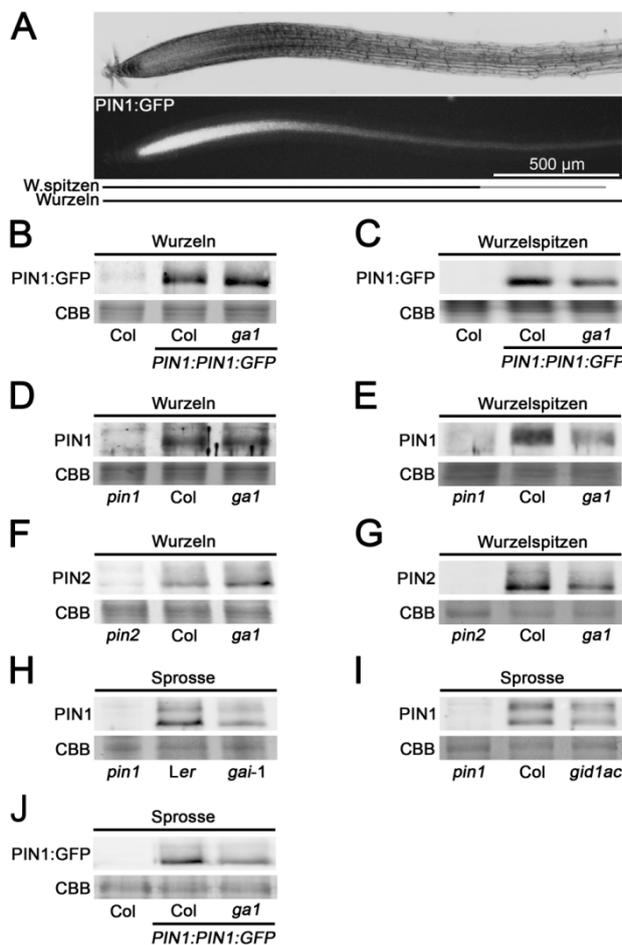


Abbildung 16: Biochemischer Nachweis der durch GA-Mangel verringerten PIN-Proteinabundanz.

(A) Licht- sowie Epifluoreszenzbild der Wurzelspitze eines *PIN1:GFP*-Keimlings. Die darunter abgebildete schwarz-graue Linie gibt die Größe der für die Immunoblots verwendeten Wurzelspitzen (W.spitzen) an (siehe [C], [E] und [G]).

(B) und (C) Immunoblots mit 15 µg Proteinextrakt aus Wurzeln bzw. Wurzelspitzen von 7 Tage alten *PIN1:PIN1:GFP*-Keimlingen. Antikörper gegen GFP diente zum Nachweis von PIN1:GFP.

(D) und (E) Immunoblots mit 15 µg Proteinextrakt aus Wurzeln bzw. Wurzelspitzen von 7 Tage alten Keimlingen. PIN1 wurde mittels spezifischem anti-PIN1-Antikörper detektiert.

(F) und (G) Immunoblots mit 45 µg Membranproteinextrakt aus Wurzeln bzw. mit 15 µg Gesamtproteinextrakt aus Wurzelspitzen von 7 Tage alten Keimlingen. PIN2 wurde mittels spezifischem anti-PIN2-Antikörper detektiert.

(H) bis (J) Immunoblots mit 15 µg Proteinextrakt aus Sprossesegmenten von sechs bis sieben Wochen alten Pflanzen. PIN1 bzw. PIN1:GFP wurde mittels spezifischen anti-PIN1- bzw. anti-GFP-Antikörpern nachgewiesen.

Coomassiefärbungen (CBB) dienten in allen Experimenten als Ladekontrolle.

Die in 3.2.2 beschriebene Auxintransportmessung zeigte den Einfluss von GA-Synthese und GA-Signaltransduktion auf den Auxintransport in Sprossesegmenten. Um zu untersuchen, ob nicht nur in Wurzelspitzen, sondern auch in dem dort analysierten Gewebe die PIN-Proteinmenge durch GA reguliert wird, wurde die Menge an PIN1 in *ga1*, *gid1ac* sowie *gai-1* bestimmt und mit dem jeweiligen Wildtyp verglichen. In allen drei Mutanten war eine verringerte PIN1-Menge im Sprossgewebe aufzeigbar (Abbildung 16H bis J). Somit konnte gezeigt werden, dass Gibberelline in unterschiedlichen Geweben die Menge der PIN-Proteinen regulieren. Daher könnte der reduzierte Auxintransport in den GA-Mutanten mit einer GA-abhängigen Kontrolle der PIN-Proteinabundanz erklärt werden.

3.2.3 GA-regulierte *PIN*-Transkription und *PIN*-Abundanz korrelieren nicht

Die in 3.2.2 beschriebene, durch GA-Defizienz hervorgerufene Reduzierung der *PIN*-Proteine im Wurzelmeristem könnte durch eine GA-abhängige Regulierung der *PIN*-Transkription erklärt werden. Um dies zu testen, wurden bereits etablierte *PIN*-Promotor:*GUS*-Linien untersucht (Benková et al., 2003; Vieten et al., 2005). Dazu wurde die *GUS*-Expression nach PAC-Behandlung bzw. in *ga1* analysiert. Im Zustand der GA-Defizienz, eine Situation, die zu einer Reduzierung der *PIN1*-Proteinmenge in Wurzelspitzen führte, konnte in den *PIN1:GUS*-Linien ein starker Anstieg des *GUS*-Signals beobachtet werden. Durch GA-Behandlung konnte diese *PIN1:GUS*-Expression wiederum verringert werden (Abbildung 17A). Im Falle von *PIN2:GUS* lag im Wildtyp und der *ga1*-Mutante eine vergleichbar starke *GUS*-Expression vor (Abbildung 17B). Wurde *PIN2:GUS* mit PAC behandelt, konnte im Gegensatz zur *ga1*-Mutante eine Verringerung des *GUS*-Signals in der Wurzelspitze beobachtet werden. Da dieses Verhalten nicht GA-reversibel war, waren scheinbar GA-unabhängige, PAC-regulierte Prozesse für diese Reduzierung verantwortlich (Rademacher, 2000), die in diesem Zusammenhang als nicht physiologisch relevant erachtet wurden. Im Falle von *PIN3:GUS* hatten weder GA-Defizienz noch GA-Zugabe einen Einfluss auf die *GUS*-Expression in der Wurzelspitze (Abbildung 17C).

Fasst man diese Beobachtungen zusammen, lässt sich sagen, dass die GA-abhängige Regulierung der *PIN*-Transkription nicht die Kontrolle der *PIN*-Proteinmengen durch GA erklären kann.

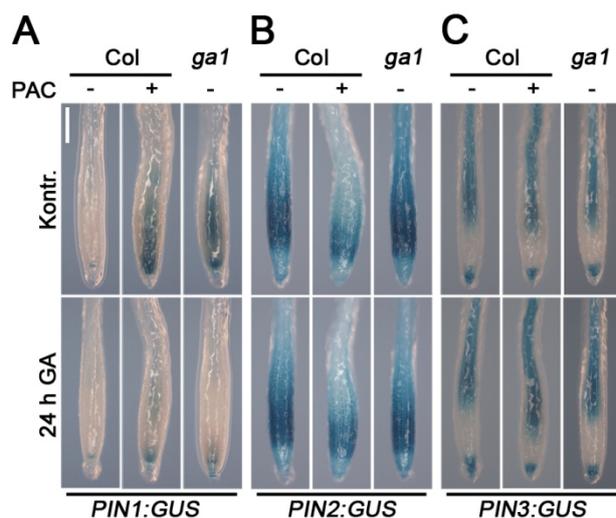


Abbildung 17: Die *PIN*-Transkription erklärt nicht die durch GA-Mangel hervorgerufene Reduzierung der *PIN*-Proteinmengen in Wurzelspitzen.

Abgebildet sind Fotos von Wurzelspitzen transgener Col- und *ga1*-Keimlinge, welche *PIN1:GUS* (A), *PIN2:GUS* (B) oder *PIN3:GUS* (C) exprimieren. PAC- und GA-Behandlungen wurden wie in den in Abbildung 14 dargestellten Experimenten durchgeführt. Der Größenbalken entspricht 200 µm.

3.2.4 GA-Defizienz fördert den Transport von PIN2 in die Vakuole

Die in 3.2.3 beschriebenen Transkriptionsanalyse deutet darauf hin, dass die Gibberellinsignaltransduktion die Menge an PIN-Protein über einen posttranskriptionellen Mechanismus reguliert. So könnte GA-Defizienz bei unveränderter (*PIN2* und *PIN3*) oder erhöhter (*PIN1*) *PIN*-Expression den Abbau der PIN-Proteine fördern, um den Auxinefflux zu senken. Um diese Möglichkeit zu prüfen, wurde PIN2 genauer untersucht, da dieses Protein im Vergleich mit den anderen PIN-Proteinen in seinem intrazellulären Transport- und Abbauverhalten zum Zeitpunkt dieser Arbeit am besten verstanden war (Abas et al., 2006; Kleine-Vehn et al., 2008). So ist bekannt, dass PIN2 nach einer Kette von Transportschritten von den prävakuolären Kompartimenten (PVCs) in die Vakuole transportiert und dort abgebaut wird. Der Proteintransport von den PVCs zur Vakuole lässt sich chemisch mit Wortmannin (WM) beeinflussen. WM inhibiert Phosphatidylinositol-3-Kinasen, was zur einer Identitätsänderung der PVCs führt (Matsuoka et al., 1995). Dies hat eine PIN2-Akkumulierung nach WM-Behandlung zur Folge, da das Protein nicht weiter dem vakuolären Abbau zugeführt wird (Abbildung 18A; Kleine-Vehn et al., 2008). Um zu untersuchen, ob Gibberelline einen Einfluss auf den PIN2-Transport in die Vakuole ausüben, behandelte ich Wildtyp- und *ga1*-Keimlinge mit WM und detektierte PIN2 aus 1,5 bis 2 mm langen Wurzelspitzen mittels Immunoblots. Wie bereits in Abbildung 16G gezeigt, war in Proteinextrakten aus unbehandelten *ga1*-Keimlingen eine reduzierte

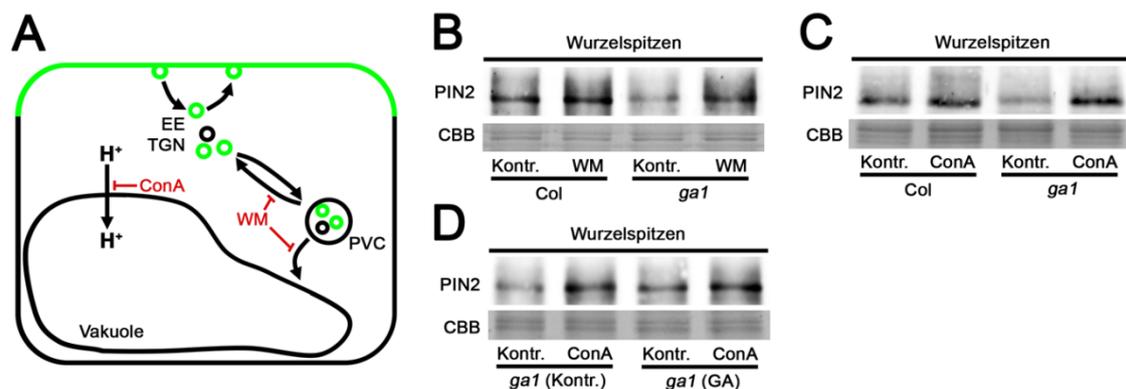


Abbildung 18: GA-Mangel fördert den vakuolären Abbau von PIN2.

(A) Schematische Darstellung zur Wirkungsweise von WM und ConA innerhalb einer Wurzelepidermiszelle. WM blockiert den Proteintransport aus den prävakuolären Kompartimenten (PVC), und ConA inhibiert die vakuolären Protonenpumpen. In grün ist die Lokalisierung des PIN2-Proteins dargestellt (EE: frühe Endosomen, TGN: trans-Golgi-Netzwerk).

(B) bis (D) Immunoblots mit 10 µg Proteinextrakt aus Wurzelspitzen von 6 Tage alten Keimlingen. *Col* und *ga1* wurden für 6 h mit 33 µM WM ([B]) bzw. für 7 h mit 1 µM ConA behandelt ([C] und [D]). Für die GA-Behandlung wurden *ga1*-Keimlinge auf 1 µM GA3 angezogen, während die Keimlinge für die Kontrollbehandlungen (Kontr.) dem jeweiligen Lösungsmittel ausgesetzt wurden. Coomassiefärbungen (CBB) dienten als Ladekontrolle.

PIN2-Menge im Vergleich mit dem Wildtyp nachweisbar. Dahingegen führte die WM-Behandlung von Col-0 und *ga1* zu einer vergleichbaren PIN2-Abundanz in der Wurzelspitze (Abbildung 18B). Somit kommt es in *ga1* nach WM-Behandlung (im Vergleich mit der Kontrollbehandlung) zu einer stärkeren PIN2-Akkumulierung als im Wildtyp. Dieses Ergebnis könnte man dadurch erklären, dass im Wildtyp und in *ga1* ähnlich große Mengen an PIN2-Protein produziert werden, dass aber in *ga1* mehr PIN2 dem vakuolären Abbau zugeführt wird. Um diese Interpretation zu testen, wurden Wildtyp- und *ga1*-Keimlinge mit Concanamycin A (ConA) behandelt. ConA inhibiert die vakuolären H-ATPasen, deren biochemische Aufgabe es ist, durch den Transport von Protonen den pH-Wert innerhalb der Vakuole zu senken (Abbildung 18A). Während das saure Milieu den vakuolären Abbau von Proteinen fördert, führt die ConA-Behandlung zu einer Akkumulierung dieser Proteine innerhalb der Vakuole (Páli et al., 2004; Kleine-Vehn et al., 2008). Im Einklang mit der oben beschriebenen Deutung des WM-Experiments führte auch die ConA-Gabe zu einer stärkeren Akkumulierung von PIN2 in der *ga1*-Mutante als im Wildtyp (Abbildung 18C). Dieselbe Beobachtung konnte bei einem Vergleich von GA-behandelten mit unbehandelten *ga1*-Keimlingen ebenfalls gemacht werden (Abbildung 18D).

Zusammenfassend zeigen diese Experimente eine Hypersensitivität von *ga1* gegenüber WM und ConA. Dies spricht dafür, dass in Abwesenheit von GA ein erhöhter vakuolärer Abbau für die Reduzierung von PIN2-Protein in der Wurzelspitze (3.2.2) verantwortlich ist. Dieser Mechanismus könnte also die GA-abhängige Regulierung der PIN-Abundanz erklären.

3.2.5 GA-Defizienz beeinträchtigt die Embryogenese

Die oben dargestellten Experimente liefern Hinweise darauf, dass GAs den Auxintransport durch eine Regulierung der PIN-Effluxproteine beeinflussen. Daraus ergab sich die Fragestellung, ob diese GA-abhängige Kontrolle Auxintransport- und PIN-abhängige physiologische Prozesse steuert und somit eine Rolle für das Wachstum und die Entwicklung von Arabidopsis hat. Zum Beispiel war bereits bekannt, dass eine chemische oder genetische Störung des Auxintransports zu einer beeinträchtigten Embryogenese führt (Okada et al., 1991; Galweiler et al., 1998; Hadfi et al., 1998; Zourelidou et al., 2009). Die Folge sind u.a. eine Reduzierung, Vermehrung oder Fusion der Kotyledonen (Abbildung 19A). Da GA-Defizienz an der Kontrolle der PIN-Proteine beteiligt ist, ergab sich die Frage, ob GA die Embryogenese reguliert. Um dies zu testen, wurden in Zusammenarbeit mit Melina Zourelidou die Nachkommen der Mutanten *ga1/ga1*, *pin1/PIN1* (homozygote *pin1*-Mutanten produzieren keine Samen) und *ga1/ga1 pin1/PIN1* auf Keimblattdefekte analysiert. Dazu mussten die Pflanzen mit *ga1*-

Hintergrund mit GA behandelt werden, um eine Induzierung der Blütenbildung hervorzurufen. Nach der Ausbildung der ersten Blüten wurde die GA-Gabe gestoppt, um eine Komplementierung des GA-defizienten Phänotyps zu unterbinden. In Einklang mit früheren Untersuchungen (Huang et al., 2010), zeigten wildtypische Keimlinge kaum Embryogenesedefekte (0,24%, n = 424), während 13,3% der *pin1/pin1*-Keimlinge (n = 97 von 388 *pin1/PIN1*-Nachkommen) nur ein Keimblatt oder drei bzw. fusionierte Kotyledonen aufzeigten (Abbildung 19B). Verglichen mit dem Wildtyp war der Anteil an *ga1/ga1*-Keimlingen mit Kotyledonendefekten 7,5 Mal so hoch (1,8% [n = 443]).

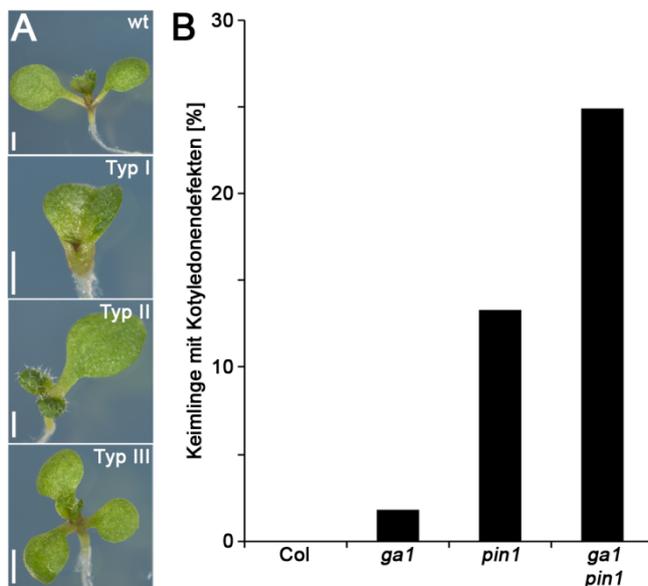


Abbildung 19: GA-Biosynthese ist notwendig für die Keimblattentwicklung.

(A) Fotos von acht Tage alten *ga1*-Keimlingen mit wildtypischem Phänotyp (wt), fusionierten Keimblättern (Typ I), einem Keimblatt (Typ II) oder drei Keimblättern (Typ III). Die Größenbalken entsprechen 1 mm.

(B) Quantifizierung der Keimlinge mit Kotyledonendefekten, wie sie in (A) dargestellt sind.

Auffällig war der starke Anstieg an untersuchten Defekten, wenn die *ga1*- und *pin1*-Allele zusammen vorlagen. Der Anteil der Keimlinge, die die beschriebenen Phänotypen zeigten, lag bei 25% (n = 225 von 900 *ga1/ga1 pin1/PIN1*-Nachkommen), und war somit größer als die Summe der Anteile beider Einzelmutanten (1,8% und 13,3%). Die Analyse der Keimblattdefekte liefert somit einen Hinweis darauf, dass ein Mangel an Gibberellinen die Entwicklung des Embryos beeinträchtigt. Interpretiert man diese Beobachtung im Zusammenhang mit den oben beschriebenen Ergebnissen, so könnte GA den Auxintransport während der Embryogenese über die Kontrolle der PIN-Abundanz stimulieren. Somit führt GA-Defizienz zu einer Reduzierung der PIN-Menge in der Zellmembran und damit zu einer Senkung des Auxineffluxes, was die Ursache für die beobachteten Embryogenesedefekte darstellen könnte.

3.2.6 GA-Defizienz beeinträchtigt den Wurzelgravitropismus

Da GA die PIN2-Proteinmenge reguliert (3.2.2 und 3.2.4) ergab sich die Fragestellung, ob GA auch an der Kontrolle von PIN2-abhängigen Wachstumsprozessen beteiligt ist. So ist

PIN2 für einen basipetalen Auxinfluss in der seitlichen Wurzelhaube und der Epidermis der Wurzelspitze verantwortlich. Die Regulierung dieses PIN2-abhängigen Auxinflusses erzeugt bei einer Änderung des Gravitationsvektors ein laterales Auxinmaximum. Dieses entsteht auf der unteren Seite der Wurzelspitze (also auf der Seite, welche in Richtung des Gravitationsvektors zeigt) und inhibiert in diesem Gewebe die Zellelongation. So erfolgt eine Neuausrichtung der Wachstumsrichtung der Wurzelspitze. Aufgrund dieser Zusammenhänge sind *pin2*-Funktionsverlustmutanten agravitrop (Luschnig et al., 1998; Müller et al., 1998; Ottenschläger et al., 2003). Um eine Beteiligung von Gibberellinen am Wurzelgravitropismus zu untersuchen, wurde das Wurzelwachstum von *ga1* nach einer Änderung des Gravitationsvektors um 135° analysiert. Während sich die Wurzeln des Wildtyps nach sechs Stunden fast vollständig parallel zum neuen Vektor ausgerichtet hatten, war in *ga1* eine verzögerte Reorientierung zu beobachten (Abbildung 20A).

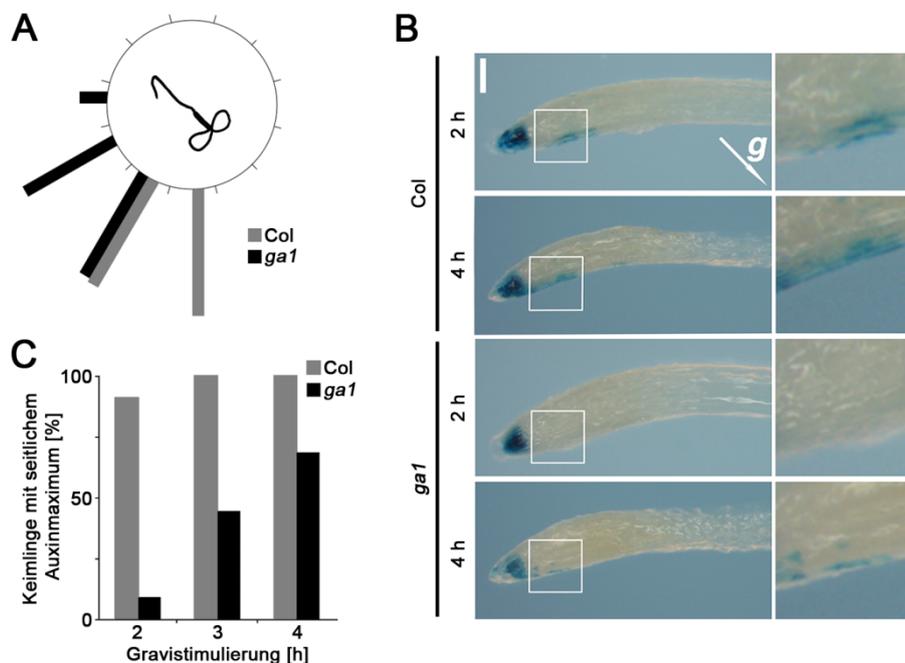


Abbildung 20: GA-Mangel beeinträchtigt den Wurzelgravitropismus.

(A) Orientierung des Wurzelwachstums von Col-0 und *ga1* nach Gravistimulation. Die Wachstumsrichtung der Wurzelspitze wurde 6 h nach Gravistimulation ausgewertet. n ≥ 36.

(B) Repräsentative Fotos der Wurzelspitze von *DR5:GUS* und *ga1 DR5:GUS* nach zwei- oder vierstündiger Gravistimulation. In den rechten Bildern sind die Vergrößerungen der in den linken Bildern eingerahmten Bereiche dargestellt. Der Größenbalken entspricht 100 µm. *g* gibt den Gravitationsvektor an.

(C) Quantifizierung der Keimlinge mit lateralem *DR5:GUS*-Maximum in der Wurzelspitze, wie es in (B) gezeigt wird. n ≥ 18 pro Linie, pro Zeitpunkt.

Während der Antwort auf eine Änderung des Gravitationsvektors kommt es zu einer Umverteilung von Auxin, und damit zu einer lateralen Akkumulation des Hormons in der Wurzelspitze. Dieses lokale, seitliche Auxinmaximum kann mit Hilfe von *DR5*-

Reportergenen sichtbar gemacht werden (Ottenschläger et al., 2003). In dem künstlichen Promotor *DR5* liegen *auxin response*-Elemente vor, sodass das *GUS*-Gen in Antwort auf Auxin exprimiert wird (Ulmasov et al., 1997b; Sabatini et al., 1999). Um eine Beteiligung von GA an der Ausbildung des lateralen Auxinmaximums zu untersuchen, kreuzte ich *DR5:GUS* in *ga1* ein, um die Expression des Reportergens nach Gravistimulierung (Änderung des Gravitationsvektors um 135°) im Wildtyp und in *ga1* zu untersuchen. Hier konnte beobachtet werden, dass fast alle Wildtypkeimlinge nach zwei Stunden das beschriebene, laterale Auxinantwortmaximum in der Wurzelspitze aufwiesen. Zum gleichen Zeitpunkt zeigten nur 9% der *ga1*-Keimlinge dieselbe Antwort. Nach weiteren zwei Stunden stieg der Anteil auf 68% an (Abbildung 20B+C). Die beobachtete, verzögerte Anpassung an einen neuen Gravitationsvektor geht also mit einer verzögerten Bildung eines lokalen Auxinmaximums einher. Aus den hier beschriebenen Beobachtungen lässt sich ableiten, dass Gibberelline für den Wurzelgravitropismus nicht notwendig sind. Dahingegen führt die Abwesenheit von GA zu einer verzögerten Auxinantwort nach einer Änderung des Gravitationsvektors. Ein PIN2-abhängiger Auxinfluss ist die Voraussetzung für die Ausbildung eines lateralen Auxinmaximums und damit einer gewebespezifischen Auxinantwort. Somit könnte die beobachtete Reduzierung der PIN2-Proteinmenge durch GA-Defizienz den basipetalen Auxintransport limitieren und so für den beeinträchtigten Wurzelgravitropismus von *ga1* verantwortlich sein.

Zusammengefasst zeigt diese Arbeit, dass die GA-Signaltransduktion den Auxintransport und auxintransportabhängige Prozesse steuert. Dieser *Crosstalk* kann am besten mit einer posttranskriptionellen Regulierung der PIN-Abundanz durch GA erklärt werden. Diese beeinflussen zumindest im Fall von PIN2 eine Kontrolle des vakuolären Abbaus.

3.3 GA-Auxin-Crosstalk: Die GA-abhängige Regulierung der WAG2-Expression und der Apikalhakenentwicklung

3.3.1 GA aktiviert die Transkription von WAG2

Die in 3.2.2 bis 3.2.4 beschriebenen Ergebnisse sprechen dafür, dass die Gibberellinsignaltransduktion die Auxineffluxtransporter der PIN-Familie über einen posttranskriptionellen Mechanismus reguliert. Hinweise für eine direkte transkriptionelle Aktivierung der PINs durch GA konnten ich im Laufe der Untersuchungen nicht finden. Andere Komponenten des Auxintransports könnten aber einer GA-abhängigen Transkriptionsregulierung unterliegen.

Einige AGCVIII-Kinasen wurden zuvor im Zusammenhang mit einer Kontrolle des Auxintransports diskutiert. Zum Beispiel konnte ich selbst zeigen, dass Mitglieder der D6PK-Familie den Auxintransport regulieren, und dass D6PK das Auxineffluxprotein PIN1 *in vivo* phosphoryliert (Zourelidou et al., 2009). Auch PID, WAG1 und WAG2 sind in der Lage, PINs zu phosphorylieren, und ändern auf diese Weise die PIN-Polarität in der Zellmembran (Friml et al., 2004; Dhonukshe et al., 2010).

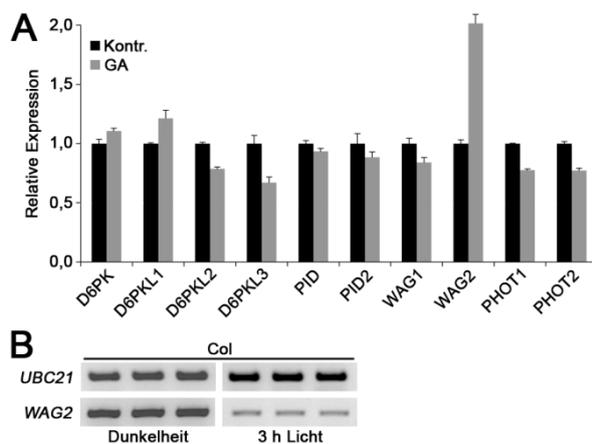


Abbildung 21: Die Expression des AGC-Kinasegens WAG2 wird durch GA und Licht reguliert.

(A) qRT-PCR der *D6PK*-, *PID*- und *PHOT*-Genfamilien aus 7 Tage alten, im Dauerlicht gewachsenen *ga1*-Keimlingen nach Behandlung mit 100 μ M GA3 für 3 h. Behandlung mit dem entsprechenden Lösungsmittel diente als Kontrolle (Kontr.).

(B) sqRT-PCR von *WAG2* aus 4 Tage alten etiolierten Wildtypkeimlingen (Col). Die Lichtbehandlung erfolgte mittels Weißlicht (150 μ mol m^{-2} s). Gezeigt werden je drei technische Replikate.

UBC21 diente in beiden Experimenten als Referenzgen.

Aufgrund der offensichtlichen Bedeutung der AGCVIII-Kinasen für den Auxintransport war mein Interesse groß, zu analysieren, ob GA die Expression von AGC-Kinasegen steuert und dadurch den Auxintransport reguliert. Um dies zu testen, wurde die GA-defiziente Arabidopsis-Mutante *ga1* mit GA behandelt. Anschließend wurde die Expression der *D6PK*-Familie (Zourelidou et al., 2009), der *PID*-Familie (auch genannt AGC3-Unterfamilie; bestehend aus *PID* [Benjamins et al., 2001], *PID2* [Cheng et al., 2008] sowie *WAG1* und *WAG2* [Santner und Watson, 2006]) und der Phototropin-Gene *PHOT1* und *PHOT2* (Liscum und Briggs, 1995; Huala et al., 1997; Briggs et al., 2001; Sakai et

al., 2001) mittels qRT-PCR untersucht (Abbildung 21A). Bei dem Vergleich zwischen GA-behandelten und Kontrollkeimlingen wurden geringe, nicht reproduzierbare Unterschiede in den Expressionsniveaus der einzelnen Gene detektiert. Eine Ausnahme bildete die Expression von *WAG2*. Hier war eine reproduzierbare Aktivierung der Genexpression nach Gibberellinsäurebehandlung nachweisbar.

Eine auf dieses Experiment folgende Literaturrecherche ergab, dass die Transkription des zu *WAG1* und *WAG2* homologen Kinasegens aus Gurke (*Cucumis sativus*) *CsPK3* ebenfalls durch GA stimuliert und außerdem durch Licht reprimiert wird (Chono et al., 1998; Chono et al., 2001). Letzteres wurde ebenfalls für *PsPK3*, dem homologen Kinasegen aus Erbse (*Pisum sativum*), gezeigt (Lin et al., 1991; Khanna et al., 1999). Um zu testen, ob die lichtabhängige Transkriptionsregulierung von *PK3* auch für *WAG2* aus *Arabidopsis* konserviert ist, wurden etioliierte Keimlinge für drei Stunden mit Weißlicht behandelt. Im Vergleich zu den Kontrollkeimlingen konnte hier eine deutliche Reduzierung der *WAG2*-Expression nach semiquantitativer RT-PCR festgestellt werden (Abbildung 21B). Somit lässt sich zusammenfassen, dass die Expression von *WAG2* durch Gibberelline und Licht gesteuert wird und dass dieser Regulationsmechanismus evolutionär konserviert ist.

3.3.2 *WAG2* verzögert die Öffnung des Apikalhakens

Die Phänotypen der Funktionsverlustmutanten von *WAG1* und *WAG2* deuten darauf hin, dass beide Kinasen an der Regulierung des Auxintransports in Embryonen und Wurzeln beteiligt sind (Santner und Watson, 2006; Cheng et al., 2008; Dhonukshe et al., 2010). Diese Beobachtungen zusammen mit dem oben beschriebenen Expressionsverhalten von *WAG2* legen eine Beteiligung der paralogen Kinasegene an einem durch Auxin, Gibberellin sowie Licht regulierten Prozess nahe. Aus diesem Grund wurde das Wachstum von vier Tage alten, etioliierten, mutanten Keimlingen untersucht. Bei den analysierten Einzel- und Doppelmutanten handelt es sich um Funktionsverlustmutanten (Santner und Watson, 2006). Die Untersuchung der Hypokotyllänge (Abbildung 22) zeigte keinen

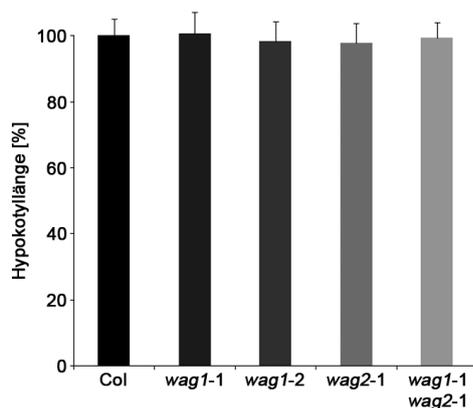


Abbildung 22: *wag1*- und *wag2*-Mutanten zeigen keine veränderte Hypokotyllänge.

Relative Länge des Hypokotyls von 4 Tage alten, etioliierten Wildtyp- (*Col*) und *wag*-Keimlingen. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen relativ zur Wildtypmessung. $n \geq 32$.

signifikanten Unterschied zwischen dem Wildtyp und den verschiedenen Mutanten. Dahingegen konnte ich beobachten, dass die Mutanten *wag2-1* und *wag1-1 wag2-1* einen weiter geöffneten Apikalhaken aufwiesen als Wildtypkeimlinge (Abbildung 23A). Die Entwicklung des Apikalhakens lässt sich in drei Phasen unterteilen, die Bildungs-, die Aufrechterhaltungs- und die Öffnungsphase (Raz und Ecker, 1999; Vandenbussche et al., 2010; Zadnikova et al., 2010). Um im Detail zu untersuchen, in welcher dieser Phasen innerhalb der Mutanten Defekte auftreten, wurden die Winkel der Apikalhaken von zwei bis vier Tage alten Keimlingen gemessen (Abbildung 23B). Dabei wurde der Winkel eines vollständig geschlossenen Hakens als 180° und der eines vollständig geöffneten Hypokotylhakens als 0° definiert. Die Beobachtung, dass zwei Tage alte Keimlinge aller untersuchten Linien einen vollständig geschlossenen Haken aufwiesen, deutet auf eine ungestörte Bildungsphase in den Mutanten. Dahingegen wiesen drei und vier Tage alte *wag2-1*- und *wag1-1 wag2-1*-Keimlinge einen im selben Maße stärker geöffneten Apikalhaken als der Wildtyp oder die *wag1*-Einzelmutanten auf. Daraus lässt sich schließen, dass WAG2 entweder die Aufrechterhaltung des Apikalhakens fördert oder die Geschwindigkeit der Öffnungsphase negativ reguliert, wohingegen WAG1 nicht an dem untersuchten Prozess beteiligt ist.

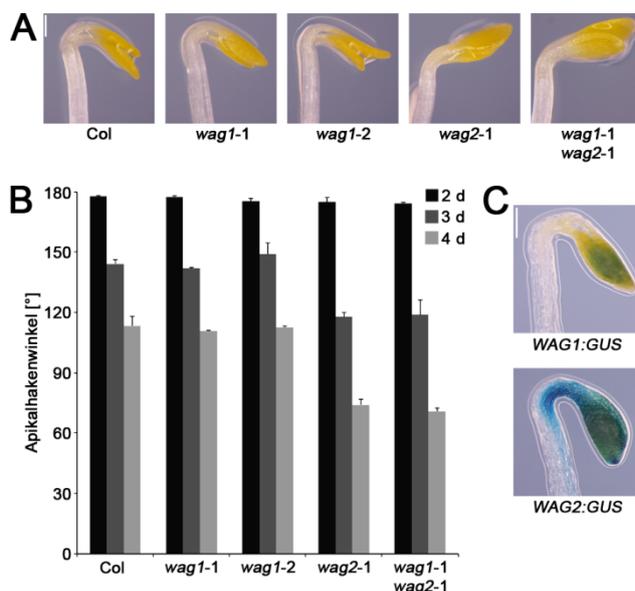


Abbildung 23: WAG2 reguliert die Apikalhakenentwicklung.

(A) Fotos der Sprossapices von 4 Tage alten, etiolierten Keimlingen.

(B) Messung des Apikalhakenwinkels in 2 bis 4 Tage alten, etiolierten Keimlingen. Ein geschlossener Haken wurde als 180° definiert. Dargestellt sind die Mittelwerte aus je zwei unabhängigen Experimenten sowie die Standardabweichungen ($n \geq 41$).

(C) GUS-Färbung von 3 Tage alten, etiolierten *WAG1:GUS*- und *WAG2:GUS*-Keimlingen. Die Linien wurden für dieselbe Dauer gefärbt.

Die Größenbalken entsprechen $200 \mu\text{m}$.

Die beiden WAG-Kinasen bzw. ihre katalytischen Domänen weisen eine Aminosäureidentität von 75% bzw. 81% auf (Santner und Watson, 2006). Dies macht es unwahrscheinlich, dass die voneinander abweichenden, oben beschriebenen Phänotypen der Einzelmutanten durch unterschiedliche biochemische Eigenschaften erklärt werden können. Dahingegen könnte eine unterschiedliche Regulierung der Expression beider Gene als Erklärung dienen. Um die gewebespezifische Expression der beiden Gene in

Sprossapices von etiolierten Keimlingen zu untersuchen, stellte ich Promotor-GUS-Linien her (Abbildung 23C). In *WAG1:GUS*-Linien konnte eine schwache Expression innerhalb der Keimblätter beobachtet werden. Dieselbe Färbedauer führte in den *WAG2:GUS*-Linien zu einem stärkeren GUS-Signal innerhalb der Kotyledonen. Zusätzlich war ein Expressionsmaximum innerhalb der Hydathoden und auf der Innenseite des Apikalhakens nachweisbar. Im Gegensatz dazu führte auch eine längere Färbedauer nicht zu einer *WAG1:GUS*-Expression innerhalb des Hypokotylhakens. Somit lässt sich zusammenfassen, dass *WAG2*, dessen Funktionsverlust zu einem Apikalhakenphänotyp führt, auch im Hypokotylhaken exprimiert wird. Die physiologische Untersuchung deutet darauf hin, dass sich in *wag2* der Apikalhaken schneller öffnet, da zwischen Tag 3 und Tag 4 die Veränderung des Hakenwinkels in *wag2* stärker ausfiel als im Wildtyp. Dies schließt eine frühere Öffnung aber nicht aus. *WAG1* ist im Hypokotylhaken nicht exprimiert und scheint auch nicht an dessen Entwicklung beteiligt zu sein.

3.3.3 GA ist notwendig für die *WAG2*-Expression innerhalb des Apikalhakens

Gibberellinsignaltransduktion ist für die Aufrechterhaltung des Apikalhakens notwendig (Achard et al., 2003; Gallego-Bartolomé et al., 2011). Daraus ergibt sich die Fragestellung, ob eine GA-abhängige *WAG2*-Transkription an diesem Prozess beteiligt ist. Um die GA-abhängige Expression von *WAG2* mittels qRT-PCR zu untersuchen, wurden Wildtypkeimlinge auf Paclobutrazol (PAC) und *ga1*-Keimlinge auf GA im Dunkeln angezogen. Die Analyse ergab, dass GA-Defizienz zu einer starken Reduzierung und GA-Gabe zu einem Anstieg (in *ga1*) der *WAG2*-Expression führte (Abbildung 24A). Auch etiolierte Keimlinge der GA-Signaltransduktionsmutante *gai-1* zeigten, im Vergleich zum Wildtyp, eine reduzierte *WAG2*-Transkription auf (Abbildung 24B). Um gewebespezifisch zu untersuchen, ob innerhalb des Apikalhakens eine GA-abhängige Expressionsregulierung stattfindet, wurden die *WAG2:GUS*-Linien genutzt. Eine Analyse des Sprossapex zeigte, dass GA-Defizienz die *WAG2:GUS*-Expression innerhalb der Keimblätter und innerhalb des Hypokotylhakens negativ reguliert und eine GA-Gabe zu einer Normalisierung der Expression führt (vgl. Abbildung 23C und Abbildung 24C).

Um die Rolle der *WAG2*-Aktivität für die GA-abhängige Aufrechterhaltung des Apikalhakens zu untersuchen, wurde der Einfluss von GA auf die Öffnung des Apikalhakens von *wag2*- und *ga1*-Einzel- und Doppelmutanten geprüft. Dazu wurde der Winkel der Apikalhaken von 3,5 Tage alten, etiolierten Keimlingen bestimmt. Zu diesem Zeitpunkt waren die Hypokotylhaken des Wildtyps leicht und die der *wag2*-Mutanten zur Hälfte geöffnet. Die GA-Biosynthesemutante *ga1* zeigte einen fast vollständig geöffneten Apikalhaken auf. Dies galt auch für die Doppelmutante *wag2 ga1*. Während aber die

Gabe von Gibberellinsäure zu einer Normalisierung der Apikalhakenöffnung in *ga1* führte, konnte dies im Fall von *wag2* nicht beobachtet werden. Die Doppelmutante *wag2 ga1* zeigte nach GA-Gabe nur eine partielle Suppression des Phänotyps. Hier entsprach der gemessene Apikalhakenwinkel dem der *wag2*-Einzelmutante.

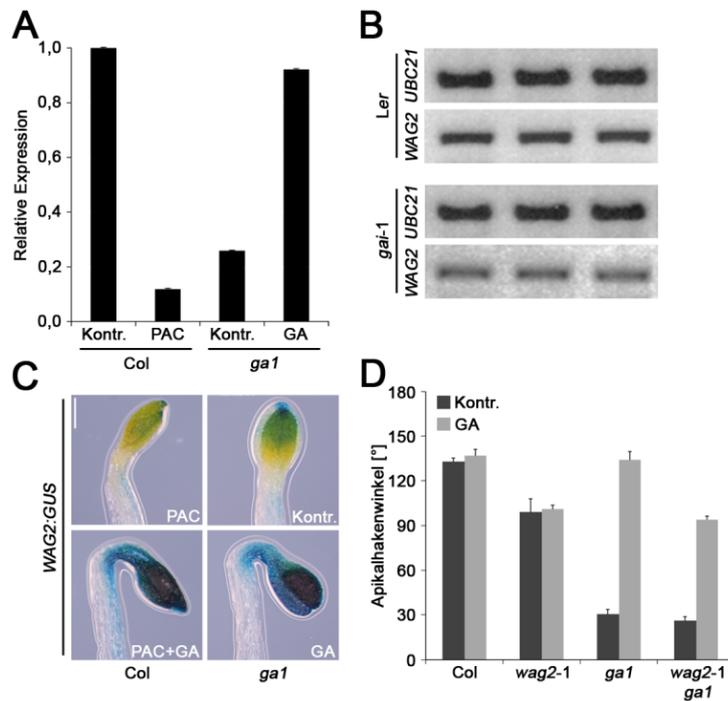


Abbildung 24: Die Expression von WAG2 in etiolierten Keimlingen ist GA-abhängig.

(A) qRT-PCR von *WAG2* aus 4 Tage alten, etiolierten Wildtyp- (Col) und *ga1*-Keimlingen nach Keimung auf 1 μ M PAC bzw. 1 μ M GA3. Behandlungen mit den entsprechenden Lösungsmitteln dienten als Kontrolle (Kontr.).

(B) sqRT-PCR von *WAG2* aus 4 Tage alten, etiolierten Wildtyp- (Ler) und *gai-1*-Keimlingen. Es werden je drei technische Replikate dargestellt. Wie in **(A)** diene *UBC21* als Referenzgen.

(C) GUS-Färbung von 3 Tage alten, etiolierten *WAG2::GUS*-Keimlingen mit Wildtyp- (Col) oder *ga1*-Hintergrund nach

Keimung auf 0,1 μ M PAC und/oder 0,1 μ M GA3. Behandlungen mit den entsprechenden Lösungsmitteln dienten als Kontrolle (Kontr.). Der Größenbalken entspricht 200 μ m.

(D) Messung des Apikalhakenwinkels in 3,5 Tage alten, etiolierten *wag2*- und *ga1*-Einzel- und Doppelmutanten nach Keimung auf 1 μ M GA3. Behandlung mit dem entsprechenden Lösungsmittel diene als Kontrolle (Kontr.). Dargestellt sind die Mittelwerte aus zwei unabhängigen Experimenten und die Standardabweichungen ($n \geq 40$).

Zusammenfassend zeigt dies, dass die *WAG2*-Expression innerhalb des Apikalhakens durch GA reguliert wird und dass die *WAG2*-Aktivität für die GA-abhängige Aufrechterhaltung des Apikalhakens notwendig ist. Dies spricht dafür, dass *WAG2* epistatisch zu GA ist.

3.3.4 Die Expression von *WAG2* wird PIF-abhängig reguliert

Die DELLA-Proteine stellen negative Regulatoren der GA-Signaltransduktion dar. Diese Repression funktioniert zum Teil über die Interaktion und Inhibition einer Gruppe von Transkriptionsfaktoren, den PHYTOCHROME INTERACTING FACTORS (PIFs [de Lucas et al., 2008; Feng et al., 2008]), welche in Gegenwart von Licht abgebaut werden (Bauer et al., 2004; Monte et al., 2004; Park et al., 2004; Shen et al., 2005; Lorrain et al., 2008; Castillon et al., 2009; Schwechheimer und Willige, 2009). Da die Expression von *WAG2*

Licht- und GA-abhängig ist, ergab sich für mich die Fragestellung, ob diese Antwort über die PIFs reguliert wird. Um dies zu testen, bestimmte ich die *WAG2*-mRNA-Menge in diversen *pif*-Funktionsverlustmutanten mittels qRT-PCR in etiolierten Keimlingen (Abbildung 25A). Während *pif1*- und *pif3*-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp keine signifikant veränderte *WAG2*-Expression zeigten, wies die *pif1 pif3*-Doppelmutante (*pif13*) eine reduzierte Menge des *WAG2*-Transkripts auf. In der *pif4*-Mutante war eine größere *WAG2*-mRNA-Menge als im Wildtyp nachweisbar. Dahingegen zeigte sich, dass die *pif5*-Einzelmutante und die *pif1 pif3 pif4 pif5*-Quadrupelmutante (*pif1345*) ein zum Wildtyp reduziertes *WAG2*-Expressionsniveau besaßen. In der *pif4 pif5*-Doppelmutante (*pif45*) lag die nachgewiesene *WAG2*-Expression zwischen denen der beiden Einzelmutanten.

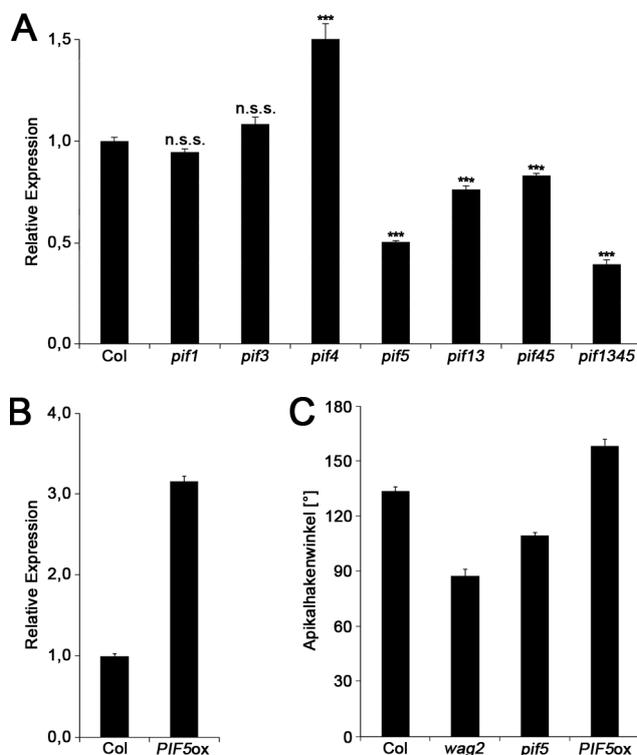


Abbildung 25: PIFs regulieren die Expression von *WAG2*.

(A) qRT-PCR von *WAG2* aus 3 Tage alten, etiolierten Wildtypkeimlingen (Col) und *pif*-Mutanten. *UBC21* diente als Referenzgen. Die Signifikanz der Unterschiede zum Wildtyp (Col) wurde mittels Student's *t*-Test bestimmt (n.s.s.: nicht statistisch signifikant; ***: extrem statistisch signifikant).

(B) qRT-PCR von *WAG2* aus 3 Tage alten, etiolierten Wildtyp (Col)- und *35S:PIF5:HA* (*PIF5ox*)-Keimlingen. *At3g50685* diente als Referenzgen.

(C) Messung des Apikalhakenwinkels in 3,5 Tage alten, etiolierten Wildtypkeimlingen sowie *wag2*-, *pif5*- und *PIF5ox*-Mutanten. Dargestellt sind die Mittelwerte aus zwei unabhängigen Experimenten sowie die Standardabweichungen ($n \geq 40$).

Um zu bestätigen, dass PIF5 die *WAG2*-Expression aktiviert, galt es zu testen, ob *PIF5*-Überexpressoren gegenüber dem Wildtyp eine erhöhte *WAG2*-mRNA-Abundanz aufweisen. Wie in Abbildung 25B zu sehen, zeigen *PIF5*-Überexpressoren eine dreifach höhere Menge an *WAG2*-Transkript. Als nächstes wurde untersucht, ob die veränderte *WAG2*-Expression mit einer Störung der Apikalhakenentwicklung einhergeht. Dazu wurde der Apikalhaken von 3,5 Tage alten Keimlingen untersucht. Hierbei konnte beobachtet werden, dass *pif5*-Mutanten einen weiter geöffneten Apikalhaken als der Wildtyp zeigten, während die Überexpressoren einen stärker geschlossenen Apikalhaken aufwiesen (Abbildung 25C). Somit deuten meine Untersuchungen darauf hin, dass PIF5, im

Vergleich mit den anderen drei untersuchten PIFs, den stärksten Positivregulator der *WAG2*-Transkription darstellt. Dies steht im Einklang mit der gemessenen Zunahme der *WAG2*-Transkription in *PIF5*-Überexpressoren und den gemessenen Apikalhakenwinkeln in *pif5*-Mutanten und *PIF5*-Überexpressoren.

3.3.5 *WAG2* phosphoryliert die PIN-Auxintransporter

Chemische oder genetische Beeinträchtigung des Auxintransports stört die Entwicklung des Apikalhakens (Lehman et al., 1996; Friml et al., 2002; Chaabouni et al., 2009; Vandenbussche et al., 2010; Zadnikova et al., 2010). Dabei sind die Auxineffluxtransporter PIN1, PIN3, PIN4 und PIN7 unter anderem an der Aufrechterhaltung des Hypokotylhakens beteiligt. Des Weiteren ist bekannt, dass einige AGCVIII-Kinasen in der Lage sind PIN-Proteine zu phosphorylieren. So konnte z.B. gezeigt werden, dass *WAG2* PIN2 *in vitro* phosphoryliert und dass *WAG2*-Überexpression zu einer Polaritätsänderung von PIN2 in Wurzelkortexzellen führt (Dhonukshe et al., 2010). Somit könnte *WAG2* die Öffnung des Apikalhakens durch Steuerung der Richtung des PIN-abhängigen Auxintransports kontrollieren.

PIN2, als zuvor beschriebenes Substrat der *WAG2*-Kinase, wird nicht innerhalb des Apikalhakens exprimiert (Zadnikova et al., 2010). Somit ergab sich die Frage, ob andere PINs, die an der Aufrechterhaltung des Apikalhakens beteiligt sind, *WAG2*-Substrate darstellen. Um dies zu testen, exprimierte ich die zytoplasmatischen Domänen von PIN1, PIN2 (diente als Positivkontrolle), PIN3, PIN4 und PIN7 als GST-markierte Peptide in *E. coli*. Auch *WAG2* wurde als GST-markiertes Protein exprimiert. Zusätzlich wurde eine inaktive *WAG2*-Kinase hergestellt, welche eine Mutation in der ATP-Bindetasche trägt. Durch die eingefügte Mutation (K117E) wird der positiv geladene Lysinrest durch den negativ geladenen Glutaminsäurerest ausgetauscht, und es geht die für die Kinaseaktivität notwendige Fähigkeit, ein negativ geladenes ATP-Molekül zu binden, verloren. Mit den rekombinaten Proteinen führte ich *in vitro*-Phosphorylierungsexperimente durch (Abbildung 26A). In diesen Experimenten war *WAG2*, nicht aber die inaktive Variante, in der Lage, alle fünf PIN-Peptide zu phosphorylieren. Somit stellen alle fünf PIN-Proteine, die am interzellulären Auxintransport beteiligt sind, potentielle Substrate der *WAG2*-Kinase dar.

Publizierte Untersuchungen zur biologischen Funktion von *WAG2* deuten darauf hin, dass die Kinase an der Steuerung der PIN-Polarität beteiligt ist (Dhonukshe et al., 2010; Ding et al., 2011). Somit galt es zu untersuchen, ob *WAG2* auch die Polarität der Auxintransporter während der Aufrechterhaltungs- oder Öffnungsphase des Hypokotylhakens beeinflusst. Dazu kreuzte ich *PIN1:PIN1:GFP* und *PIN3:PIN3:GFP* in *wag2* ein, um die PIN:GFP-Polarität innerhalb der Zellen des Apikalhakens mittels

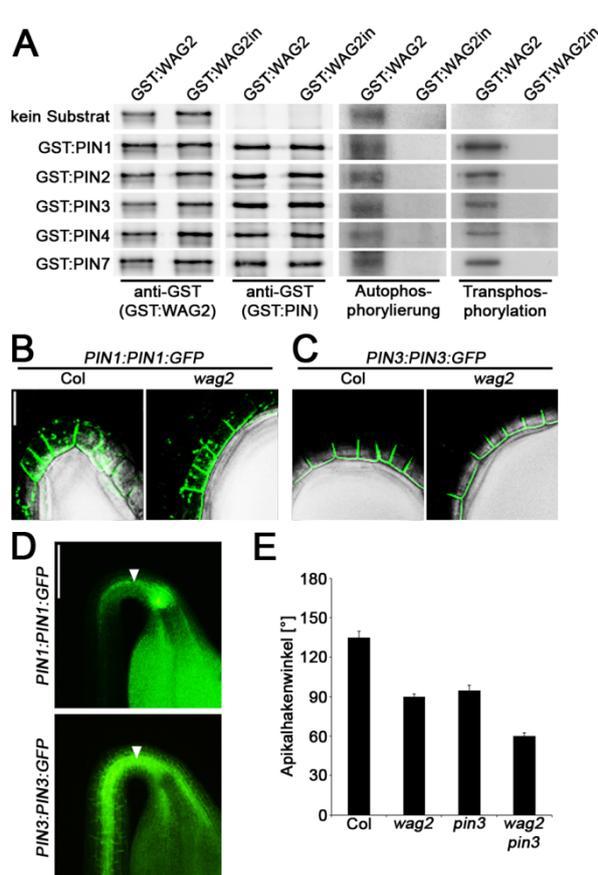


Abbildung 26: WAG2 phosphoryliert die PIN-Auxintransporter.

(A) *in vitro*-Phosphorylierung der hydrophilen, zytoplasmatischen PIN-Domänen durch GST:WAG2.

(B) und **(C)** Konfokale Aufnahme von PIN1:GFP **(B)** und PIN3:GFP **(C)** in der Epidermis. Gezeigt werden die Innenseiten der Apikalhaken von 3,5 Tage alten Wildtyp- (Col) und *wag2*-Keimlingen. Die Keimblätter zeigen nach rechts. Die Fokusebene befindet sich innerhalb des Zentralzylinders. Der Größenbalken entspricht 25 μ m.

(D) Epifluoreszenzaufnahme des Sprossapex von 3,5 Tage alten, etiolierten *PIN1:PIN1:GFP*- bzw. *PIN3:PIN3:GFP*-Keimlingen. Der Größenbalken entspricht 200 μ m. Die weißen Pfeilspitzen zeigen auf den Zentralzylinder innerhalb des Apikalhakens. Das dort sichtbare GFP-Signal konnte mittels konfokaler Mikroskopie nicht nachgewiesen werden.

(E) Messung des Apikalhakenwinkels in 3,5 Tage alten, etiolierten Wildtypkeimlingen sowie *wag2*- und *pin3*-Einzel- und Doppelmутanten. Dargestellt sind die Mittelwerte aus zwei unabhängigen Experimenten und die Standardabweichungen ($n \geq 49$).

konfokaler Mikroskopie zu analysieren. Sowohl im Wildtyp als auch in *wag2* konnte PIN1:GFP in Epidermiszellen in der Innenseite des Apikalhakens nachgewiesen werden. PIN3:GFP war in Epidermis- und Kortexzellen des gesamten Hypokotylhakens detektierbar. Beide Proteine waren vornehmlich apolar lokalisiert. Nur eine Fokussierung in die zentrale Ebene des Hypokotylhakens zeigte eine polare Verteilung beider PINs in Epidermiszellen: In der Hakeninnenseite war die Lokalisierung auf die apikale, die basale und die distal laterale Zellmembran beschränkt (Abbildung 26B und C). Die Untersuchungen mittels konfokaler Mikroskopie lieferten somit keinen Hinweis darauf, dass WAG2 die Polarität oder die Abundanz von PIN1 und PIN3 innerhalb des Apikalhakens reguliert. Bei dieser Analyse fiel aber auf, dass beide untersuchten PIN:GFP-Proteine nur in den äußeren Gewebeschichten des Apikalhakens nachweisbar waren (Epidermis und Kortex). Dahingegen werden *PIN1:GUS* und *PIN3:GUS* am stärksten innerhalb des Zentralzylinders des Apikalhakens exprimiert (Zadnikova et al., 2010; Gallego-Bartolomé et al., 2011). Wie ich jedoch für PIN1 in Wurzelspitzen zeigen konnte, ist aufgrund einer posttranskriptionellen PIN-Regulierung die Stärke der *PIN*-Transkription nicht zwangsläufig mit der Stärke der PIN-Proteinabundanz identisch (3.2.3). Daher wurden die *PIN:GFP*-Linien zusätzlich mittels Epifluoreszenzmikroskopie

untersucht, da diese eine bessere Durchdringung des Gewebes ermöglicht. Diese Untersuchung zeigte, dass die Signalstärke von PIN1:GFP und PIN3:GFP innerhalb des Zentralzylinders am größten ist (Abbildung 26D), was darauf hindeutet, dass die gewebespezifische Intensität der *PIN*-Transkription (Zadnikova et al., 2010; Gallego-Bartolomé et al., 2011) und die der PIN-Proteinabundanz im Apikalhaken übereinstimmen. Daraus ergibt sich, dass scheinbar technische Grenzen der konfokalen Mikroskopie für eine fehlende Detektierung der PIN:GFP-Proteine innerhalb des Zentralzylinders und der Endodermis verantwortlich sind. Somit kann also nicht ausgeschlossen werden, dass WAG2 die PIN-Polarität oder PIN-Abundanz innerhalb dieser Gewebe reguliert.

Um einen Einfluss von WAG2 auf die PIN-abhängige Apikalhakenentwicklung zu untersuchen, wurde eine Kreuzung von *wag2* mit *pin3* durchgeführt. *pin3* zeigt von allen *pin*-Einzelmutanten den stärksten Apikalhakenphänotyp (Zadnikova et al., 2010). 3,5 Tage alte *pin3*-Keimlinge wiesen wie *wag2*-Mutanten einen halb geöffneten Hypokotylhaken auf (Abbildung 26E). Die Kombination der *wag2*- und *pin3*-Allele beeinträchtigte die Apikalhakenentwicklung zusätzlich, da die Doppelmutante im Vergleich mit den beiden Einzelmutanten einen weiter geöffneten Haken zeigte. Damit kann zusammenfassend gesagt werden, dass alle untersuchten PIN-Proteine durch WAG2 phosphoryliert werden. Eine sich daraus ergebende Kontrolle der PIN-Polarität oder PIN-Abundanz konnte aufgrund der beschriebenen technischen Einschränkungen nicht nachgewiesen, aber auch nicht ausgeschlossen werden. Außerdem konnte beobachtet werden, dass sowohl WAG2 als auch PIN3 die Entwicklung des Apikalhakens regulieren, und dass der Funktionsverlust beider Gene zu einer Verstärkung des Apikalhakenphänotyps führt.

3.3.6 GA und WAG2 sind an der Ausbildung des Auxinmaximums innerhalb des Apikalhakens beteiligt

Aktiver Auxintransport sowie Gibberellinsignaltransduktion sind für die Bildung und Aufrechterhaltung des Apikalhakens notwendig. Während der Apikalhakenentwicklung ist ein gerichteter Auxintransport für die Ausbildung eines Auxinmaximums in der Innenseite des Hakens notwendig. Dieses geht mit einer Inhibierung der Zellelongation in diesem Gewebe einher, die eine Voraussetzung für die Bildung und Aufrechterhaltung des Apikalhakens darstellt (Achard et al., 2003; Vandenbussche et al., 2010; Zadnikova et al., 2010; Gallego-Bartolomé et al., 2011). Daraus ergab sich die Fragestellung, ob es sich bei der Rolle der GA-Signaltransduktion bzw. des Auxintransports für die Apikalhakenentwicklung um unabhängige oder gekoppelte Prozesse handelt. Um dies zu testen, untersuchte ich die Bildung des Auxinmaximums in der Innenseite des

Apikalhakens nach Inhibierung des Auxintransports bzw. der GA-Biosynthese. Dazu wurden *DR5:GUS*-Keimlinge auf NPA- oder PAC-haltigem Medium angezogen. Da PAC nicht nur die GA-Synthese sondern auch weitere Biosyntheseprozesse beeinträchtigt (Rademacher, 2000), wurde das Auxinsignalmaximum ebenfalls in der GA-Biosynthesemutante *ga1* analysiert (Abbildung 27A). Während 4 Tage alte Kontroll-

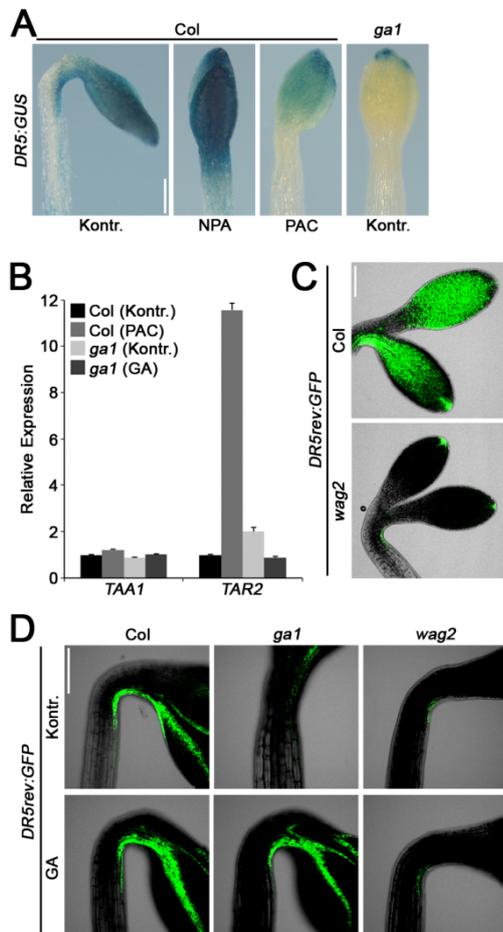


Abbildung 27: GA und WAG2 regulieren das Auxinsignalmaximum innerhalb des Apikalhakens.

(A) GUS-Färbung des Sprossapex von 4 Tage alten, etiolierten *DR5:GUS*-Keimlingen im Wildtyp (Col) und *ga1* nach Keimung auf 1 μ M NPA oder 1 μ M PAC (beides Col) oder den entsprechenden Lösungsmitteln (Kontr.).

(B) qRT-PCR von *TAA1* und *TAR2* aus 4 Tage alten, etiolierten Wildtyp- (Col) und *ga1*-Keimlingen nach Keimung auf 1 μ M PAC bzw. 1 μ M GA3. Behandlungen mit den entsprechenden Lösungsmitteln dienten als Kontrolle (Kontr.). *UBC21* diente als Referenzgen.

(C) Konfokale Aufnahme der Keimblätter von *DR5rev:GFP* in 4 Tage alten, etiolierten Wildtyp- (Col) und *wag2*-Keimlingen.

(D) Konfokale Aufnahme des Hypokotylhakens von *DR5rev:GFP* in 4 Tage alten, etiolierten Wildtyp- (Col), *ga1*- und *wag2*-Keimlingen nach Behandlung mit 0,1 μ M GA3. Behandlungen mit dem entsprechenden Lösungsmittel diente als Kontrolle (Kontr.).

Die Größenbalken entsprechen 200 μ m.

keimlinge ein deutliches GUS-Signal auf der Innenseite des ausgebildeten Hypokotylhakens zeigten, führte eine Behandlung mit NPA zu einer symmetrischen GUS-Färbung des apikalen Hypokotyls. Die chemisch oder genetisch hervorgerufene GA-Defizienz hatte zur Folge, dass sich kein Auxinmaximum innerhalb des apikalen Hypokotyls ausbildete. Weiter fiel ein stark reduziertes Auxinmaximum innerhalb der Keimblätter von *ga1* auf. Dieses war auf die Hydathoden (und in wenigen Keimlingen zusätzlich auf die umliegenden Zellen) beschränkt, während der unbehandelte Wildtyp ein in der Intensität zwar schwankendes, aber immer deutliches GUS-Signal innerhalb der gesamten Kotyledonen aufzeigte. Sowohl das symmetrische GUS-Signal (NPA-Behandlung) als auch das fehlende Auxinsignalmaximum (GA-Mangel) im apikalen Hypokotyl gingen mit einer stark beeinträchtigten Entwicklung des Apikalhakens einher. Diese Untersuchungen deuten darauf hin, dass die durch GA-Mangel gestörte

Apikalhakenentwicklung zumindest zum Teil durch eine Beeinträchtigung von Synthese, Signaltransduktion oder Transport von Auxin erfolgt.

Um zu testen, ob GA die Auxinbiosynthese reguliert, wurde die Expression von zwei Tryptophanaminotransferasen in etiolierten Keimlingen quantifiziert (Abbildung 27B). *TAA1* (*WE18*) und *TAR2* spielen eine wichtige Rolle bei der für die Apikalhakenentwicklung notwendigen Auxinbiosynthese (Stepanova et al., 2008; Vandenbussche et al., 2010). Chemisch oder genetisch hervorgerufene GA-Defizienz führte nicht zu einer reduzierten Expression der Tryptophanaminotransferasen, im Falle von *TAR2* aber zu einer Transkriptionsaktivierung. Somit liefert diese Untersuchung keinen Hinweis darauf, dass GA-Defizienz zur einer reduzierten Auxinbiosynthese führt. Diese Schlussfolgerung müsste aber aufgrund der Vielzahl an Auxinbiosynthesewegen durch eine direkte Messung des Auxingehalts bestätigt werden.

WAG2 ist in der Lage, die PIN-Auxintransporter zu phosphorylieren, und ist an der Regulierung von auxintransportabhängigen Prozessen beteiligt (Santner und Watson, 2006; Cheng et al., 2008; Dhonukshe et al., 2010). Außerdem ist das für die Bildung und Aufrechterhaltung des Apikalhakens notwendige asymmetrische Auxinmaximum auxintransportabhängig. Daraus ergibt sich die Fragestellung, ob *WAG2*, ebenso wie aktive Gibberellinsignaltransduktion, an der Ausbildung des Auxinmaximums innerhalb des Hypokotylhakens beteiligt ist. Um dies zu testen, wurde das sensitive Reporterogen *DR5rev:GFP* (Friml et al., 2003) in *wag2* eingekreuzt und mittels konfokaler Mikroskopie analysiert. Während die Kotyledonen des Wildtyps ein starkes GFP-Signal aufzeigten, war dieses in den *wag2*-Mutanten, ähnlich wie *DR5:GUS* in *ga1*, auf die Hydathoden beschränkt (Abbildung 27C). Auch die Ausbildung des asymmetrischen Auxinsignalsmaximums des Apikalhakens war in *wag2* stark beeinträchtigt. Im Gegensatz zu *ga1* führte hier eine GA-Behandlung nicht zu einer Normalisierung des GFP-Signals sowie des Apikalhakenphänotyps (Abbildung 27D). Diese Untersuchungen deuten darauf hin, dass die GA-Signaltransduktion an der Ausbildung des lateralen Auxinmaximums beteiligt ist und auf diese Weise die Aufrechterhaltung des Apikalhakens reguliert. Somit stellen die auxintransportabhängige und die GA-abhängige Apikalhakenentwicklung keine voneinander unabhängigen Prozesse dar, da beide das polare Auxinmaximum kontrollieren. Auch *WAG2* ist an der Ausbildung des Auxinmaximums beteiligt. Wie die fehlende Suppression nach GA-Gabe zeigt, ist *WAG2* dabei epistatisch zu GA.

Zusammenfassend konnte ich mit dieser Arbeit zum ersten Mal zeigen, dass Gibberellinsäure in *Arabidopsis* die Expression des AGC-Kinasegens *WAG2* stimuliert, und dass *WAG2* die Öffnung des Apikalhakens reprimiert. Dabei fördert *WAG2* die Ausbildung oder Aufrechterhaltung eines GA- und auxintransportabhängigen, lokalen Auxinmaximums, dessen Störung mit einer Beeinträchtigung der Apikalhakenentwicklung einhergeht.

4 Diskussion

4.1 Die Gibberellinsignaltransduktion

Gibberelline (GA) stimulieren eine Vielzahl von Wachstums- und Entwicklungsprozessen bei Samenpflanzen. Dabei spielen die negativen Regulatoren der GA-Signaltransduktion, die DELLA-Proteine, eine besondere Rolle. Während aktive DELLA-Repressoren GA-abhängige Prozesse blockieren, werden diese in Gegenwart von GA über E3-Ubiquitinligasen und das 26S-Proteasom abgebaut (Dill et al., 2001; Silverstone et al., 2001; Fu et al., 2002; McGinnis et al., 2003; Dill et al., 2004; Fu et al., 2004; Gomi et al., 2004; Strader et al., 2004; Hirano et al., 2010; Ariizumi et al., 2011). Die für die DELLA-Proteine charakteristische und namensgebende DELLA-Domäne ist notwendig für die Transduktion des GA-Signals. So wurden DELLA-Domänenmutationen aus verschiedenen Spezies beschrieben, welche zu einem GA-insensitiven Wachstum führen. Ein Beispiel sind Weizensorten, wie sie in großem Umfang seit den 1960er Jahren genutzt werden (Peng et al., 1999b). Diese besitzen ein stabilisierendes reduziertes Streckungswachstum und liefern einen größeren Ertrag. Hinsichtlich dieser agronomischen Bedeutung gab es großes Interesse, die molekulare Funktion der DELLA-Domäne zu entschlüsseln.

In meiner Arbeit konnte ich zeigen, dass die in den Weizen- und Maismutanten *Rht-B1b*, *Rht-D1b*, *D8-Mpl* sowie *D8-1* identifizierten DELLA-Domänenmutationen auch in Arabidopsis zu einem GA-insensitiven Wuchs führen. Die untersuchten transgenen Pflanzen waren zwergwüchsig, spätblühend, Chlorophyll akkumulierend und ähnelten phänotypisch sehr stark der Arabidopsis DELLA-Domänenmutante *gai-1* (Abbildung 10B und C). Durch die biochemische Charakterisierung dieser transgenen Linien konnte ich zudem zum ersten Mal zeigen, wie sich die jeweiligen Mutationen auf das Proteinverhalten der DELLA-Repressoren auswirken: Die mutanten Proteine waren vollständig insensitiv gegenüber dem GA-abhängigen Abbau (Abbildung 11B). Somit wirken sich die DELLA-Domänenmutationen in allen Fällen essentiell auf den Abbau der Repressoren aus.

Eine entscheidende Rolle spielt auch der GA-Rezeptor GID1 (Abbildung 12B). Dessen Funktion für den Abbau der DELLA-Proteine wurde in mehreren Studien detailliert untersucht: So konnte u.a. in unserer Arbeitsgruppe durch Soumya Ghosh gezeigt werden, dass DELLA-Proteine und GID1A im Yeast-two-hybrid-System nur in Gegenwart von GA miteinander interagieren (Ueguchi-Tanaka et al., 2005; Griffiths et al., 2006; Nakajima et al., 2006; Willige et al., 2007). Dass eine solche Interaktion auch *in planta* stattfindet, konnte ich durch mein CoIP-Experiment bestätigen (Abbildung 12C).

Außerdem konnte Soumya Ghosh im Yeast-two-hybrid-System für die GAI-Varianten, die eine Insensitivität gegenüber dem GA-abhängigen Abbau zeigten (*gai*, *Rht-1b*, *D8-1* und *D8-Mpl*), eine Störung dieser Interaktion nachweisen. Diese *gai*-Varianten waren auch in der Gegenwart von GA nicht in der Lage mit *GID1A* zu interagieren.

Im Gegensatz zu den Mutationen aus Mais und Weizen führte die in der Gerstenmutante *Sln1D* identifizierte Punktmutation in den *GAI:Sln1D*-Linien nur zu einem leicht reduzierten Streckungswachstum und einem geringfügig verzögerten Blühzeitpunkt. Ebenso war ein verzögerter aber nicht aufgehobener GA-abhängiger Abbau dieser *GAI*-Variante erkennbar. Diese Hyposensitivität gegenüber GA weist auch das *Sln1D*-Protein in Gerste auf (Gubler et al., 2002). Dass sich die Punktmutation in der Gerstenmutante und den *GAI:Sln1D*-Linien auf das DELLA-Proteinverhalten in gleicher Weise auswirkt, spricht dafür, dass Struktur und Funktionsweise der DELLA-Domäne stark konserviert sind und somit deren Analyse in einem heterologen Pflanzensystem seine Berechtigung hat. Eine Yeast-two-hybrid-Untersuchung lieferte eine Erklärung für die Hyposensitivität von *Sln1D* gegenüber dem GA-abhängigen Abbau. So konnte Soumya Ghosh zeigen, dass dieses Protein im Gegensatz zum wildtypischen DELLA-Repressor nur schwach mit *GID1A* interagiert (Willige et al., 2007). Soumya Ghoshs Untersuchungen und meine Experimente zeigen zusammengenommen, dass die Stärke der Interaktion zwischen der *GAI*-Variante und dem GA-Rezeptor *GID1A* und die Sensitivität des DELLA-Proteins gegenüber dem GA-abhängigen Abbau korrelieren. Außerdem zeigen sie, dass die DELLA-Domäne essentiell für die GA-abhängige Interaktion zwischen DELLA-Protein und GA-Rezeptor ist. Kann diese Interaktion nicht stattfinden, bleibt der Abbau der DELLA-Proteine aus und somit ist die GA-Signaltransduktion blockiert (Abbildung 28). Dies äußert sich z.B. im Zwergwuchs von *gid1abc* oder *gai-1*.

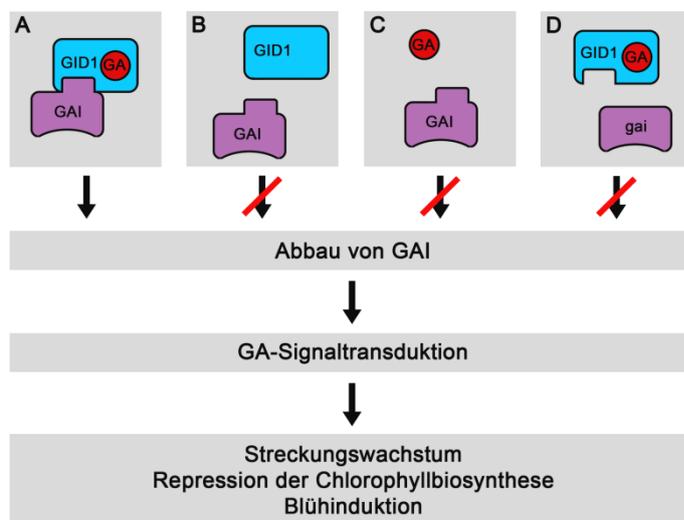


Abbildung 28: Die Interaktion zwischen den DELLA-Proteinen und GID1 ist Voraussetzung für den Ablauf der GA-Signaltransduktion (exemplarisch anhand von GAI dargestellt).

(A) Das wildtypische GAI-Protein interagiert in Gegenwart von GA mit GID1. Dies führt zum Abbau des Proteins. Damit ist die Blockade der GA-Signaltransduktion aufgehoben und GA-abhängige Wachstumsprozesse werden vollzogen.

(B) bis (D) Ist die Synthese von GA unterbunden **(B)**, der GA-Rezeptor

inaktiv **(C)** oder fehlt die DELLA-Domäne von GAI **(D)**, wird das DELLA-Protein nicht abgebaut und blockiert somit die GA-Signaltransduktion. Dies äußert sich in einem reduzierten Streckungswachstum, einer Akkumulation von Chlorophyll und einem Ausbleiben bzw. einer Verzögerung der Blütenbildung.

Unsere Ergebnisse wurden später durch die Kristallstruktur des GID1A-GA-DELLA-Komplexes bestätigt (Murase et al., 2008). Hier konnte gezeigt werden, dass in Gegenwart von GA die DELLA- sowie die VHYNP-Domäne der DELLA-Repressoren direkt mit dem GA-Rezeptor interagieren. Dass diese Interaktion eine Voraussetzung für den Abbau der DELLA-Proteine ist, konnte ebenso bestätigt werden, da erst die Bildung dieses GA-GID1-DELLA-Komplexes eine effiziente Rekrutierung der E3-Ubiquitinligase SCF^{SLY1} (bzw. SCF^{GID2} in Reis) ermöglicht (Griffiths et al., 2006; Hirano et al., 2010). Dies führt zur Ubiquitinierung und dem anschließenden Abbau der DELLA-Proteine durch das 26S-Proteasom (Abbildung 29). Anhand der erwähnten Kristallstruktur des GID1A-GA-DELLA-Komplexes kann auch die Funktion des in Sl1D vorliegenden Aminosäure-

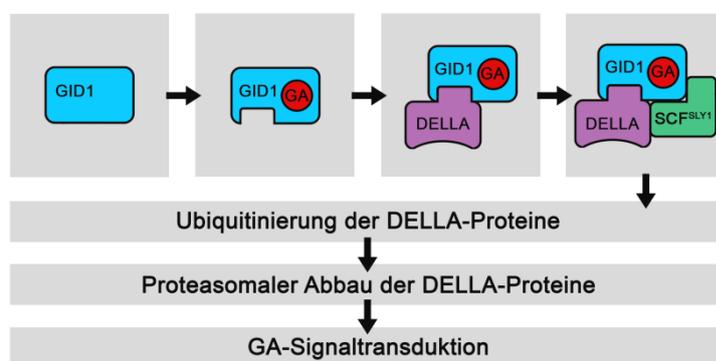


Abbildung 29: Mechanismus des DELLA-Proteinabbaus.

Bindet der Rezeptor GID1 GA, so ist dieser in der Lage, mit den DELLA-Proteinen zu interagieren. Dies führt zu einer effizienten Rekrutierung der E3-Ubiquitinligase mit dem F-box-Protein SLY1. Damit induziert dieser Komplex die Ubiquitinierung und den Abbau der DELLA-Proteine, sodass die

Repression des GA-Signalwegs aufgehoben wird. Wie in Abbildung 28 dargestellt, sind somit GA, GID1 und die DELLA-Domäne für den Abbau der DELLA-Repressoren und die Derepression der GA-Signaltransduktion notwendig.

austauschs erklärt werden. Im wildtypischen Protein liegt in dieser Position ein hochkonservierter Glycinrest vor. Während die angrenzenden Aminosäurereste direkt an der Interaktion mit GID1A beteiligt sind, interagiert der in einer Schleife lokalisierte Glycinrest selbst nicht. In Sl1D ist der kleine, ungeladene Glycinrest durch einen größeren, negativ geladenen Glutaminsäurerest ausgetauscht. Größe und Ladung könnten die Flexibilität der umliegenden Aminosäurereste in der Schleife, die direkt mit GID1A interagieren, stören und somit die Interaktion zwischen DELLA-Domäne und GA-Rezeptor beeinträchtigen.

Neben der Funktion der DELLA-Domäne sollte mit dieser Arbeit die fehlende Korrelation zwischen dem Ausmaß der DELLA-Domänenmutationen und dem Phänotyp der entsprechenden Getreidemutanten untersucht werden. *Rht-B1b* und *Rht-D1b* sowie *D8-Mpl* zeigen im Gegensatz zu *D8-1* nur einen schwachen Zwergwuchs. Während die DELLA-Domäne in den leicht zwergwüchsigen Getreidemutanten komplett fehlt, liegt im DELLA-Protein D8-1 nur eine vier Aminosäurereste umfassende Deletion vor (Harberd und Freeling, 1989; Peng et al., 1999b). Die Ursache für die fehlende Korrelation könnte entweder in einem unterschiedlichen biochemischen Proteinverhalten oder in den

verschiedenen genetischen Hintergründen der Mutationen zu finden sein. Meine Untersuchungen zeigen, dass in einem einheitlichen genetischen und biochemischen Hintergrund alle vier Deletionen denselben Phänotyp hervorbringen und eine komplette Insensitivität der DELLA-Proteine gegenüber dem GA-abhängigen Abbau erzeugen. Letztendlich müsste aber für einen Beweis das Abbauverhalten der DELLA-Proteine in der jeweiligen Getreidespezies untersucht werden. Mit der hier beschriebenen Herangehensweise, also der Untersuchung in einem heterologen Pflanzensystem, kann die fehlende Korrelation zwischen dem Ausmaß der DELLA-Mutation und der Stärke des Zwergwuchses jedenfalls nicht durch ein unterschiedliches Abbauverhalten und eine unterschiedliche Repressoraktivität der DELLA-Proteine erklärt werden. Dafür spricht auch eine neuere Studie, in der die kodierende Sequenz der DELLA-Allele *D8-1* und *D8-Mpl* aus Mais in transgenen Arabidopsis-Pflanzen exprimiert wurden (Lawit et al., 2010). Diese zeigten keinen signifikanten Unterschied in der Beeinträchtigung der Wachstumshöhe im Vergleich mit den Kontrollpflanzen.

Die Allele *D8-1* und *D8-Mpl* sind spontane Mutationen unterschiedlicher Herkunft (Harberd und Freeling, 1989). Somit ist die Ursache der voneinander abweichenden Phänotypen vermutlich in den unterschiedlichen genetischen Hintergründen dieser Mutationen zu suchen. So ist es möglich, dass in *D8-Mpl* eine extragenetische Suppressormutation vorliegt, die den schwachen Mutantenphänotyp erklären könnte (Abbildung 30). Die DELLA-Proteine führen ihre Aktivität über die Bindung und

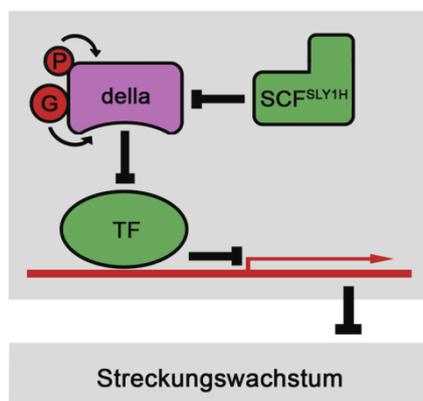


Abbildung 30: Mögliche Suppressoren einer DELLA-Domänenmutation.

Positive Regulatoren des GA-Signaltransduktionsweges könnten durch eine Funktionsgewinnmutation (grün) und negative Regulatoren durch einen Funktionsverlust (rot) die Beeinträchtigung des GA-Signalweges abschwächen (P: Phosphatrest, G: N-Acetylglucosaminrest, TF: Transkriptionsfaktor, SLY1H: zu SLY1 homologes F-box-Protein).

Inaktivierung von Transkriptionsregulatoren, wie z.B. den PHYTOCHROME INTERACTING FACTORS (PIFs), aus (de Lucas et al., 2008; Feng et al., 2008; Schwechheimer und Willige, 2009). Somit würde eine Mutation, die einen (das Streckungswachstum stimulierenden) Transkriptionsregulator betrifft und dessen Interaktion mit dem DELLA-Protein beeinträchtigt, zu einem Funktionsgewinn dieses Regulators führen. Außerdem gibt es Hinweise, dass die DELLA-Repressoraktivität durch die Bindung von N-Acetylglucosamin- und Phosphatresten verstärkt wird (Sasaki et al., 2003; Shimada et al., 2006; Silverstone et al., 2007; Dai und Xue, 2010). In *D8-Mpl* könnte ein

Aktivitätsverlust eines der Enzyme, die diese posttranslationalen Modifizierungen katalysieren, vorliegen. Dies würde die repressorische Wirkung des DELLA-Proteins reduzieren. So führt in Arabidopsis der Funktionsverlust der N-Acetylglucosamin-Transferase SPINDLY (SPY) zu einer partiellen Suppression von *gai-1* (Wilson und Somerville, 1995). Des Weiteren könnte durch eine Funktionsgewinnmutation das F-box-Protein modifiziert sein, das den Abbau der DELLA-Proteine einleitet (SLY1 in Arabidopsis bzw. GID2 in Reis). Auch ein solcher Suppressor von *gai-1* ist in Arabidopsis bekannt (Wilson und Somerville, 1995; Peng et al., 1999a; Dill et al., 2004; Fu et al., 2004). Außerdem kommen als extragenetische Suppressoren Gene in Frage, die zum einen das Streckungswachstum inhibieren, und zum anderen durch die DELLA-Proteine aktiviert werden. So hat in unserem Labor René Richter zwei GATA-Transkriptionsfaktoren als wichtige negative Regulatoren der GA-Signaltransduktion in Arabidopsis identifiziert. Deren Funktionsverlust führt zu einer Suppression einer chemisch oder genetisch herbeigeführten Beeinträchtigung der GA-Signaltransduktion (Richter et al., 2010).

Des Weiteren muss berücksichtigt werden, dass die 330 bp umfassende Deletion in *D8-Mpl* nicht nur die kodierende Sequenz, sondern auch die 5´-untranslatierte Region betrifft (Peng et al., 1999b). Diese Deletion umfasst 315 bp der kodierenden Sequenz und 15 bp der 5´-UTR. Somit kann nicht ausgeschlossen werden, dass die posttranskriptionelle DELLA-Proteinexpression in *D8-Mpl* im Vergleich mit *D8-1* durch eine verringerte Transkriptstabilität oder Translationseffizienz reduziert ist, und dies für den schwächeren Phänotyp verantwortlich ist. Die Ursache für die schwachen Phänotypen von *Rht-B1b* und *Rht-D1b* könnte in den oben beschriebenen extragenetischen Funktionsgewinnmutationen oder in der Hexaploidie des Weizengenom zu finden sein (Funktionsverlustmutationen sind wegen der erhöhten Redundanz durch die drei Chromosomensätze als Ursache unwahrscheinlich). Aufgrund des hexaploiden Genoms und der damit verbundenen hohen Anzahl an paralogen Genen könnten Transkriptionsregulatoren, welche zum einen das Streckungswachstum fördern und zum anderen durch die DELLA-Proteine inaktiviert werden, stark abundant sein. Dieser Proteinüberschuss könnte verhindern, dass die DELLA-Repressoren diese Regulatoren vollständig austitrieren und so inaktivieren. Solch ein Mechanismus kann auch in Arabidopsis beobachtet werden. Hier supprimiert die Überexpression von *PIF4* das beeinträchtigte Hypokotylwachstum von *35S:gai*-Keimlingen (de Lucas et al., 2008).

Somit existieren mehrere Erklärungen für die unterschiedlich stark ausgeprägten Phänotypen der DELLA-Domänenmutanten, obwohl in allen Fällen die DELLA-Proteine im gleichen Maße insensitiv gegenüber dem GA-abhängigen Abbau sind. Neben dieser Insensitivität des DELLA-Proteins kommt für die Weizenmutanten (*Rht-B1b* und *Rht-D1b*) aufgrund der Art der Mutationen noch ein weiteres Erklärungsmodell für den Zwergwuchs in Frage (Peng et al., 1999b). Hier könnte es anstatt zu einer Translation des C-

terminalen, GA-insensitiven Proteinprodukts, also des DELLA-Proteins ohne DELLA-Domäne, so wie es in dieser Arbeit untersucht wurde, auch zu der Synthese eines kurzen N-terminalen, Proteinprodukts kommen, welches die DELLA-Domäne beinhaltet (Abbildung 31). Dieses könnte mit dem GA-Rezeptor interagieren und so die Bindestelle für die DELLA-Repressoren blockieren. Damit würde die Interaktion zwischen GID1 und den wildtypischen DELLA-Proteinen, kodiert durch die DELLA-Proteinloci der anderen beiden Chromosomensätze des hexaploiden Genoms, verhindert werden. Damit bliebe die Inaktivierung der DELLA-Repressoren aus. Eine Untersuchung in Weizen mittels anti-Rht-Antikörper würde klären, welches der Proteinprodukte in *Rht-B1b* und *Rht-D1b* synthetisiert wird.

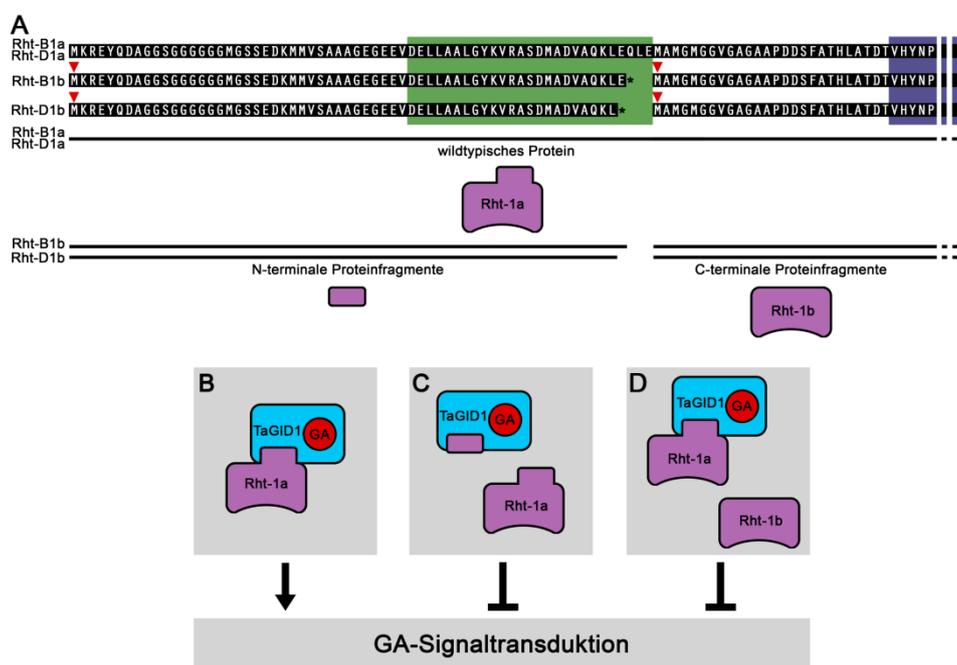


Abbildung 31: Die möglichen Funktionsweisen der Allele *Rht-B1b* und *Rht-D1b* aus Weizen.

(A) Dargestellt sind die N-terminalen Aminosäuresequenzen der wildtypischen Proteine Rht-B1a und Rht-D1a sowie von Rht-B1b und Rht-D1b. Die DELLA-Domäne ist grün und das VHYNP-Sequenzmotiv blau unterlegt. Die roten Pfeilspitzen markieren die möglichen Startpunkte der Translation. Unter den Sequenzen sind die jeweiligen Proteine schematisch abgebildet.

(B) Das wildtypische Protein bindet in Gegenwart von GA an TaGID1 und wird daraufhin abgebaut, womit die Repression des GA-Signalwegs aufgehoben wird.

(C) Für den Fall, dass das N-terminale Proteinfragment synthetisiert wird, könnte dieses in Gegenwart von GA TaGID1 austitrieren, womit der Proteinabbau der wildtypischen DELLA-Repressoren unterbunden und die GA-Signaltransduktion blockiert wäre.

(D) Würde das C-terminale Fragment gebildet werden, wäre dieses aufgrund der fehlenden Interaktion mit TaGID1 stabilisiert, während die wildtypischen DELLA-Proteine in Abhängigkeit von GA abgebaut werden. Wie in dieser Arbeit gezeigt, führt das C-terminale Proteinprodukt zu einem GA-insensitiven Wachstum.

Neben der Untersuchung der beiden oben erörterten Fragestellungen führte diese Arbeit zu interessanten Beobachtungen bezüglich der unterschiedlichen Regulierung der DELLA-Proteine. Zum Beispiel zeigt die biochemische Charakterisierung von *gid1abc*, dass der GA-abhängige Abbau der DELLA-Proteine in dieser Mutante ausbleibt (Abbildung 12B). Bemerkenswert ist, dass in *gid1abc* nur erhöhte Mengen an RGA, aber nicht an GAI nachweisbar waren (Abbildung 12A). Die Akkumulierung dieser beiden Repressorproteine scheint also zumindest über unterschiedliche Mechanismen reguliert zu sein. So könnte die Proteinabundanz von GAI und RGA über voneinander abweichende transkriptionelle und translationale Kontrollmechanismen gesteuert sein (Abbildung 32). Dafür sprechen in unserer Arbeitsgruppe durchgeführte Untersuchungen. So konnte René Richter zeigen, dass eine vierstündige GA-Behandlung von Col-0 zu einer erneuten Akkumulierung von GAI, nicht aber von RGA führt. Interessanterweise erzeugt dieselbe Behandlung eine stärkere Zunahme an *RGA*- als an *GAI*-Transkript (Richter et al., 2010). Dies spricht für eine unterschiedliche transkriptionelle und posttranskriptionelle Regulierungen der DELLA-Proteine.

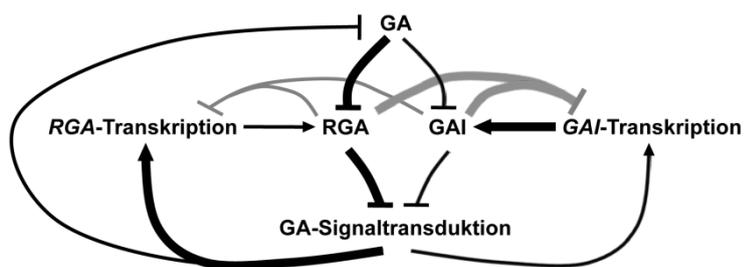


Abbildung 32: Modell zur Regulierung der DELLA-Proteine RGA und GAI.

GA stimuliert den Abbau von RGA und GAI. Der Abbau von RGA erfolgt dabei schneller (Abbildung 12B). Aus der Inaktivierung der DELLA-Proteine erfolgt die Derepression der GA-Signaltransduktion, welche

durch RGA stärker inhibiert wird (Dill und Sun, 2001; King et al., 2001). GA reprimiert durch einen negativen Rückkopplungsmechanismus die eigene Biosynthese. Gleichfalls wird die Expression der DELLA-Proteine hochreguliert. Dabei wird die Transkription von *RGA* stärker induziert. Im selben Zeitraum akkumuliert allerdings das *GAI*-Protein und nicht *RGA*. Die Repression der GA-Signaltransduktion führt zur Hemmung der *RGA*- und *GAI*-Transkription (in grau dargestellt). Dieser Mechanismus könnte sich stärker auf *GAI* auswirken, was die DELLA-Proteinabundanz in *gid1*-Tripelmutanten erklären könnte.

Des Weiteren scheinen sich die DELLA-Repressoren wechselseitig zu regulieren. So konnte ich zeigen, dass die Stabilisierung von *GAI* zu einer stark reduzierten *RGA*-Proteinmenge führt (Abbildung 11B). Dabei handelt es sich wahrscheinlich um einen Mechanismus, um die Wachstumsrepression durch die DELLA-Proteine zu unterdrücken. Da ein Block der GA-Signaltransduktion zu einer transkriptionellen Aktivierung von GA-Biosynthesegenen und zu einem Anstieg an aktiven Gibberellinen führt (Fujioka et al., 1988; Talon et al., 1990; Chandler et al., 2002; Zentella et al., 2007), könnte dies den verstärkten *RGA*-Abbau bewirken. Dafür spricht, dass PAC-Behandlung in hierfür exemplarisch untersuchten *GAI:Rht-1b*-Linien wiederum eine starke *RGA*-Akkumulierung

hervorrufen (Abbildung 11C). Des Weiteren könnte die Wechselwirkung der DELLA-Proteine über eine transkriptionelle Kontrolle erfolgen. So konnte René Richter ebenfalls zeigen, dass die Beeinträchtigung der GA-Signaltransduktion zu einer reduzierten Transkription der DELLA-Gene führt (Richter et al., 2010). Dieser Rückkopplungsmechanismus könnte sich in *gid1abc* stärker auf *GAI* als auf *RGA* auswirken, was in dieser Mutante eine stärkere *GAI*-Akkumulierung unterbinden könnte.

Neben der Bedeutung von *GID1* für den Abbau der DELLA-Proteine zeigte meine biochemische Charakterisierung der *gid1*-Mutanten, dass in den *gid1*-Einzel- sowie Doppelmutanten im Vergleich mit Col-0 keine DELLA-Proteinakkumulierung vorliegt (Abbildung 12A). Dies konnte, wie oben beschrieben, nur in *gid1abc* beobachtet werden. Nichtsdestotrotz wurde u.a. in unserer Arbeitsgruppe durch Claus Schwechheimer und Carola Nill gezeigt, dass die *gid1*-Doppelmutanten Phänotypen besitzen, die auf eine beeinträchtigte GA-Signaltransduktion hinweisen (Griffiths et al., 2006; Iuchi et al., 2007; Willige et al., 2007). Dies kann dadurch erklärt werden, dass die DELLA-Proteine nicht nur über ihren Abbau inaktiviert werden. So wurde gezeigt, dass die DELLA-Repressoren allein durch die Bindung an *GID1* austitriert und so proteolyseunabhängig inaktiviert werden (Ariizumi et al., 2008; Ueguchi-Tanaka et al., 2008). Auch könnte die Aktivität der DELLA-Proteine in den *gid1*-Mutanten durch posttranslationale Modifikationen reduziert sein. Wie oben beschrieben, gibt es Hinweise, dass die DELLA-Proteine durch die Bindung von N-Acetylglucosamin- und Phosphatresten in ihrer Aktivität gefördert werden (Sasaki et al., 2003; Shimada et al., 2006; Silverstone et al., 2007; Dai und Xue, 2010). Inwieweit diese Modifizierungen die Repressoreigenschaften der DELLA-Proteine auf molekularer Ebene regulieren, werden zukünftige Untersuchungen zeigen. So ist vorstellbar, dass die Phosphorylierung die Interaktion zwischen den DELLA-Proteinen und *GID1* oder *SLY1/GID2* stört. Eine andere Möglichkeit wäre, dass beide posttranslationalen Modifizierungen die Bindung zwischen den DELLA-Repressoren und Transkriptionsregulatoren (wie den PIFs) fördern und somit die Aktivität Letzterer zusätzlich beeinträchtigen. Dies zeigt, dass diese Arbeit nicht nur Einblicke in die Regulierung der GA-Signaltransduktion liefert, sondern gleichfalls viele neue interessante Fragestellungen zur Funktionsweise der DELLA-Proteine eröffnet.

4.2 Der *Crosstalk* zwischen der Gibberellinsignaltransduktion und dem Auxintransport

4.2.1 Die GA-abhängige Regulierung des Auxintransports und der PIN-Abundanz

Physiologische Untersuchungen diverser Samenpflanzenspezies liefern Hinweise, dass ein Zusammenhang zwischen der GA-Signaltransduktion und dem Auxintransport besteht. So konnte beobachtet werden, dass GA-Gabe den Auxintransport im Sprossgewebe stimuliert (Jacobs und Case, 1965; Björklund et al., 2007), während GA-Defizienz das Gegenteil bewirkt (Mauriat et al., 2011). Untersuchungen in *Arabidopsis thaliana* waren bislang weitgehend ausgeblieben, obgleich hier die Fülle an molekularen Techniken und Mutanten die Entschlüsselung des *Crosstalks* erleichtern würde. Die auffällige Korrelation zwischen reduzierter Apikaldominanz, ein auxintransportreguliertes Entwicklungsmerkmal (Thimann und Skoog, 1933; Snyder, 1949; Jacobs und Case, 1965), und beeinträchtigter GA-Biosynthese bzw. –Signaltransduktion (Koornneef et al., 1985; Silverstone et al., 1997; Dill et al., 2004) liefert aber einen Hinweis, dass auch in *Arabidopsis* ein solcher *Crosstalk* existiert.

In dieser Arbeit wurde der Auxintransport in drei unterschiedlichen GA-Biosynthese- und GA-Signaltransduktionsmutanten gemessen (Abbildung 13). Damit konnte ich zum ersten Mal zeigen, dass im Vergleich mit dem entsprechenden Wildtyp, alle drei Mutanten einen beeinträchtigten Auxintransport im Sprossgewebe vorweisen. Um den Zusammenhang zwischen GA und dem reduzierten Auxintransport auf molekularer Ebene zu untersuchen, analysierte ich mittels zellbiologischer sowie biochemischer Ansätze diverse Auxintransportproteine. Dies stellt speziesübergreifend die erste GA-abhängige Studie dieser Proteine dar, da sich vorhergehende Untersuchungen allein auf Transkriptionsdaten beschränkten. Aus meiner Analyse ergab sich, dass GA-Mangel in verschiedenen Geweben zu einer Reduzierung der PIN-Abundanz führt (Abbildung 14 und Abbildung 16). Eine Veränderung der für die einzelnen PIN-Proteine charakteristischen Polarität konnte in diesem Zusammenhang nicht beobachtet werden. Daraus lässt sich ableiten, dass GA in den untersuchten Geweben nicht die Richtung des Auxintransports reguliert, sondern die Stärke des Auxinflusses über die Kontrolle der PIN-Abundanz steuert. So führt GA-Defizienz zu einer Reduzierung der Proteinmengen von PIN1, PIN2 und PIN3 in der Wurzelspitze. Um den dieser Regulierung zugrunde liegenden Mechanismus aufzudecken, wurde zuerst die Transkription dieser *PINs* untersucht (Abbildung 17). Dabei konnte in der Wurzelspitze kein Einfluss von GA auf die Expression von *PIN2* und *PIN3* nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu führte GA-Mangel zu einer Steigerung der *PIN1*-Expression. Dieser Anstieg konnte durch GA-Gabe aufgehoben werden. Somit

werden die PIN1-Proteinabundanz und die *PIN1*-Transkription auf unterschiedliche Weise durch GA reguliert. Dies zeigt, dass sich die verringerte PIN1-Proteinabundanz nicht durch eine Transkriptionsregulierung erklären lässt. Der Anstieg der *PIN1*-Expression deutet auf einen Rückkopplungsmechanismus hin, der dazu dient, den Mangel an Auxintransporter zu kompensieren. Für die Existenz solcher Mechanismen sprechen Untersuchungen von *pin*-Mutanten (Vietsen et al., 2005). So konnte gezeigt werden, dass der Verlust einer *PIN*-Genfunktion zur verstärkten transkriptionellen Aktivierung eines anderen *PIN*-Gens führt. Zusammengefasst liefert die Expressionsanalyse keinen Hinweis darauf, dass die durch GA-Defizienz entstehende Reduzierung der PIN-Proteinmengen einer Repression der *PIN*-Expression zugrunde liegt. Somit scheinen Gibberelline keine wichtigen Positivregulatoren der *PIN*-Transkription in der Wurzelspitze darzustellen.

Damit unterscheiden sich diese Untersuchungen von einer anderen Studie in Arabidopsis (Moubayidin et al., 2010). Dort wird ein Modell vorgestellt, in dem GA indirekt die Expression von *SHY2* reprimiert. *SHY2* ist ein Aux/IAA-Transkriptionsfaktor, der eine transkriptionelle Repression von *PIN1*, *PIN3* und *PIN7* in der Übergangzone des Wurzelmeristems bewirkt. Somit wäre GA ein Positivregulator der *PIN*-Transkription. Das in dieser Studie gezeigte Modell wird aber nicht durch Daten unterstützt, die eine GA-abhängige *PIN*-Transkription bzw. PIN-Proteinabundanz aufzeigen. Aufgrund voneinander abweichender experimenteller Ansätze könnten beide Untersuchungen trotz unterschiedlicher Befunde miteinander im Einklang stehen, da in der erwähnten Studie jüngere Keimlinge, eine kürzere PAC-Behandlungsdauer sowie keine GA-Biosynthesemutanten verwendet wurden.

Die Ergebnisse meiner Arbeit sprechen dafür, dass in Arabidopsis eine GA-abhängige posttranslationale Regulierung der PIN-Abundanz existiert. So führt ConA-Behandlung, wie auch eine WM-Gabe, in *ga1* zu einer stärkeren PIN2-Akkumulierung als im Wildtyp. Dieser Effekt ist durch GA-Gabe reversibel, was darauf hindeutet, dass dieser Mechanismus durch GA gesteuert wird (Abbildung 18). In unserem Labor durchgeführte zellbiologische Untersuchungen unterstützten diese Beobachtungen. So konnte Erika Isono nach ConA-Gabe beobachten, dass in *ga1* mehr Zellen PIN2:GFP in der Vakuole akkumulieren als in Col-0 (Willige et al., 2011). Zusammenfassend deuten diese Experimente darauf hin, dass die reduzierten Proteinmengen von PIN2 bzw. PIN2:GFP in *ga1* aufgrund eines zum Wildtyp gesteigerten PIN-Transports in die Vakuole zustande kommen. Somit ist es wahrscheinlich, dass GA einen Regulator des intrazellulären PIN-Transports steuert (Abbildung 33). Dieser könnte mit dem Retromerkomplex interagieren, der am intrazellulären Proteintransport beteiligt ist. Der Verlust jeweils eines von zwei (putativen) Komponenten dieses Komplexes, *SNX1* und *VPS29*, führt zu einer Reduzierung der PIN2-Abundanz in der Zellmembran und verstärkt vermutlich den

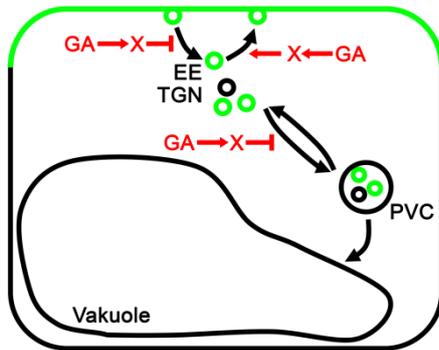


Abbildung 33: Mögliche Mechanismen der GA-abhängigen PIN2-Abundanzregulierung.

Schema der intrazellulären Lokalisierung von PIN2 (grün) in einer Epidermiszelle. GA könnte die Expression eines noch nicht identifizierten Regulators des intrazellulären Proteintransports (X) induzieren. Dieser könnte entweder die PIN2-Endozytose oder den PIN2-Transport aus den frühen Endosomen (EE) zu den prä-vakuolären Kompartimenten (PVC) inhibieren. Eine weitere Möglichkeit wäre die Förderung des PIN2-Transports zur Zellmembran. So könnte z.B. neu synthetisiertes PIN2 aus dem trans-Golgi-Netzwerk (TGN) dem vakuolären Abbau entzogen werden. Außerdem könnte GA einen Regulator reprimieren, welcher den Transport von PIN2 in die Vakuole fördert. In diesem Fall verkehren sich die in der Abbildung rot dargestellten Regulationsmechanismen ins Gegenteil.

Abbau des Proteins in der Vakuole (Jaillais et al., 2007; Kleine-Vehn et al., 2008). Außerdem sind Regulatoren von PIN-Proteinen bekannt, deren Funktionsverlust ähnlich wie eine reduzierte GA-Signaltransduktion die Apikaldominanz mindern. Dazu gehört zum einen BIG, das die PIN-Endozytose steuert, und zum anderen die RING DOMAIN LIGASE 1 und 2, die an der Ausbildung von über Lys63 verknüpfte Ubiquitinketten beteiligt sind und deren Funktionsverlust die PIN-Abundanz reprimiert (Gil et al., 2001; Paciorek et al., 2005; Yin et al., 2007). Außerdem wurde ein Modell vorgeschlagen, in dem die Aktivität der AGCVIII-Kinase WAG2 erst eine Depolarisierung der PINs und anschließend deren Abbau einleitet (Sorefan et al., 2009). Damit wäre WAG2 ein Negativregulator der PIN-Abundanz. Dieses Modell wird aber zum einen durch wenige Daten gestützt, zum anderen konnte ich zeigen, dass die Expression von WAG2 durch GA gefördert und nicht reprimiert wird (Abbildung 21 und Abbildung 24). Außerdem konnte ich in der Wurzelspitze keine GA-abhängige Regulierung der PIN-Polarität feststellen. Diese Beobachtungen sprechen dagegen, dass die Kontrolle der PIN-Abundanz durch GA auf diesem vorgeschlagenen WAG2-abhängigen Mechanismus basiert.

Des Weiteren ergibt sich die Frage, ob der Mechanismus der GA-abhängigen Regulierung von PIN2 auch auf PIN1 und PIN3 übertragbar ist. So ist zumindest bekannt, dass PIN1 wie PIN2 in WM-sensitive PVCs transportiert wird. Außerdem wurde gezeigt, dass beide Proteine in der Vakuole abgebaut werden, und dass die Abundanz beider PINs in der Zellmembran von VPS29, der oben erwähnten Komponente des Retromerkomplexes, abhängt (Jaillais et al., 2007; Kleine-Vehn et al., 2008; Laxmi et al., 2008). Diese drei Faktoren sprechen dafür, dass PIN1 und PIN2 zumindest zum Teil über dieselben Transportwege abgebaut werden. Somit könnte ein GA-regulierter Faktor, der die PIN2-Abundanz posttranslational kontrolliert, ebenfalls den intrazellulären Transport von PIN1 in die Vakuole steuern.

Die Beteiligung von GA an auxintransportabhängigen Prozessen spricht dafür, dass die GA-abhängige Regulierung der PINs für die Entwicklung und das Wachstum von

Arabidopsis von Bedeutung ist (Abbildung 19 und Abbildung 20). Die beobachtete Beeinträchtigung der Embryogenese und des Wurzelgravitropismus stellen zwei bisher nicht beschriebene Merkmale des *ga1*-Phänotyps dar. Für beide Prozesse ist ein PIN-abhängiger gerichteter Auxintransport essentiell. So führt ein Verlust der PIN-Funktionen zu Defekten während der Keimblattentwicklung. So zeigten ca. 13% der *pin1*-Keimlinge eine gestörte Kotyledonenentwicklung. Die relativ geringe Penetranz des Phänotyps lässt sich mit der funktionellen Redundanz der PINs erklären (Viets et al., 2005). Die Notwendigkeit von GA für die Entwicklung der Keimblätter zeigte sich zum einen darin, dass im Vergleich zum Wildtyp 7,5 Mal so viele *ga1*-Keimlinge die untersuchten Defekte aufwiesen. Zum anderen war der Anteil der Keimlinge mit Kotyledonendefekten in der *ga1 pin1*-Doppelmutante größer als die Summe der Anteile in beiden Einzelmutanten. In diesem Zusammenhang ist erwähnenswert, dass ein Einfluss von GA auf die Keimblattentwicklung bereits beobachtet wurde (Singh et al., 2010). In dieser Studie wurde ein Transgen, welches für eine GA-katabolisierende GA2-Oxidase kodiert, in Arabidopsisembryonen exprimiert. Dies führte bei einem Teil der Keimlinge zur Ausbildung von überzähligen Kotyledonen, was aber nicht im Zusammenhang mit einem veränderten Auxintransport diskutiert wurde. Meine physiologischen, biochemischen und zellbiologischen Analysen zeigen, dass der Auxintransport sowie die Abundanz der PIN-Proteine in unterschiedlichen Geweben GA-abhängig ist. Daraus ergibt sich, dass ein GA-Mangel auch während der Embryogenese die PIN-Abundanz und somit den Auxintransport beeinflussen könnte. Ob dies die in beiden Untersuchungen beobachteten Embryogenesedefekte erklären kann, müsste durch eine Quantifizierung der PIN-Proteine in GA-defizienten Embryonen (oder in Embryonen von GA-Signaltransduktionsmutanten) gezeigt werden.

Der Wurzelgravitropismus ist stark von den Auxintransportern AUX1 und PIN2 (Bennett et al., 1996; Müller et al., 1998) abhängig. Dagegen ist GA nicht notwendig für eine Anpassung des Wachstums an eine Änderung des Gravitationsvektors. Jedoch konnte ich zeigen, dass ein Mangel an GA zu einer verzögerten Bildung eines lateralen Auxinmaximums in der Wurzelspitze führt. Gleichmaßen konnte eine Verzögerung der Wachstumsantwort auf diesen Stimulus beobachtet werden. Da GA-Mangel eine Reduzierung von PIN2-Protein in der Wurzelspitze hervorruft, ist es wahrscheinlich, dass diese verzögerte Antwort durch einen geringeren PIN2-abhängigen Auxinefflux verursacht wird, während gleichzeitig AUX1 in der Epidermis nicht GA-reguliert zu sein scheint.

Zusammenfassend konnte ich mit dieser Arbeit erstmals zeigen, dass die GA-Signaltransduktion den Auxintransport in *Arabidopsis thaliana* stimuliert (Abbildung 34). Dabei steuert GA posttranskriptionell die Abundanz der Auxineffluxproteine PIN1, PIN2 und PIN3. Außerdem zeigen meine Studien, dass GA durch die Regulierung von

Embryogenese und Wurzelgravitropismus PIN-abhängige Wachstum- und Entwicklungsprozesse kontrolliert.

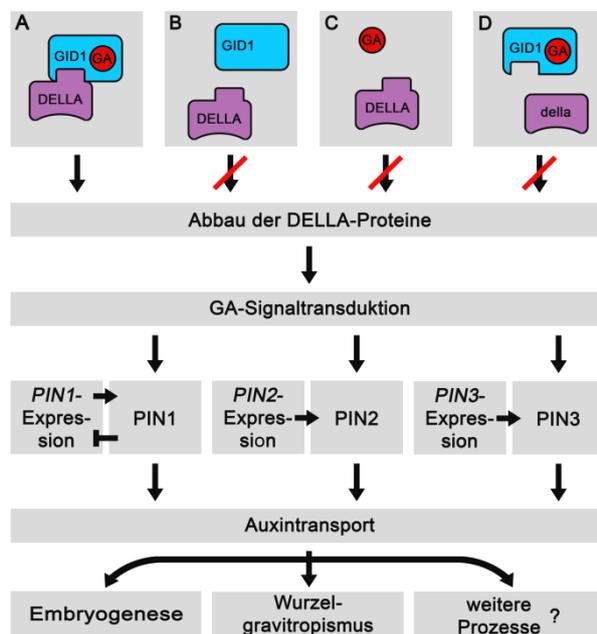


Abbildung 34: Modell zur Regulierung des Auxintransports durch die GA-Signaltransduktion.

(A) Bindet GA an GID1, so kann dieser mit den DELLA-Proteinen interagieren, um deren Abbau einzuleiten.

(B) bis (D) Wie in 4.1 beschrieben, sind sowohl GA, GID1 als auch die DELLA-Domäne für die Bindung des DELLA-Proteins an den GA-Rezeptor notwendig. Bleibt diese Interaktion aus, hat dies eine Stabilisierung der DELLA-Repressoren zur Folge.

Erfolgt der Abbau der DELLA-Proteine, so ist die Repression der GA-Signaltransduktion aufgehoben. Dadurch wird die Akkumulierung der PINs an der Zellmembran stimuliert. Dies fördert den Auxinefflux, somit den interzellulären Auxintransport und auf diese Weise

auxintransportabhängige Prozesse. Ist die GA-Signaltransduktion blockiert, senkt dies transkriptionsunabhängig die PIN-Abundanz an der Zellmembran. Zumindest im Falle von PIN2 erfolgt dies aufgrund eines gesteigerten vakuolären Abbaus. Der Mangel an PIN-Protein fördert (vermutlich als Rückkopplungsmechanismus) die Expression von *PIN1*.

Interessant ist in dem Zusammenhang der Hormonwechselwirkungen, dass neben GA weitere Signalwege ebenfalls die PIN2-Abundanz transkriptionsunabhängig beeinflussen. So führt eine Gabe von Methyljasmonat zu einer transkriptionsunabhängigen Reduzierung von PIN2:GFP in der Wurzelspitze und zu einer Beeinträchtigung des lateralen Auxinmaximums nach Gravistimulierung (Sun et al., 2011). Des Weiteren existiert ebenfalls eine Repression von PIN2 durch Salzstress. Diese erfolgt über eine transkriptionelle sowie über eine posttranskriptionelle Regulierung, welche mit einem beeinträchtigten Wurzelgravitropismus einhergehen (Sun et al., 2008). Da neben dem GA-Signalweg, auch die Jasmonsäuresignaltransduktion sowie die Antwort auf Salzstress und damit auf Abscisinsäure durch die DELLA-Proteine reguliert werden (Achard et al., 2006; Navarro et al., 2008; Hou et al., 2011), besteht die Möglichkeit, dass die posttranskriptionelle Regulierung von PIN2 in allen drei Signalwegen z.T. einem gemeinsamen DELLA-Protein-abhängigen Mechanismus zu Grunde liegt. So sind die DELLA-Proteine an der Antwort auf viele Arten von biotischem und abiotischem Stress beteiligt (Achard et al., 2003; Achard et al., 2006; Zentella et al., 2007; Achard et al., 2008b; Achard et al., 2008a; Navarro et al., 2008). Die Regulierung der PIN2-Abundanz in der Wurzelspitze könnte einen allgemeinen, durch die DELLA-Proteine aktivierten Mechanismus darstellen, um einem Stressstimulus zu entgehen, indem der

Gravitropismus abgeschwächt wird. Damit stellt sich die Frage, wie eine Krümmung der Wurzelspitze entgegen eines gravitationsabhängigen, lateralen Auxinmaximums stattfinden kann. Durch die DELLA-Protein-abhängige Reduzierung des PIN2-getriebenen Auxineffluxes ist dieses polare Auxinmaximum schwächer ausgeprägt. Daher könnte eine asymmetrische Veränderung der Auxinsensitivität in der Wurzelspitze in der Lage sein, eine Krümmung entgegen dem Gravitationsstimulus zu erzeugen (Abbildung 35). Eine

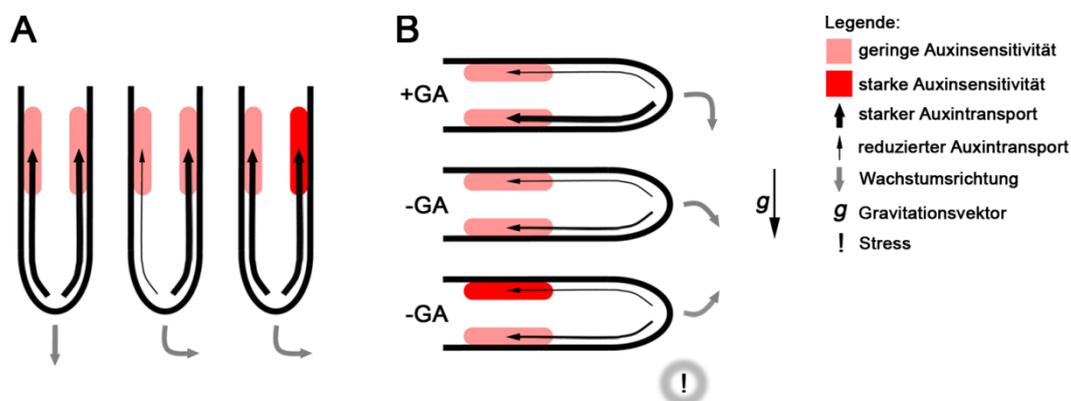


Abbildung 35: Modell für die auxinabhängige Krümmung der Wurzelspitze und für die Veränderung der Wachstumsrichtung nach Gravistimulierung.

(A) Im linken Bild ist eine in Richtung des Gravitationsvektors wachsende Wurzelspitze abgebildet. Hier verläuft der PIN2-abhängige, basipetale Auxintransport (schwarze Pfeile) gleichmäßig innerhalb der seitlichen Wurzelhaube und der Epidermis. Die Auxinsensitivität (rote Felder) ist homogen in der Epidermis verteilt.

Im mittleren Bild ist eine Wurzelspitze dargestellt in der der basipetale Auxintransport asymmetrisch verläuft. So wird ein laterales Auxinmaximum gebildet, das eine Krümmung der Wurzelspitze verursacht (Ottenschläger et al., 2003; Abas et al., 2006).

Wie im rechten Bild dargestellt, wäre ebenfalls vorstellbar, dass eine Krümmung der Wurzelspitze durch eine Veränderung der Auxinsensitivität erfolgt. In dem Beispiel liegt eine Hypersensitivität auf der rechten Seite vor, dadurch erfolgt eine Krümmung in diese Richtung.

(B) Im oberen Bild ist der wissenschaftlich etablierte Prozess dargestellt, wie er im Wildtyp stattfindet. Hier erfolgt auf der oberen Seite der Wurzelspitze ein Abbau von PIN2. Der so erzeugte asymmetrische Auxintransport führt zur Bildung eines lateralen Auxinmaximums und so zur Wurzelkrümmung.

Im mittleren Bild ist dieselbe Situation in einem GA-defizienten Hintergrund dargestellt. Aufgrund der verringerten PIN2-Menge ist die Asymmetrie des Auxintransports schwächer ausgeprägt. Wie in dieser Arbeit gezeigt, kommt es bei GA-Mangel zu einer verzögerten Krümmung der Wurzelspitze.

Im unteren Bild liegt ein Stressesstimulus in Richtung des Gravitropismus vor. Es ist vorstellbar, dass nach Wahrnehmung des Stresses die DELLA-Proteine stabilisiert werden und so die PIN2-Menge reprimiert wird. Gleichzeitig erfolgt die Erhöhung der Auxinsensitivität auf der dem Stressesstimulus abgewandten Seite der Wurzelspitze (hier die obere Seite). So könnte der Gravitropismus zu Gunsten eines anderen Tropismus (wie z.B. des Hydrotropismus) abgeschwächt werden.

Auxinhypersensitivität auf der dem Stressesstimulus abgewandten Seite der Wurzelspitze könnte, weitgehend unabhängig vom Gravitropismus, eine Krümmung dieser erzeugen. Dieser Mechanismus könnte dazu dienen, dem Stressesstimulus zu entgehen und somit das empfindliche Wurzelmeristem zu schützen. Auch ist vorstellbar, dass eine Krümmung

nicht über eine veränderte Auxinsensitivität, sondern über eine gewebespezifische Regulierung des GA-Gehalts stattfindet. Somit könnte der PIN2-abhängige Auxintransport nicht gleichmäßig in der Wurzelspitze reduziert werden, sondern nur in dem Gewebe, das dem Stressstimulus zugewandt ist (Abbildung 36). Damit fiel der basipetale Auxintransport in dem dem Stimulus abgewandten Gewebe stärker aus, was eine Krümmung der Wurzelspitze hervorriefe.

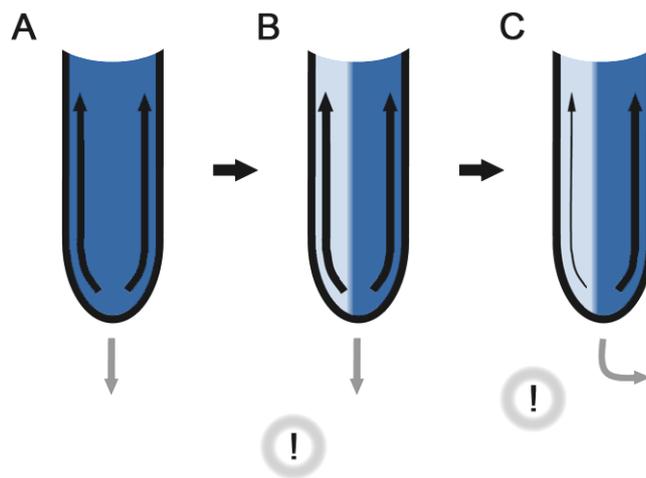


Abbildung 36: Modell für die Wurzelkrümmung aufgrund eines gewebespezifischen GA-Gehalts.

(A) Ohne Stressstimulus ist GA innerhalb der Wurzelspitze (blau) gleichmäßig verteilt. Daher verläuft der PIN2-abhängige, basipetale Auxintransport (schwarze Pfeile) symmetrisch innerhalb der seitlichen Wurzelhaube und der Epidermis. Der graue Pfeil gibt die Wachstumsrichtung der Wurzelspitze an.

(B) Nimmt die Wurzelspitze einen Stressstimulus (!) wahr, erfolgt die gewebespezifische Senkung des GA-

Gehalts (hellblau) auf der dem Stimulus zugewandten Seite.

(C) Die Senkung des GA-Gehalts aktiviert die DELLA-Proteine, wodurch PIN2 gewebespezifisch abgebaut wird. Damit erfolgt ein asymmetrischer Auxintransport und so die Bildung eines lateralen Auxinmaximums, welches die Krümmung der Wurzelspitze zur Folge hat.

Im Zusammenhang mit der Wechselwirkung verschiedener Signalwege ist außerdem interessant, dass die eingangs erwähnte GA-abhängige Regulierung der Apikaldominanz nicht nur in Arabidopsis, sondern auch in Erbse, Pappel, Reis und Weizen beobachtet werden konnte (Jacobs und Case, 1965; Scott et al., 1967; Gale und Marshall, 1973; Ueguchi-Tanaka et al., 2005; Appleford et al., 2007; Mauriat et al., 2011). So führen z.B. die in 4.1 beschriebenen DELLA-Domänenmutationen von *gai-1* in Arabidopsis und die *Rht-1b*-Allele in Weizen zu einer reduzierten Apikaldominanz, während die *GID1*-Überexpression in Reis eine Verstärkung der Apikaldominanz bewirkt. Ich konnte zeigen, dass im Sprossgewebe von GA-Mutanten der Auxintransport sowie die PIN1-Proteinmenge reduziert sind (Abbildung 16H bis J). Dies liefert in Arabidopsis einen ersten molekularen Hinweis auf einen GA-abhängigen Mechanismus zur Kontrolle der Apikaldominanz, da diese auxintransportabhängig ist. Dabei muss bedacht werden, dass das im Spross transportierte Auxin selbst nicht in die Sprossknospen eindringt und Auxin nicht in der Lage ist, deren Auswachsen zu Seitensprossen direkt zu verhindern (Yeang und Hillman, 1982; Booker et al., 2003). Dahingegen wird die Knospenruhe durch das Phytohormon Strigolacton (oder dessen Derivate) direkt gefördert (Gomez-Roldan et al., 2008; Umehara et al., 2008; Brewer et al., 2009). Eine Erklärung für die auxinabhängige

Regulierung der Apikaldominanz begründet sich darin, dass die Expression von Strigolactonbiosyntheseegenen auxintransportabhängig stimuliert wird (Arite et al., 2007; Brewer et al., 2009; Hayward et al., 2009). Da GA wiederum den Auxintransport reguliert, könnte GA auf diese Weise die Strigolactonproduktion und somit die Apikaldominanz steuern. In der Tat lieferten meine ersten Untersuchungen Hinweise für eine in *gai-1* im Vergleich mit dem Wildtyp reprimierte Expression der Strigolactonbiosyntheseogene *MORE AXILLARY GROWTH 3 (MAX3)* und *MAX4* (Sorefan et al., 2003; Booker et al., 2004; Daten sind hier nicht gezeigt). Der in Abbildung 37 dargestellte Mechanismus könnte für die GA-abhängige Regulierung der Apikaldominanz

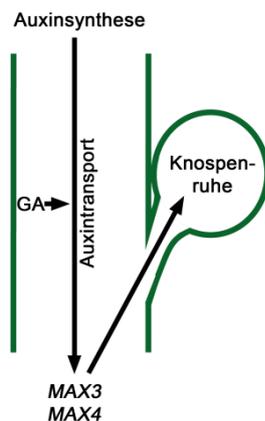


Abbildung 37: Modell für die GA-abhängige Regulierung der Apikaldominanz.

Auxin wird im Sprossapex und in jungen Blättern synthetisiert und innerhalb des Sprosses basipetal transportiert. So aktiviert Auxin die Transkription von *MAX3* und *MAX4* und somit die Strigolactonsynthese. Strigolactone werden acropetal innerhalb des Xylems transportiert (Kohlen et al., 2011). So erreichen sie die Seitenknospen, um deren Dormanz aufrechtzuerhalten. Da die GA-Signaltransduktion den Auxintransport aktiviert, könnte sich daraus eine indirekte Förderung der Apikaldominanz ergeben.

in Arabidopsis und den oben genannten Arten verantwortlich sein. Somit gilt es zu untersuchen, ob der hier erstmals gezeigte GA-abhängige Mechanismus der posttranskriptionellen Regulierung der PIN-Proteine auch auf andere Samenpflanzen übertragbar ist. Die Verfügbarkeit von molekularbiologischen Werkzeugen und Mutanten für eine zunehmende Zahl von Spezies wird dies in der Zukunft ermöglichen.

4.2.2 Die GA-abhängige Regulierung der *WAG2*-Expression und der Apikalhakenentwicklung

Diverse Untersuchungen zeigen, dass Mitglieder der AGCVIII-Kinasefamilie an der Regulierung des Auxintransports beteiligt sind (Benjamins et al., 2001; Santner und Watson, 2006; Zourelidou et al., 2009). So wurde z.B. die D6PK-Familie in unserem Labor charakterisiert, und ich konnte zeigen, dass der Auxintransport in *d6pk*-Tripelmutanten beeinträchtigt ist. Eine Bedeutung der AGCVIII-Kinasen wurde im Zusammenhang mit der GA-Signaltransduktion und der GA-abhängigen Entwicklung von Arabidopsis noch nicht diskutiert.

In meiner Arbeit konnte ich zum ersten Mal zeigen, dass die Transkription des AGCVIII-Kinasegens *WAG2* durch GA stimuliert und durch DELLA-Proteine und PIFs reguliert wird.

GA induziert die *WAG2*-Transkription innerhalb des Apikalhakens. Wie meine Arbeit zeigt, ist dessen Entwicklung *WAG2*-abhängig. Dies lässt sich am besten über die Regulierung eines lateralen Auxinmaximums durch *WAG2* erklären. Dabei ist *WAG2* epistatisch zu GA. Die Steuerung des Auxinmaximums erfolgt vermutlich über die Kontrolle des PIN-abhängigen Auxinflusses, da die PIN-Proteine *WAG2*-Substrate darstellen.

Die Apikalhakenentwicklung lässt sich in drei Phasen aufteilen: die Bildungs-, die Aufrechterhaltungs- sowie die Öffnungsphase (Raz und Ecker, 1999; Vandenbussche et al., 2010; Zadnikova et al., 2010). Alle drei Phasen werden durch die GA-Signaltransduktion gesteuert (Gallego-Bartolomé et al., 2011). Meine physiologischen Untersuchungen sprechen dafür, dass *WAG2* nicht die Bildungsphase des Apikalhakens reguliert, sondern die Öffnung und/oder die Öffnungsgeschwindigkeit des Hakens reprimiert. Auch für die PIFs konnte gezeigt werden, dass diese die Apikalhakenentwicklung steuern (Khanna et al., 2007; Gallego-Bartolomé et al., 2011). Meine Analyse der verschiedenen *pif*-Mutanten zeigte, dass die Transkriptionsfaktoren PIF1, PIF3 und PIF5 positive Regulatoren der *WAG2*-Expression darstellen (Abbildung 25A). Dafür spricht auch eine publizierte Microarray-Analyse von *pif1 pif3 pif4 pif5*-Quadrupelmутanten (Leivar et al., 2009). Diese zeigt eine Reduzierung der relativen *WAG2*-Expression in der Mutante im Vergleich zum Wildtyp auf 39,3%. Diese Beeinträchtigung entspricht dem in meiner Arbeit mittels qRT-PCR ermittelten Wert (39,2%).

Die Analyse der *pif*-Einzelmutanten wies darauf hin, dass PIF4 (im Gegensatz zu den anderen untersuchten PIFs) die *WAG2*-Transkription negativ reguliert. Hierbei könnte es sich um einen Kontrollmechanismus handeln, welcher eine zu starke *WAG2*-Expression verhindert. So konnte beobachtet werden, dass die Überexpression der AGCVIII-Kinasegene *PID*, *WAG1* und *WAG2* das Wachstum und die Entwicklung von Arabidopsis schädigt: Es wurden u.a. die Desintegration des Wurzelmeristems und die Beeinträchtigung des Gravitropismus sowie der Elongation von Wurzel und Hypokotyl gezeigt (Benjamins et al., 2001; Dhonukshe et al., 2010).

PIF5 stellt von den getesteten Transkriptionsfaktoren den stärkste Positivregulator dar, da von allen Einzelmutanten nur *pif5* eine signifikante Reduzierung der *WAG2*-Expression aufwies. Zusätzlich zeigten Überexpressoren eine Zunahme an *WAG2*-Transkript (Abbildung 25B). Reduzierung und Zunahme der *WAG2*-Expression korrelierten mit einer veränderten Apikalhakenöffnung in der Mutante bzw. den Überexpressoren (Abbildung 25C). Diese PIF5-abhängige Apikalhakenentwicklung wurde auch in einer anderen Studie gezeigt (Khanna et al., 2007). Hier wurde zusätzlich beobachtet, dass in *PIF5*-Überexpressoren die Synthese von Ethylen hochreguliert ist (*pif5*-Mutanten zeigen hingegen keinen veränderten Ethylengehalt im Vergleich mit dem Wildtyp). Dies deutet auf ein darauf hin, dass PIF5 die Hakenentwicklung durch unterschiedliche

Mechanismen steuern kann (*WAG2*-Expression und Ethylenbiosynthese), und zum anderen, dass die veränderte Hakenentwicklung in den Überexpressoren nicht allein der gesteigerten *WAG2*-Expression zugeordnet werden darf. Eine Analyse von *wag2 35S:PIF5*-Mutanten würde die Unterscheidung beider Prozesse ermöglichen. Ebenfalls wäre zu testen, ob *WAG2* ein direktes Zielgen der PIFs darstellt. PIFs sind *basic helix-loop-helix*-Transkriptionsfaktoren, welche an G-box-Promotorelemente binden (Martinez-Garcia et al., 2000). Für eine direkte Regulierung durch die PIFs spricht die Existenz von zwei G-box-Elementen im Promotorbereich von *WAG2* (Abbildung 38). Diese liegen 1325 und 2070 bp in 5´-Richtung vor der kodierenden *WAG2*-Sequenz. Diese Positionen stehen im Einklang mit bereits (u.a. in unserem Labor durch René Richter) nachgewiesenen PIF-Bindestellen (Oh et al., 2009; Richter et al., 2010). Im Gegensatz dazu findet sich im Promotorbereich von *WAG1* keine G-box. Dies könnte das voneinander abweichende Expressionsverhalten und die unterschiedlichen Phänotypen der Funktionsverlustmutanten erklären (Abbildung 21A). Des Weiteren sind im Promotorbereich der beiden *WAG*-Gene *auxin response*-Elemente (AuxRE) zu finden. Somit ist es nicht unwahrscheinlich, dass die *WAG*-Expression, ähnlich wie die des nah verwandten *PID*-Gens, auch durch Auxin reguliert wird (Benjamins et al., 2001). So konnte bereits gezeigt werden, dass Auxin die Expression des zu den *WAGs* homologen Kinasegens aus Gurke stimuliert (Chono et al., 1998; Chono et al., 2001).

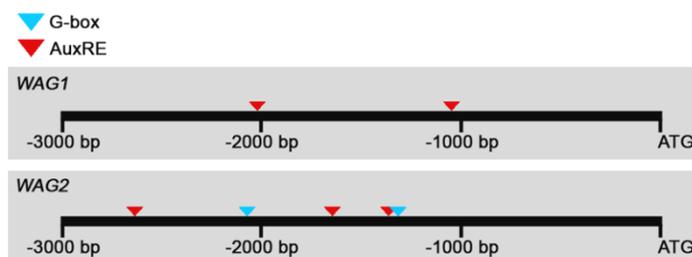


Abbildung 38: Schemata der Promotoren von *WAG1* und *WAG2*.

In den ersten 3000 bp in 5´-Position vor der kodierenden Sequenz von *WAG1* liegen *auxin response*-Elemente (AuxRE) vor, während in der entsprechenden Sequenz von *WAG2* außerdem G-box-Elemente vorkommen.

Diverse Studien zeigen, dass *WAG2* auxintransportabhängige Wachstums- und Entwicklungsprozesse reguliert. So wurde gezeigt, dass *wag2*-Mutanten eine Verstärkung des oszillierenden Wurzelwachstums zeigen. Des Weiteren weisen *wag1 wag2 pid*-Tripelmutanten eine Beeinträchtigung des Gravitropismus, des Phototropismus, des Wurzelmeristemwachstums sowie der Embryogenese auf (Santner und Watson, 2006; Cheng et al., 2008; Dhonukshe et al., 2010; Ding et al., 2011). Aufgrund dieser Phänotypen und der Verwandtschaft mit der *PID*-Kinase wurde vorhergesagt, dass *WAG2* an der Kontrolle des Auxintransports beteiligt ist. *PID* phosphoryliert die *PIN*-Proteine, verändert dadurch die Membranpolarität dieser Auxintransporter und damit die Richtung des Auxinflusses. Auch die *WAG2*-Überexpression führt im selben Maße wie die *PID*-

Überexpression zu einer Änderung der Membranpolarität von PIN1, PIN2 und PIN4 in Wurzelzellen. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass WAG2 und PID dieselben Serinreste innerhalb des PIN2-Proteins phosphorylieren (Dhonukshe et al., 2010). Meine *in vitro*-Phosphorylierungsexperimente zeigen außerdem, dass neben PIN2 auch PIN1, 3, 4 und 7 WAG2-Substrate darstellen (Abbildung 26A).

Neben der Regulierung der PIN-Polarität bestehen mehrere Möglichkeiten, wie sich diese Phosphorylierung auf die Proteineigenschaften der PINs auswirken könnte. So wurde ein Modell vorgeschlagen, in dem die WAG2-Aktivität den Abbau der PINs einleitet und somit die PIN-Abundanz negativ reguliert (Sorefan et al., 2009). Eine andere Möglichkeit wäre, dass WAG2 eine gegenteilige Funktion ausübt und die PIN-Proteinmenge stabilisiert. Somit könnte WAG2 ein Bestandteil der GA-abhängigen, posttranskriptionellen Regulierung der PIN-Abundanz darstellen, die in dieser Arbeit erstmals beschrieben wird (4.2.1). Außerdem könnte WAG2 durch die Phosphorylierung der PINs deren Transportaktivität regulieren. Dieser Mechanismus wurde von unserem Labor für die Funktionsweise der AGCVIII-Kinasen der D6PK-Familie vorgeschlagen (Zourelidou et al., 2009).

Meine Untersuchung von PIN1:GFP und PIN3:GFP in *wag2*-Mutanten lieferte keinen Hinweis darauf, dass eine WAG2-abhängige Regulierung der PIN-Polarität oder PIN-Abundanz innerhalb des Apikalhakens vorliegt. Allerdings konnte ich aufgrund technischer Einschränkungen die beiden PIN-Proteine nicht innerhalb der Endodermis und des Zentralzylinders untersuchen, obwohl die Proteine in diesen Geweben am stärksten exprimiert werden (Zadnikova et al., 2010; Gallego-Bartolomé et al., 2011). Die Endodermis nimmt eine entscheidende Rolle für den lateralen Auxintransport innerhalb des Hypokotyls ein. So geht der durch den Photo- und den Gravitropismus initiierten Krümmung des Hypokotyls eine Veränderung der PIN3-Polarität in Endodermiszellen voraus (Abbildung 39). Während PIN3 vor der Stimulierung apolar in der Zellmembran vorliegt, wird das Protein anschließend zeitweise umverteilt und ist dann polar lokalisiert (Ding et al., 2011; Rakusova et al., 2011). Während die PIN3-Umverteilung mit der

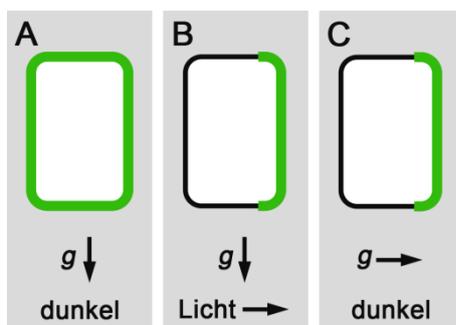


Abbildung 39: Umverteilung von PIN3 in Endodermiszellen des Hypokotyls (nach Ergebnissen aus Ding et al. [2011] und Rakusova et al. [2011]).

In bestimmten Zellen der Hypokotylendodermis kommt es nach Licht- oder Gravitstimulierung zu einer Veränderung der PIN3-Polarität (grün dargestellt).

(A) Vor der Stimulierung ist PIN3 apolar in der Zellmembran verteilt (*g* gibt die Richtung des Gravitationsvektors an).

(B) und **(C)** Nach Licht- bzw. Gravitstimulierung verändert sich die PIN3-Polarität. Die PIN3-Lokalisierung ist dann auf eine laterale Membran beschränkt.

Bildung eines lateralen Auxinsignalmaximums einhergeht, führt eine Hemmung dieser Polarisierung zu einer beeinträchtigten Krümmung des Hypokotyls. Dies spricht dafür, dass die PIN3-Umverteilung die Richtung des Auxinflusses im Hypokotyl verändert. Erwähnenswert ist, dass WAG2, zumindest im Fall des Phototropismus, an der Regulierung der Polaritätsänderung von PIN3 beteiligt ist. Auch die Aufrechterhaltung des Apikalhakens könnte einem ähnlichen Mechanismus zugrunde liegen. Mittels fixierter Querschnitte ließe sich auch in der Endodermis des Apikalhakens PIN3:GFP durch die konfokale Mikroskopie nachweisen (Zadnikova et al., 2010). Dies führt aber zu einer erschwerten Identifizierung der PIN-Polarität. Außerdem müsste eine Methode angewandt werden, welche in den Querschnitten eine Differenzierung der Hakeninnen- und Hakenaußenseite ermöglicht, damit sich die abweichende PIN-Polarität bestimmen lässt.

Dafür, dass diese Arbeit nicht klären konnte, inwieweit sich die WAG2-abhängige Phosphorylierung auf die PIN-Eigenschaften (Abundanz, Polarität, Aktivität) auswirkt, könnten neben den technischen Einschränkungen, eine Redundanz der AGCVIII-Kinasen verantwortlich sein. Daher ist es möglich, dass eine sichtbare Veränderung der PINs in der *wag2*-Mutante schwach ausgeprägt ist. Zum Beispiel regulieren PID, WAG1 und WAG2 zusammen den Wurzelgravitropismus und den Hypokotylphototropismus (Dhonukshe et al., 2010; Ding et al., 2011). Zu einer Regulierung des Apikalhakens durch andere AGCVIII-Kinasen gibt es keine detaillierten Studien. Es wurde aber gezeigt, dass *pid*-Mutanten einen Apikalhaken ausbilden. Dessen Entwicklung wurde aber nicht im Detail analysiert (Cheng et al., 2007), sodass eine Beteiligung von PID an der Hypokotylhakenentwicklung nicht ausgeschlossen werden kann. Da auch die Bildungsphase des Apikalhakens einen aktiven, gerichteten Auxintransport benötigt (Vandenbussche et al., 2010; Zadnikova et al., 2010), WAG2 diese aber scheinbar nicht reguliert, ist es wahrscheinlich, dass andere Kinasen ebenfalls an der Apikalhakenentwicklung teilnehmen. Eine funktionelle Redundanz liegt auch z.T. zwischen den PIN-Proteinen vor (Vieta et al., 2005). So kommen auch PIN4 und PIN7 als WAG2-Substrate während der Apikalhakenentwicklung in Frage, da, wie hier gezeigt, beide Proteine durch WAG2 phosphoryliert werden. Außerdem sind auch diese PINs an der Aufrechterhaltung des Hypokotylhakens beteiligt (Zadnikova et al., 2010).

Des Weiteren besteht die Möglichkeit, dass WAG2 neben den PINs weitere Substrate besitzt. So sind auch Auxintransporter der PGP-Familie an der Entwicklung des Apikalhakens beteiligt (Wu et al., 2010), und es konnte gezeigt werden, dass PGP19 ein Substrat der AGCVIII-Kinase PHOT1 darstellt (Christie et al., 2011). Letzteres spricht dafür, dass weitere AGC-Kinasen in der Lage sind, PGPs zu phosphorylieren. Zusätzlich könnte WAG2 Komponenten der Auxinsignaltransduktion regulieren. Da WAG2 zellmembranlokalisiert ist (Dhonukshe et al., 2010), spricht dies zumindest gegen eine Phosphorylierung von zellkernlokalisierten ARFs oder Aux/IAAs.

Die oben beschriebene Datenlage weist am stärksten darauf hin, dass WAG2 die PIN-Polarität und damit die Richtung des Auxinflusses innerhalb des Hypokotylhakens steuert. Von allen *pin*-Einzelmutanten zeigt *pin3* die am stärksten beeinträchtigte Apikalhakenentwicklung (Zadnikova et al., 2010). Auch in meiner Arbeit konnte der Hypokotylhakenphänotyp von *pin3*-Mutanten beobachtet werden. Zusätzlich konnte ich eine verstärkte Störung der Hakenentwicklung in der *wag2 pin3*-Doppelmutante zeigen. Dies lässt sich mit der Regulierung des Auxinmaximums in der Hakeninnenseite erklären. Dessen Ausbildung ist notwendig für eine Inhibierung der Zellelongation auf der Hakeninnenseite (Kuhn und Galston, 1992; Friml et al., 2002; Vandenbussche et al., 2010). Dadurch wachsen die Zellen der Hakeninnen- und -außenseite unterschiedlich stark, wodurch es zur Bildung und Aufrechterhaltung des Apikalhakens kommt. In *pin3*-Mutanten ist die Bildung des Auxinmaximums gestört (Zadnikova et al., 2010). Ich konnte zeigen, dass dies auch in *wag2*-Mutanten der Fall ist, und dass dieser Prozess von der GA-Biosynthese abhängig ist. Letzteres wird durch eine andere Studie bestätigt (Gallego-Bartolomé et al., 2011). In *wag2*-Mutanten konnte ich im Gegensatz zu *ga1* beobachten, dass GA-Gabe die Ausbildung des Auxinmaximums nicht rettet (Abbildung 27D). Auch konnte der Apikalhakenphänotyp von *wag2* nicht durch GA-Behandlung komplementiert werden (Abbildung 24D). Beide Beobachtungen weisen darauf hin, dass WAG2 epistatisch zu GA ist. Zusammenfassend sprechen meine Untersuchungen dafür, dass GA die Apikalhakenentwicklung durch die Bildung des WAG2-abhängigen Auxinmaximums steuert.

Die Regulierung der Apikalhakenentwicklung spielt eine bedeutende Rolle für die Fitness von Dikotyledonen. Mutanten, die eine gestörte Apikalhakenbildung aufweisen, sind nach der Keimung nicht in der Lage, die sie bedeckende Erde zu durchbrechen (Harpham et al., 1991). Des Weiteren ist vorstellbar, dass eine verzögerte Öffnung des Hakens die Keimblätter in ihrer Ausdehnung beeinträchtigt und diese außerdem, aufgrund der suboptimalen Orientierung zur Sonne, unzureichend mit Licht versorgt werden. Daraus ergäbe sich ein bedeutender Wachstumsnachteil für die Pflanze. Wie folgendes Modell beschreibt, ermöglicht die PIF-abhängige Kontrolle der WAG2-Expression die Regulierung der Apikalhakenöffnung (Abbildung 40). Nach der Keimung im Boden und dem Durchbrechen der Erde inaktiviert das eintretende Licht die PIF-Transkriptionsfaktoren durch zwei Mechanismen (Schwechheimer und Willige, 2009): Zum einen werden die PIFs nach Aktivierung der Phytochrome durch das 26S-Proteasom abgebaut (Bauer et al., 2004; Monte et al., 2004; Park et al., 2004; Shen et al., 2005; Lorrain et al., 2008; Castillon et al., 2009). Zum anderen führt Licht zu einer Senkung des GA-Gehalts (Ait-Ali et al., 1999; Weller et al., 2009). Wie in 4.1 erläutert, ist GA für die GID1-DELLA-Proteininteraktion notwendig. Deshalb sind bei GA-Mangel die DELLA-Proteine stabilisiert, die so in der Lage sind, die PIFs durch die DELLA-Protein-PIF-Bindung zu inaktivieren (de Lucas

et al., 2008; Feng et al., 2008). So wird die *WAG2*-Expression reduziert, und der Apikalhaken öffnet sich, da das Auxinmaximum in der Hakeninnenseite nicht länger aufrechterhalten bleibt und so die Inhibierung der Zellelongation in diesem Gewebe aufgehoben wird.

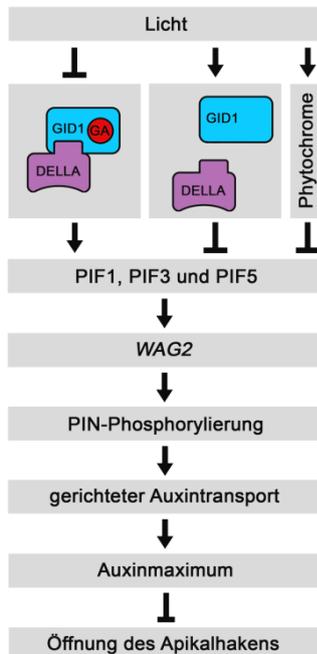


Abbildung 40: Modell für die WAG2-abhängige Öffnung des Apikalhakens.

Licht inaktiviert die PIFs durch zwei Mechanismen: Zum einen werden die Phytochrome aktiviert, die den proteasomalen Abbau der PIFs einleiten. Zum anderen senkt Licht den GA-Gehalt im Sprossgewebe. Dadurch werden die DELLA-Proteine stabilisiert. Diese inaktivieren die PIFs durch die Protein-Protein-Interaktion. Im Dunklen aktivieren PIF1, 3 und 5 die Transkription von *WAG2*. *WAG2* ist eine AGCVIII-Kinase und in der Lage, die PIN-Auxinefflux-transporter zu phosphorylieren. Dies bewirkt vermutlich eine Veränderung des Auxinflusses. So könnte Auxin verstärkt in die Apikalhakeninnenseite transportiert werden und dort ein Auxinsignalmaximum erzeugen. Die so aktivierte Auxinsignaltransduktion inhibiert die Elongation der Zellen in diesem Gewebe und damit die Öffnung des Apikalhakens. Trifft Licht auf den Keimling, wird die *WAG2*-Expression reprimiert, und somit wird das Auxinmaximum in der Hakeninnenseite reduziert. Dies führt zu einer Öffnung des Apikalhakens.

Die Regulierung der *WAG2*-Expression stellt allerdings nicht den einzigen Mechanismus dar, durch den GA die Apikalhakenentwicklung reguliert, da, wie hier gezeigt, die GA-Biosynthesemutante *ga1* einen stärkeren Hakenphänotyp als *wag2* aufweist. Zum anderen ist GA, im Gegensatz zu *WAG2*, für alle drei Phasen der Hakenentwicklung essentiell (Gallego-Bartolomé et al., 2011). Dabei steuert GA die Bildung und Aufrechterhaltung positiv und die Öffnung negativ. Da GA auch die Transkription von Ethylenbiosynthesegenen (*ACS5* und *ACS8*), *PIN3* und *PIN7* sowie *HOOKLESS 1 (HLS1)* in etiolierten Keimlingen aktiviert, ist es wahrscheinlich, dass diese Mechanismen ebenfalls zur GA-abhängigen Apikalhakenentwicklung beitragen. *HLS1* kodiert für eine putative N-Acetyltransferase und stimuliert über einen unbekanntes Mechanismus die Auxinsignaltransduktion innerhalb des Apikalhakens (Lehman et al., 1996; Li et al., 2004). *PIN3* und *PIN7* regulieren den Auxinefflux während der Apikalhakenentwicklung und fördern so die Bildung- und Aufrechterhaltung des Apikalhakens (Zadnikova et al., 2010). Ethylen stimuliert die Expression von Auxinbiosynthesegenen, *HLS1* sowie *AUX1* (Lehman et al., 1996; Stepanova et al., 2008; Vandenbussche et al., 2010). Zusammen mit meinen Untersuchungen zur Funktion von *WAG2* deutet dies darauf hin, dass sich ein GA-induziertes, komplexes Netzwerk aus unterschiedlichen Faktoren in einer Aktivierung der Auxinsignaltransduktion bündelt, um so die Bildung und Aufrechterhaltung des

Apikalhakens zu gewährleisten (Abbildung 41). Welche Rolle die von mir beschriebene GA-abhängige, posttranskriptionelle Kontrolle der PIN-Proteinabundanz (4.2.1) dabei spielt, müsste noch untersucht werden.

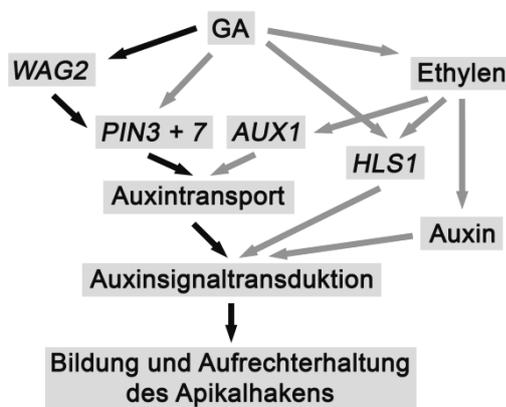


Abbildung 41: Modell zur GA-abhängigen Regulierung der Apikalhakenentwicklung.

GA induziert die Transkription unterschiedlicher Faktoren, die die Auxinsynthese, den Auxintransport und die Auxinsignaltransduktion stimulieren. Somit bündelt sich das Netzwerk in der Aktivierung eines Auxinsignalmaximums, welches die Bildung und Aufrechterhaltung des Apikalhakens gewährleistet. Die schwarzen Pfeile verfolgen den in meiner Arbeit beschriebenen WAG2-abhängigen Mechanismus, während die grauen Pfeile die Ergebnisse anderer Studien repräsentieren (Lehman et al., 1996; Stepanova et al., 2008; Vandebussche et al., 2010; Gallego-Bartolomé et al., 2011).

Wie von mir erstmals gezeigt, reguliert WAG2 mit der Apikalhakenentwicklung einen GA-abhängigen Prozess. Daraus ergibt sich die Fragestellung, ob weitere GA-abhängige Wachstums- und Entwicklungsprozesse durch WAG2 gesteuert werden. Wie in 4.2.1 beschrieben, stellen die Embryogenese und der Wurzelgravitropismus GA-abhängige Prozesse dar. In Kombination mit einem Funktionsverlust von *PID* und/oder *WAG1* zeigen *wag2*-Mutanten ebenfalls Keimblattdefekte und einen Wurzelgravitropismus. Diese erfolgen aufgrund einer Änderung der PIN-Polarität in diesen Mutanten (Dhonukshe et al., 2010). Dagegen zeigen meine Untersuchungen, dass GA-defiziente Wurzeln eine Reduzierung der PIN-Abundanz, aber keine Veränderung der PIN-Polarität aufweisen. Dies spricht dagegen, dass der in *ga1* gestörte Wurzelgravitropismus einer Regulierung der AGCVIII-Kinasen zuzuschreiben ist. Im Gegensatz dazu wurden die PIN-Proteine in GA-defizienten Embryonen bisher noch nicht untersucht. Somit ist es möglich, dass sowohl die PIN-Abundanz als auch die WAG2-abhängige PIN-Polarität in *ga1*-Embryonen gestört ist. Damit wären sowohl die Stärke als auch Richtung des Auxintransports in GA-defizienten Keimlingen beeinträchtigt.

Aufgrund der stark lichtabhängigen Expression von *WAG2* ist die Störung weiterer GA-kontrollierter Mechanismen in *wag2*-Mutanten vermutlich in lichtregulierten Prozessen zu suchen. Eine Analyse von publizierten Microarray-Datensätzen zeigt, dass die *WAG2*-Expression durch positive Regulatoren der Skotomorphogenese gefördert und durch positive Regulatoren der Photomorphogenese inhibiert wird (Ma et al., 2001; Ma et al., 2002). So beeinträchtigen die Lichtrezeptoren phyA, phyB, CRY1 und CRY2 sowie der Transkriptionsfaktor HY5 die *WAG2*-Expression. Das für den HY5-Abbau wichtige F-box-Protein COP1 sowie diverse PIFs fördern hingegen die *WAG2*-Transkription. Die Messung

der Hypokotyllänge von etiolierten *wag2*-Mutanten deutet auf keine beeinträchtigte Hypokotylelongation gegenüber dem Wildtyp hin. Dies könnte durch die funktionelle Redundanz der AGCVIII-Kinasen der PID-Familie begründet sein. Eine Gemeinsamkeit zwischen *ga1*- und *wag2*-Mutanten ist das auf die Keimblattspitzen beschränkte Auxinmaximum (*DR5*-Signal) in etiolierten Keimlingen. Da die Keimblätter möglicherweise eine Auxinquelle für die Apikalhakenentwicklung darstellen (Vandenbussche et al., 2010; Zadnikova et al., 2010), könnte dieser Effekt ebenfalls Anteil an den Hakenphänotypen von *ga1* und *wag2* haben. In etiolierten Wildtypkeimlingen zeigen die kompletten Keimblätter ein *DR5*-Signal, das jedoch in der Stärke variiert. Dieses Auxinsignal könnte auch dazu dienen, die Ausdehnung der Keimblätter zu inhibieren, um so das Wachstum in der Erde zu erleichtern. Jedoch konnte ich in *wag2*-Mutanten keine offensichtliche Veränderung der Kotyledonenfläche beobachten. Auch wenn die Funktion dieses Auxinmaximums nicht klar ist, handelt es sich dabei aber um einen lichtabhängigen Prozess: Die Beschränkung des *DR5*-Signalmaximums auf die Hydathoden, wie sie etiolierte *wag2*-Keimlinge zeigen, kann im Wildtyp bei im Licht gewachsenen Keimlingen beobachtet werden (Zhao et al., 2003; Bao et al., 2004; Yamaguchi et al., 2007).

Die Regulierung des Auxinsignalmaximums in den Keimblättern sowie die Öffnung des Apikalhakens stellen Gemeinsamkeiten zwischen der Photomorphogenese, der GA-Defizienz und dem *WAG2*-Funktionsverlust dar. *WAG2* liegt an einem Knotenpunkt der Gibberellin- und Lichtsignaltransduktion sowie des Auxintransports und stellt somit ein Beispiel für den *Crosstalk* dieser Signalwege dar, welche das Wachstum und die Entwicklung von Samenpflanzen in außerordentlicher Weise bestimmen. Weitere Studien werden zeigen, welche PIF-, GA-, licht- und auxintransportabhängigen Prozesse *WAG2* steuert. So könnte die Kinase beispielsweise an der Öffnung der Keimblätter oder am *shade avoidance syndrome* beteiligt sein (Alabadí et al., 2004; Djakovic-Petrovic et al., 2007; Alabadí et al., 2008; Lorrain et al., 2008; Keuskamp et al., 2010). Aufgrund der funktionellen Redundanz der AGCVIII-Kinasen wird die Analyse von multiplen Mutanten vermutlich den Schlüssel für weitere Entdeckungen darstellen.

4.3 Schlussfolgerung

In dieser Arbeit galt es, DELLA-Domänenmutationen aus unterschiedlichen Spezies in einem einheitlichen genetischen und biochemischen Hintergrund zu untersuchen und Mechanismen der GA-abhängigen Regulierung des Auxintransports aufzudecken.

Meine Arbeit konnte erstmals den Zwergwuchs diverser Weizen- und Maismutanten mit der Insensitivität ihrer DELLA-Proteine gegenüber dem GA-abhängigen Abbau erklären. Wie ich zeigen konnte, sind die DELLA-Proteine stabilisiert, wenn die genetischen Voraussetzungen für eine GID1-DELLA-Protein-Interaktion nicht gegeben sind (Abbildung 42). Somit kann ausgeschlossen werden, dass ein voneinander abweichendes Abbauverhalten der DELLA-Proteinvarianten den unterschiedlich stark ausgeprägten Zwergwuchs der Getreidemutanten erklärt. Dies spricht dafür, dass die Ursache in den unterschiedlichen genetischen Hintergründen dieser Mutationen zu suchen ist. Im Fall von *D8-Mpl* könnte aufgrund der verkürzten 5'-UTR auch die posttranskriptionelle DELLA-Proteinexpression für den schwachen Phänotyp verantwortlich sein.

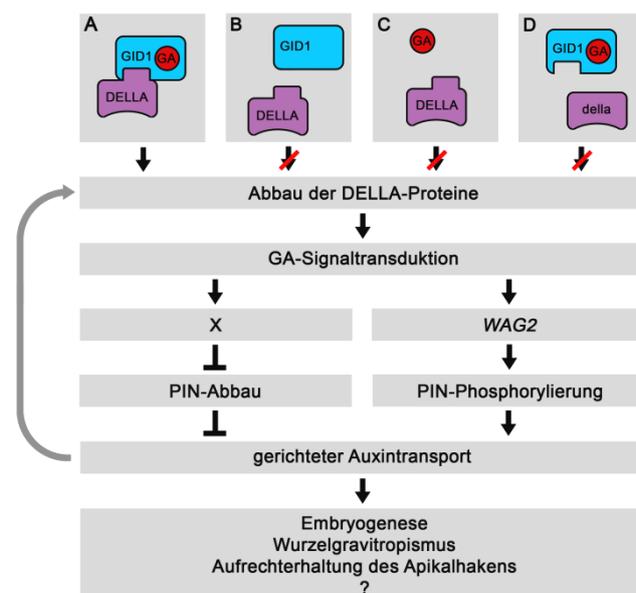


Abbildung 42: Modell zum Crosstalk zwischen der GA-Signaltransduktion und dem Auxintransport.

Die GA-abhängige GID1-DELLA-Protein-Interaktion läutet den Abbau der DELLA-Repressoren und damit die GA-Signaltransduktion ein (A). Dagegen führen ein GA-Mangel (B), ein Funktionsverlust von GID1 (C) oder eine DELLA-Domänenmutation (D) zu einer Stabilisierung der DELLA-Proteine und damit zu einer Blockade des GA-Signalwegs.

Die GA-Signaltransduktion stimuliert den Auxintransport durch eine posttranskriptionelle Regulierung von PIN-Proteinen. Zumindest im Fall von PIN2 wird dabei der Abbau des Proteins mittels unbekannter

Faktoren (X) reprimiert. Außerdem aktiviert GA die Transkription von *WAG2*, eine AGCVIII-Kinase, welche als Regulator der PIN-Lokalisierung beschrieben wurde. Somit ist die GA-Signaltransduktion in der Lage, den Auxintransport auf unterschiedliche Weise zu modulieren und so PIN-abhängige Wachstums- und Entwicklungsprozesse zu steuern. Des Weiteren stimuliert der Auxintransport den Abbau der DELLA-Proteine (grauer Pfeil). Somit könnte Auxin über die Inaktivierung der DELLA-Repressoren seinen eigenen Transport aktivieren.

Des Weiteren konnte ich erstmals zeigen, dass die GA-Signaltransduktion den Auxintransport in *Arabidopsis thaliana* reguliert. Meine Untersuchungen sprechen dafür, dass dies über einen bisher unbeschriebenen Mechanismus der PIN-Abundanzregulierung erfolgt. Dabei fördert GA die Auxineffluxtransporter PIN1, PIN2 und PIN3 posttranskriptionell. Zumindest im Fall von PIN2 verläuft dies über eine Reprimierung des

vakuolären Abbaus. Außerdem zeigt diese Arbeit, dass GA mit der Embryogenese und dem Wurzelgravitropismus auxintransportabhängige Wachstum- und Entwicklungsprozesse steuert. Ein weiterer Mechanismus, den ich hier erstmals beschreibe, ist die GA-abhängige Regulierung der *WAG2*-Transkription und die *WAG2*-abhängige Entwicklung des Apikalhakens. *WAG2* wurde bereits als Regulator der PIN-Polarität und damit der Auxintransportrichtung beschrieben (Dhonukshe et al., 2010).

Zusammengefasst ist die GA-Signaltransduktion, welche durch die *GID1*-*DELLA*-Protein-Interaktion initiiert wird, somit in der Lage, je nach Entwicklungszustand und Gewebe, sowohl die Stärke als auch die Richtung des Auxinflusses zu regulieren. Andererseits stimuliert der Auxintransport den Abbau der *DELLA*-Proteine (Fu und Harberd, 2003). Dies könnte aufgrund der durch Auxin geförderten Expression von GA-Biosynthesegenen erfolgen (Frigerio et al., 2006; O'Neill et al., 2010). Aus diesen Zusammenhängen ergibt sich, dass Auxin den eigenen Efflux über die Inaktivierung der *DELLA*-Proteine regulieren könnte (Abbildung 42). Dies wäre neben der auxinabhängigen *PIN*-Transkription (Vieter et al., 2005) und *PIN*-Endozytose (Paciorek et al., 2005; Robert et al., 2010) ein weiterer Mechanismus, durch den Auxin den eigenen Transport stimuliert. Außerdem wäre GA so in der Lage, die eigene Signaltransduktion durch Aktivierung des Auxintransports zu verstärken. Damit ergibt sich die Fragestellung, welche GA-abhängigen Wachstums- und Entwicklungsprozesse über eine Kontrolle des Auxintransports gesteuert werden bzw. inwiefern Auxin die durch GA ausgeführten Prozesse initiiert. Ein Beispiel hierfür wäre die in *pin1*-Mutanten bisher uncharakterisierte verstärkte Chlorophyllakkumulierung, die ein Kennzeichen von GA-Biosynthese- und -Signaltransduktionsmutanten darstellt.

5 Quellenverzeichnis

- Abas, L., Benjamins, R., Malenica, N., Paciorek, T., Wisniewska, J., Moulinier-Anzola, J.C., Sieberer, T., Friml, J., und Luschig, C.** (2006). Intracellular trafficking and proteolysis of the Arabidopsis auxin-efflux facilitator PIN2 are involved in root gravitropism. *Nat Cell Biol* **8**, 249-256.
- Achard, P., Vriegen, W.H., Van Der Straeten, D., und Harberd, N.P.** (2003). Ethylene regulates arabidopsis development via the modulation of DELLA protein growth repressor function. *Plant Cell* **15**, 2816-2825.
- Achard, P., Renou, J.P., Berthome, R., Harberd, N.P., und Genschik, P.** (2008a). Plant DELLAs restrain growth and promote survival of adversity by reducing the levels of reactive oxygen species. *Curr Biol* **18**, 656-660.
- Achard, P., Gong, F., Cheminant, S., Alioua, M., Hedden, P., und Genschik, P.** (2008b). The cold-inducible CBF1 factor-dependent signaling pathway modulates the accumulation of the growth-repressing DELLA proteins via its effect on gibberellin metabolism. *Plant Cell* **20**, 2117-2129.
- Achard, P., Liao, L., Jiang, C., Desnos, T., Bartlett, J., Fu, X., und Harberd, N.P.** (2007). DELLAs contribute to plant photomorphogenesis. *Plant Physiol* **143**, 1163-1172.
- Achard, P., Gusti, A., Cheminant, S., Alioua, M., Dhondt, S., Coppens, F., Beemster, G.T., und Genschik, P.** (2009). Gibberellin signaling controls cell proliferation rate in Arabidopsis. *Curr Biol* **19**, 1188-1193.
- Achard, P., Cheng, H., De Grauwe, L., Decat, J., Schoutteten, H., Moritz, T., Van Der Straeten, D., Peng, J., und Harberd, N.P.** (2006). Integration of plant responses to environmentally activated phytohormonal signals. *Science* **311**, 91-94.
- Ait-Ali, T., Frances, S., Weller, J.L., Reid, J.B., Kendrick, R.E., und Kamiya, Y.** (1999). Regulation of gibberellin 20-oxidase and gibberellin 3-beta-hydroxylase transcript accumulation during de-etiolation of pea seedlings. *Plant Physiol* **121**, 783-791.
- Akai, S.** (1974). History of plant pathology in Japan. *Annu Rev Phytopathol* **12**, 13-26.
- Alabadí, D., Gil, J., Blazquez, M.A., und Garcia-Martinez, J.L.** (2004). Gibberellins repress photomorphogenesis in darkness. *Plant Physiol* **134**, 1050-1057.
- Alabadí, D., Gallego-Bartolomé, J., Orlando, L., Garcia-Carcel, L., Rubio, V., Martinez, C., Frigerio, M., Iglesias-Pedraz, J.M., Espinosa, A., Deng, X.W., und Blazquez, M.A.** (2008). Gibberellins modulate light signaling pathways to prevent Arabidopsis seedling de-etiolation in darkness. *Plant J* **53**, 324-335.
- Appleford, N.E.J., Wilkinson, M.D., Ma, Q., Evans, D.J., Stone, M.C., Pearce, S.P., Powers, S.J., Thomas, S.G., Jones, H.D., Phillips, A.L., Hedden, P., und Lenton, J.R.** (2007). Decreased shoot stature and grain α -amylase activity following ectopic expression of a gibberellin 2-oxidase gene in transgenic wheat. *J Exp Bot* **58**, 3213-3226.
- Ariizumi, T., und Steber, C.M.** (2011). Mutations in the F-box gene SNEEZY result in decreased Arabidopsis GA signaling. *Plant Signal Behav* **6**.
- Ariizumi, T., Lawrence, P.K., und Steber, C.M.** (2011). The role of two f-box proteins, SLEEPY1 and SNEEZY, in Arabidopsis gibberellin signaling. *Plant Physiol* **155**, 765-775.
- Ariizumi, T., Murase, K., Sun, T.P., und Steber, C.M.** (2008). Proteolysis-independent down-regulation of DELLA repression by the gibberellin receptor GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF 1. *Plant Cell* **20**, 2447-2459.
- Arite, T., Iwata, H., Ohshima, K., Maekawa, M., Nakajima, M., Kojima, M., Sakakibara, H., und Kozuka, J.** (2007). DWARF10, an RMS1/MAX4/DAD1 ortholog, controls lateral bud outgrowth in rice. *Plant J* **51**, 1019-1029.
- Arnaud, N., Girin, T., Sorefan, K., Fuentes, S., Wood, T.A., Lawrenson, T., Sablowski, R., und Ostergaard, L.** (2010). Gibberellins control fruit patterning in Arabidopsis thaliana. *Genes Dev* **24**, 2127-2132.
- Bainbridge, K., Guyomarc'h, S., Bayer, E., Swarup, R., Bennett, M., Mandel, T., und Kuhlemeier, C.** (2008). Auxin influx carriers stabilize phyllotactic patterning. *Genes Dev* **22**, 810-823.
- Bao, F., Shen, J., Brady, S.R., Muday, G.K., Asami, T., und Yang, Z.** (2004). Brassinosteroids interact with auxin to promote lateral root development in Arabidopsis. *Plant Physiol* **134**, 1624-1631.
- Bauer, D., Viczian, A., Kircher, S., Nobis, T., Nitschke, R., Kunkel, T., Panigrahi, K.C., Adam, E., Fejes, E., Schafer, E., und Nagy, F.** (2004). CONSTITUTIVE

- PHOTOMORPHOGENESIS 1 and multiple photoreceptors control degradation of PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR 3, a transcription factor required for light signaling in Arabidopsis. *Plant Cell* **16**, 1433-1445.
- Benjamins, R., Quint, A., Weijers, D., Hooykaas, P., und Offringa, R.** (2001). The PINOID protein kinase regulates organ development in Arabidopsis by enhancing polar auxin transport. *Development* **128**, 4057-4067.
- Benková, E., Michniewicz, M., Sauer, M., Teichmann, T., Seifertová, D., Jürgens, G., und Friml, J.** (2003). Local, efflux-dependent auxin gradients as a common module for plant organ formation. *Cell* **115**, 591-602.
- Bennett, M.J., Marchant, A., Green, H.G., May, S.T., Ward, S.P., Millner, P.A., Walker, A.R., Schulz, B., und Feldmann, K.A.** (1996). Arabidopsis AUX1 gene: a permease-like regulator of root gravitropism. *Science* **273**, 948-950.
- Bethesda Research Laboratories** (1986). BRL pUC host: E. coli DH5a competent cells. *Focus* **8** (2), 9.
- Birnboim, H.C., und Doly, J.** (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**, 1513-1523.
- Björklund, S., Antti, H., Uddestrand, I., Moritz, T., und Sundberg, B.** (2007). Cross-talk between gibberellin and auxin in development of populus wood: gibberellin stimulates polar auxin transport and has a common transcriptome with auxin. *Plant J* **52**, 499-511.
- Blilou, I., Xu, J., Wildwater, M., Willemsen, V., Paponov, I., Friml, J., Heidstra, R., Aida, M., Palme, K., und Scheres, B.** (2005). The PIN auxin efflux facilitator network controls growth and patterning in Arabidopsis roots. *Nature* **433**, 39-44.
- Bogre, L., Okresz, L., Henriques, R., und Anthony, R.G.** (2003). Growth signalling pathways in Arabidopsis and the AGC protein kinases. *Trends Plant Sci* **8**, 424-431.
- Bolle, C.** (2004). The role of GRAS proteins in plant signal transduction and development. *Planta* **218**, 683-692.
- Booker, J., Chatfield, S., und Leyser, O.** (2003). Auxin acts in xylem-associated or medullary cells to mediate apical dominance. *Plant Cell* **15**, 495-507.
- Booker, J., Auldridge, M., Wills, S., McCarty, D., Klee, H., und Leyser, O.** (2004). MAX3/CCD7 is a carotenoid cleavage dioxygenase required for the synthesis of a novel plant signaling molecule. *Curr Biol* **14**, 1232-1238.
- Borojevic, K., und Borojevic, K.** (2005). The Transfer and History of "Reduced Height Genes" (Rht) in Wheat from Japan to Europe. *J Hered* **96**, 455-459.
- Bradford, M.M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-254.
- Brewer, P.B., Dun, E.A., Ferguson, B.J., Rameau, C., und Beveridge, C.A.** (2009). Strigolactone acts downstream of auxin to regulate bud outgrowth in pea and Arabidopsis. *Plant Physiol* **150**, 482-493.
- Briggs, W.R., Beck, C.F., Cashmore, A.R., Christie, J.M., Hughes, J., Jarillo, J.A., Kagawa, T., Kanegae, H., Liscum, E., Nagatani, A., Okada, K., Salomon, M., Rudiger, W., Sakai, T., Takano, M., Wada, M., und Watson, J.C.** (2001). The phototropin family of photoreceptors. *Plant Cell* **13**, 993-997.
- Cao, D., Hussain, A., Cheng, H., und Peng, J.** (2005). Loss of function of four DELLA genes leads to light- and gibberellin-independent seed germination in Arabidopsis. *Planta* **223**, 105-113.
- Castillon, A., Shen, H., und Huq, E.** (2009). Blue light induces degradation of the negative regulator PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR 1 to promote photomorphogenic development of Arabidopsis seedlings. *Genetics* **182**, 161-171.
- Chaabouni, S., Jones, B., Delalande, C., Wang, H., Li, Z., Mila, I., Frasse, P., Latche, A., Pech, J.C., und Bouzayen, M.** (2009). SI-IAA3, a tomato Aux/IAA at the crossroads of auxin and ethylene signalling involved in differential growth. *J Exp Bot* **60**, 1349-1362.
- Chandler, P.M., Marion-Poll, A., Ellis, M., und Gubler, F.** (2002). Mutants at the Slender1 locus of barley cv Himalaya. Molecular and physiological characterization. *Plant Physiol* **129**, 181-190.
- Chen, J.G., Ullah, H., Young, J.C., Sussman, M.R., und Jones, A.M.** (2001). ABP1 is required for organized cell elongation and division in Arabidopsis embryogenesis. *Genes Dev* **15**, 902-911.
- Cheng, Y., Qin, G., Dai, X., und Zhao, Y.** (2007). NPY1, a BTB-NPH3-like protein, plays a critical role in auxin-regulated organogenesis in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 18825-18829.
- Cheng, Y., Qin, G., Dai, X., und Zhao, Y.** (2008). NPY genes and AGC kinases define two key steps in auxin-mediated organogenesis in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 21017-21022.

- Cho, M., Lee, S.H., und Cho, H.T.** (2007). P-GLYCOPROTEIN 4 displays auxin efflux transporter-like action in Arabidopsis root hair cells and tobacco cells. *Plant Cell* **19**, 3930-3943.
- Chono, M., Nemoto, K., Yamane, H., Yamaguchi, I., und Murofushi, N.** (1998). Characterization of a protein kinase gene responsive to auxin and gibberellin in cucumber hypocotyls. *Plant Cell Physiol* **39**, 958-967.
- Chono, M., Suzuki, Y., Nemoto, K., Yamane, H., Murofushi, N., und Yamaguchi, I.** (2001). Expression pattern of the CsPK3 auxin-responsive protein kinase gene. *Biosci Biotechnol Biochem* **65**, 605-612.
- Christensen, S.K., Dagenais, N., Chory, J., und Weigel, D.** (2000). Regulation of auxin response by the protein kinase PINOID. *Cell* **100**, 469-478.
- Christie, J.M., Yang, H., Richter, G.L., Sullivan, S., Thomson, C.E., Lin, J., Titapiwatanakun, B., Ennis, M., Kaiserli, E., Lee, O.R., Adamec, J., Peer, W.A., und Murphy, A.S.** (2011). phot1 inhibition of ABCB19 primes lateral auxin fluxes in the shoot apex required for phototropism. *PLoS Biol* **9**, e1001076.
- Clough, S.J., und Bent, A.F.** (1998). Floral dip: a simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of Arabidopsis thaliana. *Plant J* **16**, 735-743.
- Dai, C., und Xue, H.W.** (2010). Rice early flowering1, a CKI, phosphorylates DELLA protein SLR1 to negatively regulate gibberellin signalling. *EMBO J* **29**, 1916-1927.
- de Lucas, M., Daviere, J.M., Rodríguez-Falcón, M., Pontin, M., Iglesias-Pedraz, J.M., Lorrain, S., Fankhauser, C., Blazquez, M.A., Titarenko, E., und Prat, S.** (2008). A molecular framework for light and gibberellin control of cell elongation. *Nature* **451**, 480-484.
- Dharmasiri, N., Dharmasiri, S., und Estelle, M.** (2005a). The F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature* **435**, 441-445.
- Dharmasiri, N., Dharmasiri, S., Jones, A.M., und Estelle, M.** (2003). Auxin action in a cell-free system. *Curr Biol* **13**, 1418-1422.
- Dharmasiri, N., Dharmasiri, S., Weijers, D., Lechner, E., Yamada, M., Hobbie, L., Ehrismann, J.S., Jürgens, G., und Estelle, M.** (2005b). Plant development is regulated by a family of auxin receptor F box proteins. *Dev Cell* **9**, 109-119.
- Dhonukshe, P., Huang, F., Galvan-Ampudia, C.S., Mahonen, A.P., Kleine-Vehn, J., Xu, J.A., Quint, A., Prasad, K., Friml, J., Scheres, B., und Offringa, R.** (2010). Plasma membrane-bound AGC3 kinases phosphorylate PIN auxin carriers at TPRXS(N/S) motifs to direct apical PIN recycling. *Development* **137**, 3245-3255.
- Dill, A., und Sun, T.** (2001). Synergistic derepression of gibberellin signaling by removing RGA and GAI function in Arabidopsis thaliana. *Genetics* **159**, 777-785.
- Dill, A., Jung, H.S., und Sun, T.P.** (2001). The DELLA motif is essential for gibberellin-induced degradation of RGA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 14162-14167.
- Dill, A., Thomas, S.G., Hu, J., Steber, C.M., und Sun, T.P.** (2004). The Arabidopsis F-box protein SLEEPY1 targets gibberellin signaling repressors for gibberellin-induced degradation. *Plant Cell* **16**, 1392-1405.
- Ding, Z.J., Galvan-Ampudia, C.S., Demarsy, E., Langowski, L., Kleine-Vehn, J., Fan, Y.W., Morita, M.T., Tasaka, M., Fankhauser, C., Offringa, R., und Friml, J.** (2011). Light-mediated polarization of the PIN3 auxin transporter for the phototropic response in Arabidopsis. *Nat Cell Biol* **13**, 447-452.
- Djakovic-Petrovic, T., de Wit, M., Voesenek, L.A., und Pierik, R.** (2007). DELLA protein function in growth responses to canopy signals. *Plant J* **51**, 117-126.
- Feng, S., Martinez, C., Gusmaroli, G., Wang, Y., Zhou, J., Wang, F., Chen, L., Yu, L., Iglesias-Pedraz, J.M., Kircher, S., Schafer, E., Fu, X., Fan, L.M., und Deng, X.W.** (2008). Coordinated regulation of Arabidopsis thaliana development by light and gibberellins. *Nature* **451**, 475-479.
- Feurtado, J.A., Huang, D., Wicki-Stordeur, L., Hemstock, L.E., Potentier, M.S., Tsang, E.W., und Cutler, A.J.** (2011). The Arabidopsis C2H2 zinc finger INDETERMINATE DOMAIN1/ENHYDROUS promotes the transition to germination by regulating light and hormonal signaling during seed maturation. *Plant Cell* **23**, 1772-1794.
- Frigerio, M., Alabadí, D., Pérez-Gómez, J., García-Carcel, L., Phillips, A.L., Hedden, P., und Blazquez, M.A.** (2006). Transcriptional regulation of gibberellin metabolism genes by auxin signaling in Arabidopsis. *Plant Physiol* **142**, 553-563.
- Friml, J., Wisniewska, J., Benková, E., Mendgen, K., und Palme, K.** (2002). Lateral relocation of auxin efflux regulator PIN3 mediates tropism in Arabidopsis. *Nature* **415**, 806-809.
- Friml, J., Vieten, A., Sauer, M., Weijers, D., Schwarz, H., Hamann, T., Offringa, R., und Jürgens, G.** (2003). Efflux-dependent auxin gradients establish the apical-basal axis of Arabidopsis. *Nature* **426**, 147-153.
- Friml, J., Yang, X., Michniewicz, M., Weijers, D., Quint, A., Tietz, O., Benjamins, R.,**

- Ouwerkerk, P.B., Ljung, K., Sandberg, G., Hooykaas, P.J., Palme, K., und Offringa, R.** (2004). A PINOID-dependent binary switch in apical-basal PIN polar targeting directs auxin efflux. *Science* **306**, 862-865.
- Fu, X., und Harberd, N.P.** (2003). Auxin promotes Arabidopsis root growth by modulating gibberellin response. *Nature* **421**, 740-743.
- Fu, X., Richards, D.E., Fleck, B., Xie, D., Burton, N., und Harberd, N.P.** (2004). The Arabidopsis mutant *sleepy1^{gar2-1}* protein promotes plant growth by increasing the affinity of the SCF^{SLY1} E3 ubiquitin ligase for DELLA protein substrates. *Plant Cell* **16**, 1406-1418.
- Fu, X., Richards, D.E., Ait-Ali, T., Hynes, L.W., Ougham, H., Peng, J., und Harberd, N.P.** (2002). Gibberellin-mediated proteasome-dependent degradation of the barley DELLA protein SLN1 repressor. *Plant Cell* **14**, 3191-3200.
- Fujimori, T., Yamashino, T., Kato, T., und Mizuno, T.** (2004). Circadian-controlled basic/helix-loop-helix factor, PIL6, implicated in light-signal transduction in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* **45**, 1078-1086.
- Fujioka, S., Yamane, H., Spray, C.R., Katsumi, M., Phinney, B.O., Gaskin, P., Macmillan, J., und Takahashi, N.** (1988). The dominant non-gibberellin-responding dwarf mutant (D8) of maize accumulates native gibberellins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 9031-9035.
- Gale, M.D., und Marshall, G.A.** (1973). Insensitivity to Gibberellin in Dwarf Wheats. *Ann Bot* **37**, 729-735.
- Gale, M.D., und Marshall, G.A.** (1976). The chromosomal location of Gai 1 and Rht 1, genes for Gibberellin insensitivity and semi-dwarfism, in a derivative of Norin 10 wheat. *Heredity* **37**, 283-289.
- Gallego-Bartolomé, J., Minguet, E.G., Marín, J.A., Prat, S., Blázquez, M.A., und Alabadí, D.** (2010). Transcriptional diversification and functional conservation between DELLA proteins in Arabidopsis. *Mol Biol Evol* **27**, 1247-1256.
- Gallego-Bartolomé, J., Arana, M.V., Vandenbussche, F., Zadnikova, P., Minguet, E.G., Guardiola, V., Van Der Straeten, D., Benková, E., Alabadí, D., und Blázquez, M.A.** (2011). Hierarchy of hormone action controlling apical hook development in Arabidopsis. *Plant J.*
- Galvan-Ampudia, C.S., und Offringa, R.** (2007). Plant evolution: AGC kinases tell the auxin tale. *Trends Plant Sci* **12**, 541-547.
- Galweiler, L., Guan, C., Müller, A., Wisman, E., Mendgen, K., Yephremov, A., und Palme, K.** (1998). Regulation of polar auxin transport by AtPIN1 in Arabidopsis vascular tissue. *Science* **282**, 2226-2230.
- Geisler, M., und Murphy, A.S.** (2006). The ABC of auxin transport: the role of p-glycoproteins in plant development. *FEBS Lett* **580**, 1094-1102.
- Geisler, M., Blakeslee, J.J., Bouchard, R., Lee, O.R., Vincenzetti, V., Bandyopadhyay, A., Titapiwatanakun, B., Peer, W.A., Bailly, A., Richards, E.L., Ejendal, K.F., Smith, A.P., Baroux, C., Grossniklaus, U., Müller, A., Hrycyna, C.A., Dudler, R., Murphy, A.S., und Martinoia, E.** (2005). Cellular efflux of auxin catalyzed by the Arabidopsis MDR/PGP transporter AtPGP1. *Plant J* **44**, 179-194.
- Gil, P., Dewey, E., Friml, J., Zhao, Y., Snowden, K.C., Putterill, J., Palme, K., Estelle, M., und Chory, J.** (2001). BIG: a calossin-like protein required for polar auxin transport in Arabidopsis. *Genes Dev* **15**, 1985-1997.
- Gomez-Roldan, V., Fermas, S., Brewer, P.B., Puech-Pagès, V., Dun, E.A., Pillot, J.P., Letisse, F., Matusova, R., Danoun, S., Portais, J.C., Bouwmeester, H., Bécard, G., Beveridge, C.A., Rameau, C., und Rochange, S.F.** (2008). Strigolactone inhibition of shoot branching. *Nature* **455**, 189-194.
- Gomi, K., Sasaki, A., Itoh, H., Ueguchi-Tanaka, M., Ashikari, M., Kitano, H., und Matsuoka, M.** (2004). GID2, an F-box subunit of the SCF E3 complex, specifically interacts with phosphorylated SLR1 protein and regulates the gibberellin-dependent degradation of SLR1 in rice. *Plant J* **37**, 626-634.
- Gou, J.Q., Strauss, S.H., Tsai, C.J., Fang, K., Chen, Y.R., Jiang, X.N., und Busov, V.B.** (2010). Gibberellins regulate lateral root formation in *Populus* through interactions with auxin and other hormones. *Plant Cell* **22**, 623-639.
- Gray, W.M., Kepinski, S., Rouse, D., Leyser, O., und Estelle, M.** (2001). Auxin regulates SCF(TIR1)-dependent degradation of Aux/IAA proteins. *Nature* **414**, 271-276.
- Grieneisen, V.A., Xu, J., Maree, A.F., Hogeweg, P., und Scheres, B.** (2007). Auxin transport is sufficient to generate a maximum and gradient guiding root growth. *Nature* **449**, 1008-1013.
- Griffiths, J., Murase, K., Rieu, I., Zentella, R., Zhang, Z.L., Powers, S.J., Gong, F., Phillips, A.L., Hedden, P., Sun, T.P., und Thomas, S.G.** (2006). Genetic characterization and functional analysis of the GID1 gibberellin receptors in Arabidopsis. *Plant Cell* **18**, 3399-

- 3414.
- Gubler, F., Chandler, P.M., White, R.G., Llewellyn, D.J., und Jacobsen, J.V.** (2002). Gibberellin signaling in barley aleurone cells. Control of SLN1 and GAMYB expression. *Plant Physiol* **129**, 191-200.
- Guilfoyle, T.J., und Hagen, G.** (2007). Auxin response factors. *Curr Opin Plant Biol* **10**, 453-460.
- Hadfi, K., Speth, V., und Neuhaus, G.** (1998). Auxin-induced developmental patterns in Brassica juncea embryos. *Development* **125**, 879-887.
- Harberd, N.P., und Freeling, M.** (1989). Genetics of dominant gibberellin-insensitive dwarfism in maize. *Genetics* **121**, 827-838.
- Harpham, N.V.J., Berry, A.W., Knee, E.M., Roveda-Hoyos, G., Raskin, I., Sanders, I.O., Smith, A.R., Wood, C.K., und Hall, M.A.** (1991). The effect of ethylene on the growth and development of wild-type and mutant *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Ann. Bot.* **68**, 55-61.
- Hartley, J.L., Temple, G.F., und Brasch, M.A.** (2000). DNA cloning using in vitro site-specific recombination. *Genome Res* **10**, 1788-1795.
- Hayward, A., Stirnberg, P., Beveridge, C., und Leyser, O.** (2009). Interactions between auxin and strigolactone in shoot branching control. *Plant Physiol* **151**, 400-412.
- Hedden, P.** (2003). The genes of the Green Revolution. *Trends Genet* **19**, 5-9.
- Hedden, P., und Phillips, A.L.** (2000). Gibberellin metabolism: new insights revealed by the genes. *Trends Plant Sci* **5**, 523-530.
- Heo, J.O., Chang, K.S., Kim, I.A., Lee, M.H., Lee, S.A., Song, S.K., Lee, M.M., und Lim, J.** (2011). Funneling of gibberellin signaling by the GRAS transcription regulator scarecrow-like 3 in the Arabidopsis root. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 2166-2171.
- Hirano, K., Asano, K., Tsuji, H., Kawamura, M., Mori, H., Kitano, H., Ueguchi-Tanaka, M., und Matsuoka, M.** (2010). Characterization of the molecular mechanism underlying gibberellin perception complex formation in rice. *Plant Cell* **22**, 2680-2696.
- Hou, X., Lee, L.Y., Xia, K., Yan, Y., und Yu, H.** (2011). DELLAs modulate jasmonate signaling via competitive binding to JAZs. *Dev Cell* **19**, 884-894.
- Huala, E., Oeller, P.W., Liscum, E., Han, I.S., Larsen, E., und Briggs, W.R.** (1997). Arabidopsis NPH1: a protein kinase with a putative redox-sensing domain. *Science* **278**, 2120-2123.
- Huang, F., Zago, M.K., Abas, L., van Marion, A., Galvan-Ampudia, C.S., und Offringa, R.** (2010). Phosphorylation of conserved PIN motifs directs Arabidopsis PIN1 polarity and auxin transport. *Plant Cell* **22**, 1129-1142.
- Huq, E., Al-Sady, B., Hudson, M., Kim, C., Apel, K., und Quail, P.H.** (2004). PHYTOCHROME-INTERACTING FACTOR1 is a critical bHLH regulator of chlorophyll biosynthesis. *Science* **305**, 1937-1941.
- Iuchi, S., Suzuki, H., Kim, Y.C., Iuchi, A., Kuromori, T., Ueguchi-Tanaka, M., Asami, T., Yamaguchi, I., Matsuoka, M., Kobayashi, M., und Nakajima, M.** (2007). Multiple loss-of-function of Arabidopsis gibberellin receptor AtGID1s completely shuts down a gibberellin signal. *Plant J* **50**, 958-966.
- Jacobs, W.P., und Case, D.B.** (1965). Auxin transport, gibberellin, and apical dominance. *Science* **148**, 1729-1731.
- Jaillais, Y., Santambrogio, M., Rozier, F., Fobis-Loisy, I., Miège, C., und Gaude, T.** (2007). The retromer protein VPS29 links cell polarity and organ initiation in plants. *Cell* **130**, 1057-1070.
- Josse, E.M., Gan, Y., Bou-Torrent, J., Stewart, K.L., Gilday, A.D., Jeffree, C.E., Vaistij, F.E., Martínez-García, J.F., Nagy, F., Graham, I.A., und Halliday, K.J.** (2011). A DELLA in disguise: SPATULA restrains the growth of the developing Arabidopsis seedling. *Plant Cell* **23**, 1337-1351.
- Jurado, S., Abraham, Z., Manzano, C., López-Torrejón, G., Pacios, L.F., und Del Pozo, J.C.** (2010). The Arabidopsis cell cycle F-box protein SKP2A binds to auxin. *Plant Cell* **22**, 3891-3904.
- Kepinski, S., und Leyser, O.** (2004). Auxin-induced SCF^{TIR1}-Aux/IAA interaction involves stable modification of the SCF^{TIR1} complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 12381-12386.
- Keuskamp, D.H., Pollmann, S., Voesenek, L.A., Peeters, A.J., und Pierik, R.** (2010). Auxin transport through PIN-FORMED 3 (PIN3) controls shade avoidance and fitness during competition. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 22740-22744.
- Khanna, R., Lin, X., und Watson, J.C.** (1999). Photoregulated expression of the PsPK3 and PsPK5 genes in pea seedlings. *Plant Mol Biol* **39**, 231-242.
- Khanna, R., Shen, Y., Marion, C.M., Tsuchisaka, A., Theologis, A., Schafer, E., und Quail, P.H.** (2007). The basic helix-loop-helix transcription factor PIF5 acts on ethylene biosynthesis and phytochrome signaling by distinct mechanisms. *Plant Cell* **19**, 3915-3929.

- King, K.E., Moritz, T., und Harberd, N.P.** (2001). Gibberellins are not required for normal stem growth in *Arabidopsis thaliana* in the absence of GAI and RGA. *Genetics* **159**, 767-776.
- Kleine-Vehn, J., und Friml, J.** (2008). Polar Targeting and Endocytic Recycling in Auxin-Dependent Plant Development. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **24**, 447-473.
- Kleine-Vehn, J., Ding, Z., Jones, A.R., Tasaka, M., Morita, M.T., und Friml, J.** (2010). Gravity-induced PIN transcytosis for polarization of auxin fluxes in gravity-sensing root cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 22344-22349.
- Kleine-Vehn, J., Leitner, J., Zwiewka, M., Sauer, M., Abas, L., Luschnig, C., und Friml, J.** (2008). Differential degradation of PIN2 auxin efflux carrier by retromer-dependent vacuolar targeting. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 17812-17817.
- Kohlen, W., Charnikhova, T., Liu, Q., Bours, R., Domagalska, M.A., Beguerie, S., Verstappen, F., Leyser, O., Bouwmeester, H., und Ruyter-Spira, C.** (2011). Strigolactones are transported through the xylem and play a key role in shoot architectural response to phosphate deficiency in nonarbuscular mycorrhizal host *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **155**, 974-987.
- Koncz, C., und Schell, J.** (1986). The promoter of TI-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. *Mol Gen Genet* **204**, 383-396.
- Koornneef, M., und van der Veen, J.H.** (1980). Induction and analysis of gibberellin sensitive mutants in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Theor Appl Genet* **58**, 257-263.
- Koornneef, M., Elgersma, A., Hanhart, C.J., van Loenen-Martinet, E.P., van Rijn, L., und Zeevaart, J.A.D.** (1985). A gibberellin insensitive mutant of *Arabidopsis thaliana*. *Physiol Plant* **65**, 33-39.
- Kuhn, H., und Galston, A.W.** (1992). Physiological asymmetry in etiolated pea epicotyls: relation to patterns of auxin distribution and phototropic behavior. *Photochem Photobiol* **55**, 313-318.
- Laemmli, U.K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lawit, S.J., Wych, H.M., Xu, D., Kundu, S., und Tomes, D.T.** (2010). Maize DELLA proteins dwarf plant8 and dwarf plant9 as modulators of plant development. *Plant Cell Physiol* **51**, 1854-1868.
- Laxmi, A., Pan, J., Morsy, M., und Chen, R.** (2008). Light plays an essential role in intracellular distribution of auxin efflux carrier PIN2 in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS One* **3**, e1510.
- Lee, S., Cheng, H., King, K.E., Wang, W., He, Y., Hussain, A., Lo, J., Harberd, N.P., und Peng, J.** (2002). Gibberellin regulates *Arabidopsis* seed germination via RGL2, a GAI/RGA-like gene whose expression is up-regulated following imbibition. *Genes Dev* **16**, 646-658.
- Lehman, A., Black, R., und Ecker, J.R.** (1996). HOOKLESS1, an ethylene response gene, is required for differential cell elongation in the *Arabidopsis* hypocotyl. *Cell* **85**, 183-194.
- Leivar, P., Tepperman, J.M., Monte, E., Calderon, R.H., Liu, T.L., und Quail, P.H.** (2009). Definition of early transcriptional circuitry involved in light-induced reversal of PIF-imposed repression of photomorphogenesis in young *Arabidopsis* seedlings. *Plant Cell* **21**, 3535-3553.
- Leivar, P., Monte, E., Al-Sady, B., Carle, C., Storer, A., Alonso, J.M., Ecker, J.R., und Quail, P.H.** (2008). The *Arabidopsis* phytochrome-interacting factor PIF7, together with PIF3 and PIF4, regulates responses to prolonged red light by modulating phyB levels. *Plant Cell* **20**, 337-352.
- Lewis, D.R., und Muday, G.K.** (2009). Measurement of auxin transport in *Arabidopsis thaliana*. *Nat Protoc* **4**, 437-451.
- Li, H., Johnson, P., Stepanova, A., Alonso, J.M., und Ecker, J.R.** (2004). Convergence of signaling pathways in the control of differential cell growth in *Arabidopsis*. *Dev Cell* **7**, 193-204.
- Lin, X., Feng, X.H., und Watson, J.C.** (1991). Differential accumulation of transcripts encoding protein kinase homologs in greening pea seedlings. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 6951-6955.
- Liscum, E., und Briggs, W.R.** (1995). Mutations in the NPH1 locus of *Arabidopsis* disrupt the perception of phototropic stimuli. *Plant Cell* **7**, 473-485.
- Ljung, K., Bhalerao, R.P., und Sandberg, G.** (2001). Sites and homeostatic control of auxin biosynthesis in *Arabidopsis* during vegetative growth. *Plant J* **28**, 465-474.
- Ljung, K., Hull, A.K., Celenza, J., Yamada, M., Estelle, M., Normanly, J., und Sandberg, G.** (2005). Sites and regulation of auxin biosynthesis in *Arabidopsis* roots. *Plant Cell* **17**, 1090-1104.
- Lorrain, S., Allen, T., Duek, P.D., Whitelam, G.C., und Fankhauser, C.** (2008). Phytochrome-

- mediated inhibition of shade avoidance involves degradation of growth-promoting bHLH transcription factors. *Plant J* **53**, 312-323.
- Luschign, C., Gaxiola, R.A., Grisafi, P., und Fink, G.R.** (1998). EIR1, a root-specific protein involved in auxin transport, is required for gravitropism in *Arabidopsis thaliana*. *Genes Dev* **12**, 2175-2187.
- Ma, L., Li, J., Qu, L., Hager, J., Chen, Z., Zhao, H., und Deng, X.W.** (2001). Light control of *Arabidopsis* development entails coordinated regulation of genome expression and cellular pathways. *Plant Cell* **13**, 2589-2607.
- Ma, L., Gao, Y., Qu, L., Chen, Z., Li, J., Zhao, H., und Deng, X.W.** (2002). Genomic evidence for COP1 as a repressor of light-regulated gene expression and development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **14**, 2383-2398.
- MacMillan, J.** (2001). Occurrence of gibberellins in vascular plants, fungi, and bacteria. *J Plant Growth Regul* **20**, 387-442.
- Marchant, A., Kargul, J., May, S.T., Muller, P., Delbarre, A., Perrot-Rechenmann, C., und Bennett, M.J.** (1999). AUX1 regulates root gravitropism in *Arabidopsis* by facilitating auxin uptake within root apical tissues. *EMBO J* **18**, 2066-2073.
- Martinez-Garcia, J.F., Huq, E., und Quail, P.H.** (2000). Direct targeting of light signals to a promoter element-bound transcription factor. *Science* **288**, 859-863.
- Matsuoka, K., Bassham, D.C., Raikhel, N.V., und Nakamura, K.** (1995). Different sensitivity to wortmannin of two vacuolar sorting signals indicates the presence of distinct sorting machineries in tobacco cells. *J Cell Biol* **130**, 1307-1318.
- Mauriat, M., Sandberg, L.G., und Moritz, T.** (2011). Proper gibberellin localization in vascular tissue is required to control auxin-dependent leaf development and bud outgrowth in hybrid aspen. *Plant J*.
- McGinnis, K.M., Thomas, S.G., Soule, J.D., Strader, L.C., Zale, J.M., Sun, T.P., und Steber, C.M.** (2003). The *Arabidopsis* SLEEPY1 gene encodes a putative F-box subunit of an SCF E3 ubiquitin ligase. *Plant Cell* **15**, 1120-1130.
- Men, S., Boutte, Y., Ikeda, Y., Li, X., Palme, K., Stierhof, Y.D., Hartmann, M.A., Moritz, T., und Grebe, M.** (2008). Sterol-dependent endocytosis mediates post-cytokinetic acquisition of PIN2 auxin efflux carrier polarity. *Nat Cell Biol* **10**, 237-244.
- Monte, E., Tepperman, J.M., Al-Sady, B., Kaczorowski, K.A., Alonso, J.M., Ecker, J.R., Li, X., Zhang, Y., und Quail, P.H.** (2004). The phytochrome-interacting transcription factor, PIF3, acts early, selectively, and positively in light-induced chloroplast development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 16091-16098.
- Moore, I.** (2002). Gravitropism: Lateral Thinking in Auxin Transport. *Curr Biol* **12**, R452-R454.
- Moubayidin, L., Perilli, S., Dello Ioio, R., Di Mambro, R., Costantino, P., und Sabatini, S.** (2010). The rate of cell differentiation controls the *Arabidopsis* root meristem growth phase. *Curr Biol* **20**, 1138-1143.
- Müller, A., Guan, C., Galweiler, L., Tanzler, P., Huijser, P., Marchant, A., Parry, G., Bennett, M., Wisman, E., und Palme, K.** (1998). AtPIN2 defines a locus of *Arabidopsis* for root gravitropism control. *EMBO J* **17**, 6903-6911.
- Murase, K., Hirano, Y., Sun, T.P., und Hakoshima, T.** (2008). Gibberellin-induced DELLA recognition by the gibberellin receptor GID1. *Nature* **456**, 459-463.
- Nakajima, M., Shimada, A., Takashi, Y., Kim, Y.C., Park, S.H., Ueguchi-Tanaka, M., Suzuki, H., Katoh, E., Iuchi, S., Kobayashi, M., Maeda, T., Matsuoka, M., und Yamaguchi, I.** (2006). Identification and characterization of *Arabidopsis* gibberellin receptors. *Plant J* **46**, 880-889.
- Navarro, L., Bari, R., Achard, P., Lison, P., Nemri, A., Harberd, N.P., und Jones, J.D.** (2008). DELLAs control plant immune responses by modulating the balance of jasmonic acid and salicylic acid signaling. *Curr Biol* **18**, 650-655.
- Normanly, J.** (2010). Approaching cellular and molecular resolution of auxin biosynthesis and metabolism. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2**:a001594.
- O'Neill, D.P., und Ross, J.J.** (2002). Auxin regulation of the gibberellin pathway in pea. *Plant Physiol* **130**, 1974-1982.
- O'Neill, D.P., Davidson, S.E., Clarke, V.C., Yamauchi, Y., Yamaguchi, S., Kamiya, Y., Reid, J.B., und Ross, J.J.** (2010). Regulation of the gibberellin pathway by auxin and DELLA proteins. *Planta* **232**, 1141-1149.
- Oh, E., Kang, H., Yamaguchi, S., Park, J., Lee, D., Kamiya, Y., und Choi, G.** (2009). Genome-wide analysis of genes targeted by PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR 3-LIKE5 during seed germination in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **21**, 403-419.
- Okada, K., Ueda, J., Komaki, M.K., Bell, C.J., und Shimura, Y.** (1991). Requirement of the auxin polar transport system in early stages of *Arabidopsis* floral bud formation. *Plant Cell* **3**, 677-684.

- Ottenschläger, I., Wolff, P., Wolverton, C., Bhalerao, R.P., Sandberg, G., Ishikawa, H., Evans, M., und Palme, K. (2003). Gravity-regulated differential auxin transport from columella to lateral root cap cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 2987-2991.
- Paciorek, T., Zazimalova, E., Ruthardt, N., Petrásek, J., Stierhof, Y.D., Kleine-Vehn, J., Morris, D.A., Emans, N., Jürgens, G., Geldner, N., und Friml, J. (2005). Auxin inhibits endocytosis and promotes its own efflux from cells. *Nature* **435**, 1251-1256.
- Páli, T., Dixon, N., Kee, T.P., und Marsh, D. (2004). Incorporation of the V-ATPase inhibitors concanamycin and indole pentadiene in lipid membranes. Spin-label EPR studies. *Biochim Biophys Acta* **1663**, 14-18.
- Park, E., Kim, J., Lee, Y., Shin, J., Oh, E., Chung, W.I., Liu, J.R., und Choi, G. (2004). Degradation of PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR 3 in phytochrome-mediated light signaling. *Plant Cell Physiol* **45**, 968-975.
- Peng, J., Richards, D.E., Moritz, T., Cano-Delgado, A., und Harberd, N.P. (1999a). Extragenic suppressors of the Arabidopsis gai mutation alter the dose-response relationship of diverse gibberellin responses. *Plant Physiol* **119**, 1199-1208.
- Peng, J., Carol, P., Richards, D.E., King, K.E., Cowling, R.J., Murphy, G.P., und Harberd, N.P. (1997). The Arabidopsis GAI gene defines a signaling pathway that negatively regulates gibberellin responses. *Genes Dev* **11**, 3194-3205.
- Peng, J., Richards, D.E., Hartley, N.M., Murphy, G.P., Devos, K.M., Flintham, J.E., Beales, J., Fish, L.J., Worland, A.J., Pelica, F., Sudhakar, D., Christou, P., Snape, J.W., Gale, M.D., und Harberd, N.P. (1999b). 'Green revolution' genes encode mutant gibberellin response modulators. *Nature* **400**, 256-261.
- Peterson, S.V., Johansson, A.I., Kowalczyk, M., Makoveychuk, A., Wang, J.Y., Moritz, T., Grebe, M., Benfey, P.N., Sandberg, G., und Ljung, K. (2009). An auxin gradient and maximum in the Arabidopsis root apex shown by high-resolution cell-specific analysis of IAA distribution and synthesis. *Plant Cell* **21**, 1659-1668.
- Petrásek, J., Mravec, J., Bouchard, R., Blakeslee, J.J., Abas, M., Seifertova, D., Wisniewska, J., Tadele, Z., Kubes, M., Covanova, M., Dhonukshe, P., Skupa, P., Benková, E., Perry, L., Krecek, P., Lee, O.R., Fink, G.R., Geisler, M., Murphy, A.S., Luschnig, C., Zazimalova, E., und Friml, J. (2006). PIN proteins perform a rate-limiting function in cellular auxin efflux. *Science* **312**, 914-918.
- Piskurewicz, U., und Lopez-Molina, L. (2009). The GA-signaling repressor RGL3 represses testa rupture in response to changes in GA and ABA levels. *Plant Signal Behav* **4**, 63-65.
- Piskurewicz, U., Tureckova, V., Lacombe, E., und Lopez-Molina, L. (2009). Far-red light inhibits germination through DELLA-dependent stimulation of ABA synthesis and ABI3 activity. *EMBO J* **28**, 2259-2271.
- Piskurewicz, U., Jikumaru, Y., Kinoshita, N., Nambara, E., Kamiya, Y., und Lopez-Molina, L. (2008). The gibberellic acid signaling repressor RGL2 inhibits Arabidopsis seed germination by stimulating abscisic acid synthesis and ABI5 activity. *Plant Cell* **20**, 2729-2745.
- Pysh, L.D., Wysocka-Diller, J.W., Camilleri, C., Bouchez, D., und Benfey, P.N. (1999). The GRAS gene family in Arabidopsis: sequence characterization and basic expression analysis of the SCARECROW-LIKE genes. *Plant J* **18**, 111-119.
- Rademacher, W. (2000). Growth retardants: Effects on gibberellin biosynthesis and other metabolic pathways. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **51**, 501-531.
- Rakusova, H., Gallego-Bartolome, J., Vanstraelen, M., Robert, H.S., Alabadí, D., Blazquez, M.A., Benková, E., und Friml, J. (2011). Polarization of PIN3-dependent auxin transport for hypocotyl gravitropic response in Arabidopsis thaliana. *Plant J*.
- Raven, J.A. (1975). Transport of indoleacetic acid in plant cells in relation to pH and electrical potential gradients, and its significance for polar IAA transport. *New Phytol* **74**, 163-172.
- Raz, V., und Ecker, J.R. (1999). Regulation of differential growth in the apical hook of Arabidopsis. *Development* **126**, 3661-3668.
- Richards, D.E., King, K.E., Ait-Ali, T., und Harberd, N.P. (2001). How gibberellin regulates plant growth and development: A molecular genetic analysis of gibberellin signaling. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **52**, 67-88.
- Richter, R., Behringer, C., Müller, I.K., und Schwechheimer, C. (2010). The GATA-type transcription factors GNC and GNL/CGA1 repress gibberellin signaling downstream from DELLA proteins and PHYTOCHROME-INTERACTING FACTORS. *Genes Dev* **24**, 2093-2104.
- Robert, S., Kleine-Vehn, J., Barbez, E., Sauer, M., Paciorek, T., Baster, P., Vanneste, S., Zhang, J., Simon, S., Covanova, M., Hayashi, K., Dhonukshe, P., Yang, Z., Bednarek, S.Y., Jones, A.M., Luschnig, C., Aniento, F., Zazimalova, E., und Friml, J. (2010). ABP1 mediates auxin inhibition of clathrin-dependent endocytosis in Arabidopsis. *Cell* **143**, 111-121.

- Ross, J.J., O'Neill, D.P., Smith, J.J., Kerckhoffs, L.H., und Elliott, R.C.** (2000). Evidence that auxin promotes gibberellin A1 biosynthesis in pea. *Plant J* **21**, 547-552.
- Rubery, P.H., und Sheldrake, A.R.** (1973). Effect of pH and surface charge on cell uptake of auxin. *Nat New Biol* **244**, 285-288.
- Rubery, P.H., und Sheldrake, A.R.** (1974). Carrier-mediated auxin transport. *Planta* **118**, 101-121.
- Sabatini, S., Beis, D., Wolkenfelt, H., Murfett, J., Guilfoyle, T., Malamy, J., Benfey, P., Leyser, O., Bechtold, N., Weisbeek, P., und Scheres, B.** (1999). An auxin-dependent distal organizer of pattern and polarity in the Arabidopsis root. *Cell* **99**, 463-472.
- Sakai, T., Kagawa, T., Kasahara, M., Swartz, T.E., Christie, J.M., Briggs, W.R., Wada, M., und Okada, K.** (2001). Arabidopsis NPH1 and NPL1: blue light receptors that mediate both phototropism and chloroplast relocation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 6969-6974.
- Santner, A.A., und Watson, J.C.** (2006). The WAG1 and WAG2 protein kinases negatively regulate root waving in Arabidopsis. *Plant J* **45**, 752-764.
- Sasaki, A., Itoh, H., Gomi, K., Ueguchi-Tanaka, M., Ishiyama, K., Kobayashi, M., Jeong, D.H., An, G., Kitano, H., Ashikari, M., und Matsuoka, M.** (2003). Accumulation of phosphorylated repressor for gibberellin signaling in an F-box mutant. *Science* **299**, 1896-1898.
- Schwechheimer, C., und Willige, B.C.** (2009). Shedding light on gibberellic acid signalling. *Curr Opin Plant Biol* **12**, 57-62.
- Schwechheimer, C., Willige, B.C., Zourelidou, M., und Dohmann, E.M.** (2009). Examining protein stability and its relevance for plant growth and development. *Methods Mol Biol* **479**, 147-171.
- Scott, T.K., Case, D.B., und Jacobs, W.P.** (1967). Auxin-gibberellin interaction in apical dominance. *Plant Physiol* **42**, 1329-1333.
- Shen, H., Moon, J., und Huq, E.** (2005). PIF1 is regulated by light-mediated degradation through the ubiquitin-26S proteasome pathway to optimize photomorphogenesis of seedlings in Arabidopsis. *Plant J* **44**, 1023-1035.
- Shimada, A., Ueguchi-Tanaka, M., Sakamoto, T., Fujioka, S., Takatsuto, S., Yoshida, S., Sazuka, T., Ashikari, M., und Matsuoka, M.** (2006). The rice SPINDLY gene functions as a negative regulator of gibberellin signaling by controlling the suppressive function of the DELLA protein, SLR1, and modulating brassinosteroid synthesis. *Plant J* **48**, 390-402.
- Silverstone, A.L., Ciampaglio, C.N., und Sun, T.** (1998). The Arabidopsis RGA gene encodes a transcriptional regulator repressing the gibberellin signal transduction pathway. *Plant Cell* **10**, 155-169.
- Silverstone, A.L., Mak, P.Y., Martinez, E.C., und Sun, T.P.** (1997). The new RGA locus encodes a negative regulator of gibberellin response in Arabidopsis thaliana. *Genetics* **146**, 1087-1099.
- Silverstone, A.L., Jung, H.S., Dill, A., Kawaide, H., Kamiya, Y., und Sun, T.P.** (2001). Repressing a repressor: gibberellin-induced rapid reduction of the RGA protein in Arabidopsis. *Plant Cell* **13**, 1555-1566.
- Silverstone, A.L., Tseng, T.S., Swain, S.M., Dill, A., Jeong, S.Y., Olszewski, N.E., und Sun, T.P.** (2007). Functional analysis of SPINDLY in gibberellin signaling in Arabidopsis. *Plant Physiol* **143**, 987-1000.
- Singh, D.P., Filardo, F.F., Storey, R., Jermakow, A.M., Yamaguchi, S., und Swain, S.M.** (2010). Overexpression of a gibberellin inactivation gene alters seed development, KNOX gene expression, and plant development in Arabidopsis. *Physiologia Plantarum* **138**, 74-90.
- Snapp, E.L.** (2009). Fluorescent proteins: a cell biologist's user guide. *Trends Cell Biol* **19**, 649-655.
- Snyder, W.E.** (1949). Some responses of plants to 2,3,5-triiodobenzoic acid. *Plant Physiol* **24**, 195-206.
- Sorefan, K., Girin, T., Liljegren, S.J., Ljung, K., Robles, P., Galvan-Ampudia, C.S., Offringa, R., Friml, J., Yanofsky, M.F., und Ostergaard, L.** (2009). A regulated auxin minimum is required for seed dispersal in Arabidopsis. *Nature* **459**, 583-586.
- Sorefan, K., Booker, J., Haurogne, K., Goussot, M., Bainbridge, K., Foo, E., Chatfield, S., Ward, S., Beveridge, C., Rameau, C., und Leyser, O.** (2003). MAX4 and RMS1 are orthologous dioxygenase-like genes that regulate shoot branching in Arabidopsis and pea. *Genes Dev* **17**, 1469-1474.
- Steber, C.M., und McCourt, P.** (2001). A role for brassinosteroids in germination in Arabidopsis. *Plant Physiol* **125**, 763-769.
- Stepanova, A.N., Robertson-Hoyt, J., Yun, J., Benavente, L.M., Xie, D.Y., Dolezal, K., Schlereth, A., Jürgens, G., und Alonso, J.M.** (2008). TAA1-mediated auxin biosynthesis is essential for hormone crosstalk and plant development. *Cell* **133**, 177-191.

- Strader, L.C., Ritchie, S., Soule, J.D., McGinnis, K.M., und Steber, C.M.** (2004). Recessive-interfering mutations in the gibberellin signaling gene *SLEEPY1* are rescued by overexpression of its homologue, *SNEEZY*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 12771-12776.
- Studier, F.W., und Moffatt, B.A.** (1986). Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol* **189**, 113-130.
- Sun, F., Zhang, W., Hu, H., Li, B., Wang, Y., Zhao, Y., Li, K., Liu, M., und Li, X.** (2008). Salt modulates gravity signaling pathway to regulate growth direction of primary roots in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **146**, 178-188.
- Sun, J., Chen, Q., Qi, L., Jiang, H., Li, S., Xu, Y., Liu, F., Zhou, W., Pan, J., Li, X., Palme, K., und Li, C.** (2011). Jasmonate modulates endocytosis and plasma membrane accumulation of the *Arabidopsis* PIN2 protein. *New Phytol* **191**, 360-375.
- Sun, T.P., und Kamiya, Y.** (1994). The *Arabidopsis* GA1 locus encodes the cyclase ent-kaurene synthetase A of gibberellin biosynthesis. *Plant Cell* **6**, 1509-1518.
- Suzuki, H., Park, S.H., Okubo, K., Kitamura, J., Ueguchi-Tanaka, M., Iuchi, S., Katoh, E., Kobayashi, M., Yamaguchi, I., Matsuoka, M., Asami, T., und Nakajima, M.** (2009). Differential expression and affinities of *Arabidopsis* gibberellin receptors can explain variation in phenotypes of multiple knock-out mutants. *Plant J* **60**, 48-55.
- Swarup, K., Benková, E., Swarup, R., Casimiro, I., Peret, B., Yang, Y., Parry, G., Nielsen, E., De Smet, I., Vanneste, S., Levesque, M.P., Carrier, D., James, N., Calvo, V., Ljung, K., Kramer, E., Roberts, R., Graham, N., Marillonnet, S., Patel, K., Jones, J.D., Taylor, C.G., Schachtman, D.P., May, S., Sandberg, G., Benfey, P., Friml, J., Kerr, I., Beeckman, T., Laplaze, L., und Bennett, M.J.** (2008). The auxin influx carrier LAX3 promotes lateral root emergence. *Nat Cell Biol* **10**, 946-954.
- Swarup, R., Kargul, J., Marchant, A., Zadik, D., Rahman, A., Mills, R., Yemm, A., May, S., Williams, L., Millner, P., Tsurumi, S., Moore, I., Napier, R., Kerr, I.D., und Bennett, M.J.** (2004). Structure-function analysis of the presumptive *Arabidopsis* auxin permease AUX1. *Plant Cell* **16**, 3069-3083.
- Talon, M., Koornneef, M., und Zeevaart, J.A.D.** (1990). Accumulation of C19-gibberellins in the gibberellin-insensitive dwarf mutant *gai* of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Planta* **182**, 501-505.
- Tan, X., Calderon-Villalobos, L.I., Sharon, M., Zheng, C., Robinson, C.V., Estelle, M., und Zheng, N.** (2007). Mechanism of auxin perception by the TIR1 ubiquitin ligase. *Nature* **446**, 640-645.
- Terasaka, K., Blakeslee, J.J., Titapiwatanakun, B., Peer, W.A., Bandyopadhyay, A., Makam, S.N., Lee, O.R., Richards, E.L., Murphy, A.S., Sato, F., und Yazaki, K.** (2005). PGP4, an ATP binding cassette P-glycoprotein, catalyzes auxin transport in *Arabidopsis thaliana* roots. *Plant Cell* **17**, 2922-2939.
- Thimann, K.V., und Skoog, F.** (1933). Studies on the growth hormone of plants: III. The inhibiting action of the growth substance on bud development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **19**, 714-716.
- Thomson, K.S., Hertel, R., Müller, S., und Tavares, J.** (1973). 1-N-naphthylphthalamic acid and 2,3,5-triiodobenzoic acid. *Planta* **109**, 337-352.
- Tyler, L., Thomas, S.G., Hu, J., Dill, A., Alonso, J.M., Ecker, J.R., und Sun, T.P.** (2004). DELLA proteins and gibberellin-regulated seed germination and floral development in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **135**, 1008-1019.
- Ubeda-Tomás, S., Federici, F., Casimiro, I., Beemster, G.T., Bhalerao, R., Swarup, R., Doerner, P., Haseloff, J., und Bennett, M.J.** (2009). Gibberellin signaling in the endodermis controls *Arabidopsis* root meristem size. *Curr Biol* **19**, 1194-1199.
- Ueguchi-Tanaka, M., Hirano, K., Hasegawa, Y., Kitano, H., und Matsuoka, M.** (2008). Release of the repressive activity of rice DELLA protein SLR1 by gibberellin does not require SLR1 degradation in the *gid2* mutant. *Plant Cell* **20**, 2437-2446.
- Ueguchi-Tanaka, M., Ashikari, M., Nakajima, M., Itoh, H., Katoh, E., Kobayashi, M., Chow, T.Y., Hsing, Y.I., Kitano, H., Yamaguchi, I., und Matsuoka, M.** (2005). GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF1 encodes a soluble receptor for gibberellin. *Nature* **437**, 693-698.
- Ulmasov, T., Hagen, G., und Guilfoyle, T.J.** (1997a). ARF1, a transcription factor that binds to auxin response elements. *Science* **276**, 1865-1868.
- Ulmasov, T., Murfett, J., Hagen, G., und Guilfoyle, T.J.** (1997b). Aux/IAA proteins repress expression of reporter genes containing natural and highly active synthetic auxin response elements. *Plant Cell* **9**, 1963-1971.
- Umehara, M., Hanada, A., Yoshida, S., Akiyama, K., Arite, T., Takeda-Kamiya, N., Magome, H., Kamiya, Y., Shirasu, K., Yoneyama, K., Kozuka, J., und Yamaguchi, S.** (2008). Inhibition of shoot branching by new terpenoid plant hormones. *Nature* **455**, 195-200.

- Vandenbussche, F., Petrásek, J., Zadnikova, P., Hoyerova, K., Pesek, B., Raz, V., Swarup, R., Bennett, M., Zazimalova, E., Benková, E., und Van Der Straeten, D. (2010). The auxin influx carriers AUX1 and LAX3 are involved in auxin-ethylene interactions during apical hook development in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Development* **137**, 597-606.
- Vernoux, T., Brunoud, G., Farcot, E., Morin, V., Van den Daele, H., Legrand, J., Oliva, M., Das, P., Larrieu, A., Wells, D., Guédon, Y., Armitage, L., Picard, F., Guyomarc'h, S., Cellier, C., Parry, G., Koumproglou, R., Doonan, J.H., Estelle, M., Godin, C., Kepinski, S., Bennett, M., De Veylder, L., und Traas, J. (2011). The auxin signalling network translates dynamic input into robust patterning at the shoot apex. *Mol Syst Biol* **7**:508.
- Vieten, A., Vanneste, S., Wisniewska, J., Benková, E., Benjamins, R., Beckman, T., Luschnig, C., und Friml, J. (2005). Functional redundancy of PIN proteins is accompanied by auxin-dependent cross-regulation of PIN expression. *Development* **132**, 4521-4531.
- Vriezen, W.H., Achard, P., Harberd, N.P., und Van Der Straeten, D. (2004). Ethylene-mediated enhancement of apical hook formation in etiolated *Arabidopsis thaliana* seedlings is gibberellin dependent. *Plant J* **37**, 505-516.
- Weller, J.L., Hecht, V., Vander Schoor, J.K., Davidson, S.E., und Ross, J.J. (2009). Light regulation of gibberellin biosynthesis in pea is mediated through the COP1/HY5 pathway. *Plant Cell* **21**, 800-813.
- Wen, C.K., und Chang, C. (2002). *Arabidopsis* RGL1 encodes a negative regulator of gibberellin responses. *Plant Cell* **14**, 87-100.
- Willige, B.C., Isono, E., Richter, R., Zourelidou, M., und Schwechheimer, C. (2011). Gibberellin regulates PIN-FORMED abundance and is required for auxin transport-dependent growth and development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* **23**, 2184-2195.
- Willige, B.C., Ghosh, S., Nill, C., Zourelidou, M., Dohmann, E.M., Maier, A., und Schwechheimer, C. (2007). The DELLA domain of GA INSENSITIVE mediates the interaction with the GA INSENSITIVE DWARF1A gibberellin receptor of *Arabidopsis*. *Plant Cell* **19**, 1209-1220.
- Wilson, R.N., und Somerville, C.R. (1995). Phenotypic suppression of the GIBBERELLIN-INSENSITIVE mutant (*gai*) of *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **108**, 495-502.
- Won, S.K., Lee, Y.J., Lee, H.Y., Heo, Y.K., Cho, M., und Cho, H.T. (2009). Cis-element- and transcriptome-based screening of root hair-specific genes and their functional characterization in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **150**, 1459-1473.
- Wu, G., Cameron, J.N., Ljung, K., und Spalding, E.P. (2010). A role for ABCB19-mediated polar auxin transport in seedling photomorphogenesis mediated by cryptochrome 1 and phytochrome B. *Plant J* **62**, 179-191.
- Xu, T., Wen, M., Nagawa, S., Fu, Y., Chen, J.G., Wu, M.J., Perrot-Rechenmann, C., Friml, J., Jones, A.M., und Yang, Z. (2010). Cell surface- and rho GTPase-based auxin signaling controls cellular interdigitation in *Arabidopsis*. *Cell* **143**, 99-110.
- Yamaguchi, N., Suzuki, M., Fukaki, H., Morita-Terao, M., Tasaka, M., und Komeda, Y. (2007). CRM1/BIG-mediated auxin action regulates *Arabidopsis* inflorescence development. *Plant Cell Physiol* **48**, 1275-1290.
- Yang, H., und Murphy, A.S. (2009). Functional expression and characterization of *Arabidopsis* ABCB, AUX 1 and PIN auxin transporters in *Schizosaccharomyces pombe*. *Plant J* **59**, 179-191.
- Yang, Y., Hammes, U.Z., Taylor, C.G., Schachtman, D.P., und Nielsen, E. (2006). High-affinity auxin transport by the AUX1 influx carrier protein. *Curr Biol* **16**, 1123-1127.
- Yeang, H.Y., und Hillman, J.R. (1982). Lateral bud growth in *Phaseolus vulgaris* L. and the levels of ethylene in the bud and adjacent tissue. *J Exp Bot* **33**, 111-117.
- Yewdell, J.W., Lacsina, J.R., Rechsteiner, M.C., und Nicchitta, C.V. (2011). Out with the old, in with the new? Comparing methods for measuring protein degradation. *Cell Biol Int* **35**, 457-462.
- Yin, X.J., Volk, S., Ljung, K., Mehlmer, N., Dolezal, K., Ditengou, F., Hanano, S., Davis, S.J., Schmelzer, E., Sandberg, G., Teige, M., Palme, K., Pickart, C., und Bachmair, A. (2007). Ubiquitin lysine 63 chain forming ligases regulate apical dominance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **19**, 1898-1911.
- Yu, H., Ito, T., Zhao, Y., Peng, J., Kumar, P., und Meyerowitz, E.M. (2004). Floral homeotic genes are targets of gibberellin signaling in flower development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 7827-7832.
- Zadnikova, P., Petrásek, J., Marhavy, P., Raz, V., Vandenbussche, F., Ding, Z., Schwarzerova, K., Morita, M.T., Tasaka, M., Hejatko, J., Van Der Straeten, D., Friml, J., und Benková, E. (2010). Role of PIN-mediated auxin efflux in apical hook development of *Arabidopsis thaliana*. *Development* **137**, 607-617.

- Zentella, R., Zhang, Z.L., Park, M., Thomas, S.G., Endo, A., Murase, K., Fleet, C.M., Jikumaru, Y., Nambara, E., Kamiya, Y., und Sun, T.P.** (2007). Global analysis of della direct targets in early gibberellin signaling in Arabidopsis. *Plant Cell* **19**, 3037-3057.
- Zhang, Y., He, J., und McCormick, S.** (2009). Two Arabidopsis AGC kinases are critical for the polarized growth of pollen tubes. *Plant J* **58**, 474-484.
- Zhang, Z.L., Ogawa, M., Fleet, C.M., Zentella, R., Hu, J., Heo, J.O., Lim, J., Kamiya, Y., Yamaguchi, S., und Sun, T.P.** (2011). SCARECROW-LIKE 3 promotes gibberellin signaling by antagonizing master growth repressor DELLA in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 2160-2165.
- Zhao, Y., Dai, X., Blackwell, H.E., Schreiber, S.L., und Chory, J.** (2003). SIR1, an upstream component in auxin signaling identified by chemical genetics. *Science* **301**, 1107-1110.
- Zourelidou, M., Müller, I., Willige, B.C., Nill, C., Jikumaru, Y., Li, H., und Schwechheimer, C.** (2009). The polarly localized D6 PROTEIN KINASE is required for efficient auxin transport in Arabidopsis thaliana. *Development* **136**, 627-636.

Danksagung

Zu allererst möchte ich mich bei Prof. Dr. Claus Schwechheimer sowohl für die Betreuung meiner Arbeit als auch für die Auswahl der Forschungsprojekte bedanken. Auch gilt mein Dank all seinen Ideen, die in meine Experimente einfließen.

Weiter danke ich Prof. Dr. Hückelhoven und Prof. Dr. Liebl dafür, dass sie sich dazu bereit erklärten, die Prüfungskommission zu bilden.

Bei Erika, Melina und René möchte ich mich sehr dafür bedanken, dass sie mir viele der durch sie im Labor etablierten Methoden beibrachten. Außerdem bedanke ich mich bei Erika für die super Rezepte (oishi!!!), bei Melina für ihre nette Art und bei René für unser Fachsimpeln und unsere N₂-Gespräche.

Anthi, Inês und Quirin danke ich nicht nur für ihre Hilfsbereitschaft, sondern auch sehr für ihre gute Laune und fröhliche Art.

Isabel danke ich nicht nur für die Einführung in die konfokale Mikroskopie, sondern auch ganz doll dafür, dass sie mir in den ersten Monaten in Freising ein Dach über dem Kopf zur Verfügung stellte.

Unserer ehemaligen TA Carola möchte ich sehr für ihre super Vorarbeit für das GID1-Projekt danken. Unserer jetzigen TA Jutta gilt mein großer Dank für ihre Unterstützung beim Genotypisieren und Samen ausplattieren.

Franzi, Deborah, Siv, Petra, Jana, Carina, Monika und Julia gilt mein Dank für ihre Hilfsbereitschaft und die leckeren Kuchen. Den vier letztgenannten gilt ebenfalls mein Dank dafür, dass sie mein Deutschlandfunk Hören tolerierten und Franzi danke ich noch für ihr freisinger Insiderwissen.

All den kleinen Arabidopsiskeimlingen danke ich dafür, dass sie sich absolut freiwillig in den Dienst der Wissenschaft stellten.

Balaji danke ich dafür, dass er einfach ein so verdammt netter Kerl ist.

Meinem Cousinchen gilt mein Dank, da er für mich da ist, wenn ich ihn brauche.

Mein riesiger Dank gilt Melanie. Durch ihre Adleraugen und ihr gewissenhaftes Korrekturlesen hat sie einen entscheidenden Beitrag für die Qualität dieser Arbeit geleistet. Auch danke ich ihr sehr dafür, dass sie mich auf dem Weg zu meinem Ziel begleitete und mir so half, die Hürden dieser Arbeit zu nehmen, und dafür, dass sie mein Leben u.a. durch das Fördern meines Interesses an vielen Wissenschaften und Wissenswertem bereichert hat.

The DELLA Domain of GA INSENSITIVE Mediates the Interaction with the GA INSENSITIVE DWARF1A Gibberellin Receptor of *Arabidopsis* ^W

Björn C. Willige, Soumya Ghosh, Carola Nill, Melina Zourelidou, Esther M.N. Dohmann, Andreas Maier, and Claus Schwechheimer¹

Department of Developmental Genetics, Center for Plant Molecular Biology, Tübingen University, 72076 Tübingen, Germany

Gibberellic acid (GA) promotes seed germination, elongation growth, and flowering time in plants. GA responses are repressed by DELLA proteins, which contain an N-terminal DELLA domain essential for GA-dependent proteasomal degradation of DELLA repressors. Mutations of or within the DELLA domain of DELLA repressors have been described for species including *Arabidopsis thaliana*, wheat (*Triticum aestivum*), maize (*Zea mays*), and barley (*Hordeum vulgare*), and we show that these mutations confer GA insensitivity when introduced into the *Arabidopsis* GA INSENSITIVE (GAI) DELLA repressor. We also demonstrate that *Arabidopsis* mutants lacking the three GA INSENSITIVE DWARF1 (GID1) GA receptor genes are GA insensitive with respect to GA-promoted growth responses, GA-promoted DELLA repressor degradation, and GA-regulated gene expression. Our genetic interaction studies indicate that GAI and its close homolog REPRESSOR OF *gai*-3 are the major growth repressors in a GA receptor mutant background. We further demonstrate that the GA insensitivity of the GAI DELLA domain mutants is explained in all cases by the inability of the mutant proteins to interact with the GID1A GA receptor. Since we found that the GAI DELLA domain alone can mediate GA-dependent GID1A interactions, we propose that the DELLA domain functions as a receiver domain for activated GA receptors.

INTRODUCTION

The phytohormone gibberellic acid (GA) promotes important processes of plant growth and development, such as seed germination, elongation growth, and flowering time (Richards et al., 2001). The GA signaling pathway is controlled by the DELLA repressors, which are characterized by their N-terminal DELLA domain (Pysh et al., 1999). The *Arabidopsis thaliana* genome encodes five highly homologous DELLA protein repressors, including GA INSENSITIVE (GAI) and REPRESSOR OF *gai*-3 (RGA) (Peng et al., 1997; Silverstone et al., 1998; Richards et al., 2001). While GAI and RGA have overlapping functions as repressors of elongation growth, RGA-LIKE1 (RGL1) and RGL2 play a predominant role in controlling germination and floral development, respectively (Dill and Sun, 2001; King et al., 2001; Lee et al., 2002; Cheng et al., 2004; Tyler et al., 2004). The DELLA repressors are inactivated in response to GA by ubiquitin proteasome-dependent protein degradation (Silverstone et al., 2001; Fu et al., 2002; McGinnis et al., 2003; Sasaki et al., 2003). A 17-amino acid deletion in the conserved DELLA domain, which is the mutation present in the dominant *Arabidopsis gai*-1 mutant, renders mutant *gai* and *rga* proteins insensitive to GA induced

proteolysis, and plants expressing these mutant DELLA repressors are GA-insensitive, dark-green, late-flowering dwarfs (Peng and Harberd, 1997; Dill and Sun, 2001; Silverstone et al., 2001; Fleck and Harberd, 2002; Itoh et al., 2002; Dill et al., 2004). Interestingly, mutations in and of the DELLA domain were also identified in dwarfing alleles of the DELLA repressors Reduced height1 (Rht1) from wheat (*Triticum aestivum*), dwarf8 (d8) from maize (*Zea mays*), and Slender1 (Sln1) from barley (*Hordeum vulgare*), and these mutations were hypothesized to be the molecular cause for the GA insensitivity of the respective alleles (Gale and Marshall, 1976; Peng et al., 1999b; Chandler et al., 2002). In line with this hypothesis, it was demonstrated in the case of the barley Sln1D allele that the SLN1 protein produced by this mutant is partially impaired in GA-dependent SLN1 degradation (Gubler et al., 2002). Conversely, the understanding of the molecular mechanism underlying the dwarfing phenotypes of the wheat Rht1 alleles is not understood but of particular importance since their use in breeding permitted to generate the lodging-resistant high-yield wheat varieties of the so-called green revolution (Gale and Marshall, 1973, 1976; Peng et al., 1999b).

In *Arabidopsis*, the GA-dependent degradation of GAI and RGA is promoted by the F-box protein SLEEPY1 (SLY1), which functions as the degradation substrate receptor subunit of the E3 ubiquitin ligase SCF^{SLY1}. *sly1* mutants fail to degrade GAI and RGA, and the *sly1* mutant phenotype is suppressed by *gai* and *rga* loss-of-function alleles. SLY1 interacts in the yeast two-hybrid system with GAI and RGA, and the *gai*-1 gain-of-function phenotype is suppressed by *sly1* gain-of-function alleles with increased affinity for the DELLA repressors (Peng et al., 1999a; Dill et al., 2004; Fu et al., 2004; Tyler et al., 2004). The SLY1

¹ To whom correspondence should be addressed. E-mail claus.schwechheimer@zmbp.uni-tuebingen.de; fax 49-7071-295135.

The author responsible for distribution of materials integral to the findings presented in this article in accordance with the policy described in the Instructions for Authors (www.plantcell.org) is: Claus Schwechheimer (claus.schwechheimer@zmbp.uni-tuebingen.de).

^W Online version contains Web-only data.

www.plantcell.org/cgi/doi/10.1105/tpc.107.051441

DELLA protein interaction also occurs when the DELLA domain is deleted. Thus, the possibility that the DELLA domain serves as an interaction domain for SLY1 has been excluded.

The identification of the GA INSENSITIVE DWARF1 (GID1) proteins as soluble GA receptors in rice (*Oryza sativa*) and *Arabidopsis* was a major breakthrough in the understanding of GA signaling (Ueguchi-Tanaka et al., 2005; Nakajima et al., 2006). In rice and *Arabidopsis*, the analysis of GID1 proteins revealed that these GA receptors interact in a GA-dependent manner with the DELLA proteins from the respective species (Ueguchi-Tanaka et al., 2005; Nakajima et al., 2006). A recent study shows that loss of the three *Arabidopsis* GID1 receptors results in GA insensitivity and that the N-terminal DELLA and VHYNP domains of the DELLA protein RGA are required for GID1 interactions in *Arabidopsis* (Griffiths et al., 2006).

As introduced above, several DELLA domain mutations have been described that result in GA-insensitive growth in different plant species. In most cases, the consequences of these mutations on DELLA protein behavior had not been tested at the molecular level, and how these mutations affect GA signaling remained to be addressed. In this article, we characterize plants expressing *gai* variants with DELLA domain mutations that had previously been identified in DELLA repressors from maize, wheat, and barley. In all cases examined, these mutations result in GA-insensitive plant growth and a stabilization of the mutant *gai* proteins. Consistent with a recently published report, we also found that all three *Arabidopsis* GID1 genes participate in GA responses, and we extend this analysis by showing that the growth repression of the GA receptor mutants is largely caused by GAI and RGA. Finally, we show that the GAI DELLA domain is required and sufficient for interactions with the *Arabidopsis* GA receptor protein GID1A. We therefore conclude that the DELLA domain serves as a receiver domain for activated GID1 GA receptors.

RESULTS

DELLA Domain Mutations Impair GA-Promoted Protein Degradation and Plant Growth

The dominant GA-insensitive *Arabidopsis gai-1* mutant expresses a mutant *gai* protein with a 17–amino acid deletion of the highly conserved N-terminal DELLA domain (Peng et al., 1997). Following the identification of the DELLA domain deletion in *Arabidopsis gai-1*, DELLA domain mutations were also identified in dwarfing alleles of DELLA repressor genes from several crop species, including wheat, maize, and barley (Gale and Marshall, 1976; Peng et al., 1999b; Chandler et al., 2002). Based on the apparent importance of the DELLA domain for GA-induced DELLA protein degradation, it was hypothesized (but with the exception of the barley protein never shown) that these mutations lead to a stabilization of the respective DELLA proteins (Dill et al., 2001; Gubler et al., 2002). Interestingly, there is no obvious correlation between the extent of growth repression conferred by the different DELLA mutations and their expected severity. For example, while a 5–amino acid deletion in the DELLA domain seems to be responsible for extreme dwarfism in D8-1 mutant maize, a predicted large truncation of the protein's N terminus,

including the DELLA domain and the neighboring VHYNP domain, suppresses plant growth only moderately in maize D8-Mp1 mutants (see Supplemental Figure 1A online) (Harberd and Freeling, 1989; Winkler and Freeling, 1994; Peng et al., 1999b). This gives rise to the hypotheses that either the nature of the DELLA domain mutations or the specific genetic backgrounds determine the severity conferred by these mutations.

We wanted to study the effect of the different DELLA domain mutations in a homogenous genetic background. To this end, we generated transgenic *Arabidopsis* plants that contain genomic fragments for the expression of wild-type *Arabidopsis* GAI or GAI variants carrying DELLA domain mutations reported for the dwarfing alleles from *Arabidopsis gai-1*, maize D8-1 and D8-Mp1, wheat Rht-B1b and Rht-D1b, and barley SlN1D (Figures 1A and 1B) (Peng et al., 1997, 1999b; Chandler et al., 2002; Gubler et al., 2002). For each construct, at least 10 transgenic lines were generated, and eight lines were analyzed at the biochemical and physiological level. While endogenous wild-type GAI and wild-type GAI expressed from the GAI:GAI transgene is efficiently degraded in response to GA, we found that the mutant *gai* proteins are fully stabilized in lines expressing variants with a partial or full deletion of the DELLA domain (GAI:*gai* and *gai-1*, GAI:D8-1, GAI:Rht, and GAI:D8-MP) (Figure 1C). In agreement with the previously reported observation that the SLN1D protein from barley is still partially GA sensitive, GAI:SlN1D plants, producing a GAI variant with a single amino acid substitution in the DELLA domain, express a partially stabilized *gai* mutant protein (Figure 1C) (Gubler et al., 2002).

In all cases, the degree of GAI stabilization correlates well with the level of growth suppression in the transgenic lines. All transgenic plants expressing fully stabilized GAI variants are GA-insensitive, dark-green, late-flowering dwarfs that are phenotypically indistinguishable from the *Arabidopsis gai-1* mutant (Figure 1D; see Supplemental Figures 1B and 3 online). Again in agreement with the previously reported observation that the SlN1D allele from barley is still partially GA sensitive, we observed a partial reduction of elongation growth and a delay in the onset of flowering in GAI:SlN1D lines that was significantly less severe than that observed in lines expressing fully stabilized mutant *gai* proteins (Figure 1D).

When we examined the consequences of GAI stabilization on RGA protein accumulation, we noticed that RGA protein levels are strongly reduced in all lines expressing stabilized GAI variants (Figure 1C). Since GA-insensitive mutants, such as *gai-1*, were reported to contain increased levels of GA (Peng and Harberd, 1997), we reasoned that increased GA-promoted RGA degradation may be responsible for this effect. Indeed, when we treated plants expressing stabilized GAI variants with the GA biosynthesis inhibitor paclobutrazol (PAC), RGA protein levels increased, suggesting that GA levels regulate DELLA repressor abundance, at least in part, by promoting their degradation (see Supplemental Figure 2B online). In summary, we conclude that partial or full deletions of the DELLA domain, as previously reported for dwarfing alleles of several crop species, cause (when introduced into *Arabidopsis* GAI) GA insensitivity with respect to GA-promoted protein degradation and GA-promoted plant growth. Hence, the differences in the severity of dwarfing mutations, such as the D8-1 and D8-Mp mutations from maize, may be attributable to differences in the genetic background of these alleles.

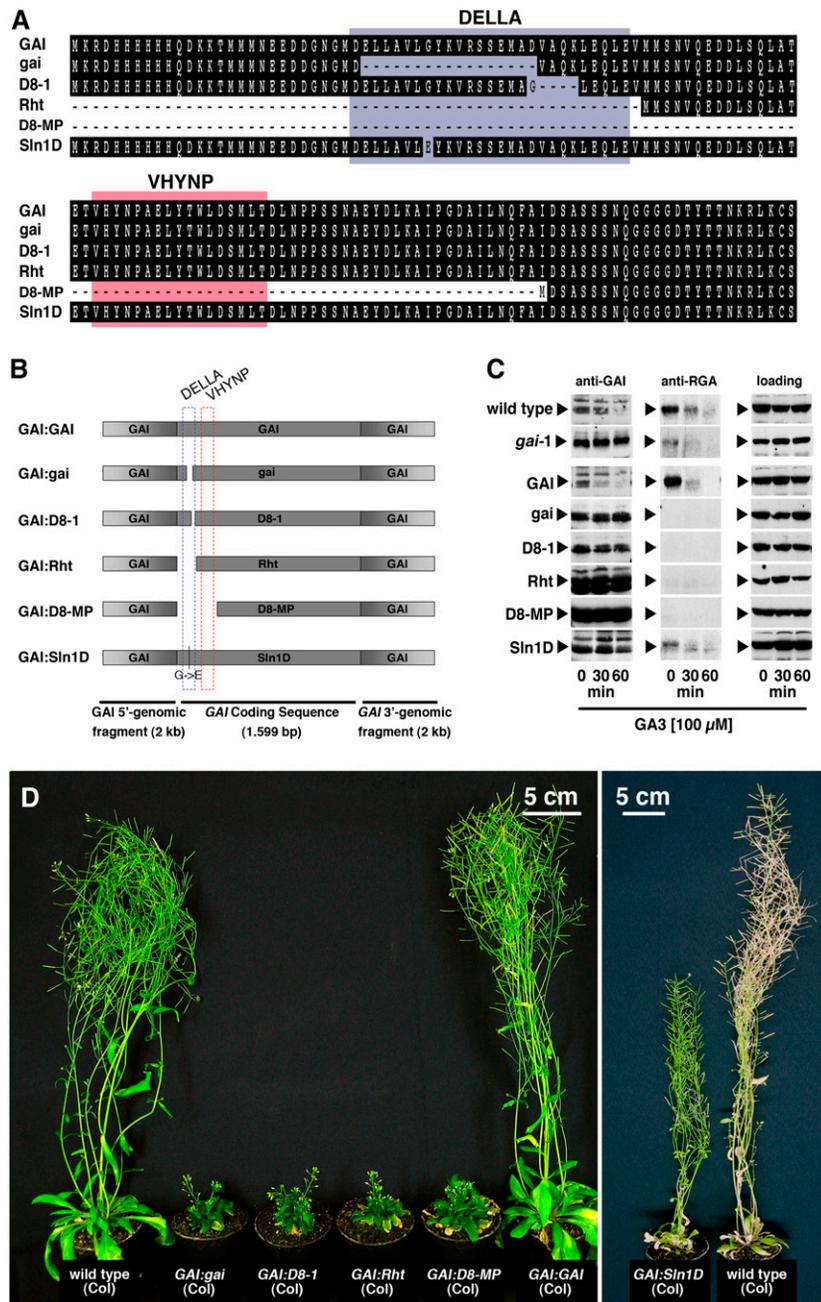


Figure 1. Physiologically Relevant DELLA Domain Mutations Stabilize GAI.

(A) Clustal alignment of the N-terminal 140–amino acid residues of *Arabidopsis* GAI and *gai* mutant variants that were designed based on the mutations identified in *Arabidopsis* *gai-1*, maize D8-1 and D8-MP, wheat Rht-B1b/D1b (Rht), and barley Sin1D alleles (see Supplemental Figure 1A online for a detailed alignment).

(B) Schematic representation of the GAI-derived transgenes carrying the mutations shown in **(A)**. The mutations in the *GAI* coding sequence, but not the flanking 5'- and 3'-*GAI* genomic regions, are drawn to scale.

(C) Immunoblots with specific anti-GAI and anti-RGA antibodies (see Supplemental Figure 2 online) using 45 μ g of protein extract from GA-treated inflorescences of wild-type, *gai-1* mutant, and transgenic plants. A cross-reacting band serves as a loading control.

(D) Wild-type and transgenic 7.5-week-old (left panel) and 8.5-week-old (right panel) *Arabidopsis* plants.

The Three *Arabidopsis* *GID1* Genes Participate in GA Responses

The biological role of the three apparent *Arabidopsis* homologs (*GID1A*, AT3G05120; *GID1b*, AT3G63010; and *GID1c*, At5G27320) of the rice GA receptor *GID1* was recently determined, and it was found that the three *GID1* genes have redundant functions in mediating GA responses (Griffiths et al., 2006).

We also analyzed GA responses in T-DNA insertion mutants for each of the three *Arabidopsis* *GID1* genes (Figure 2A). For our analysis, we selected three mutant alleles with in-gene in-exon T-DNA insertions, namely, *gid1a-1*, *gid1b-1*, and *gid1c-2*. Our gene and allele nomenclature is identical to the one used in the previous publications of these genes (Griffiths et al., 2006; Nakajima et al., 2006), and with the exception of the *gid1c-2*

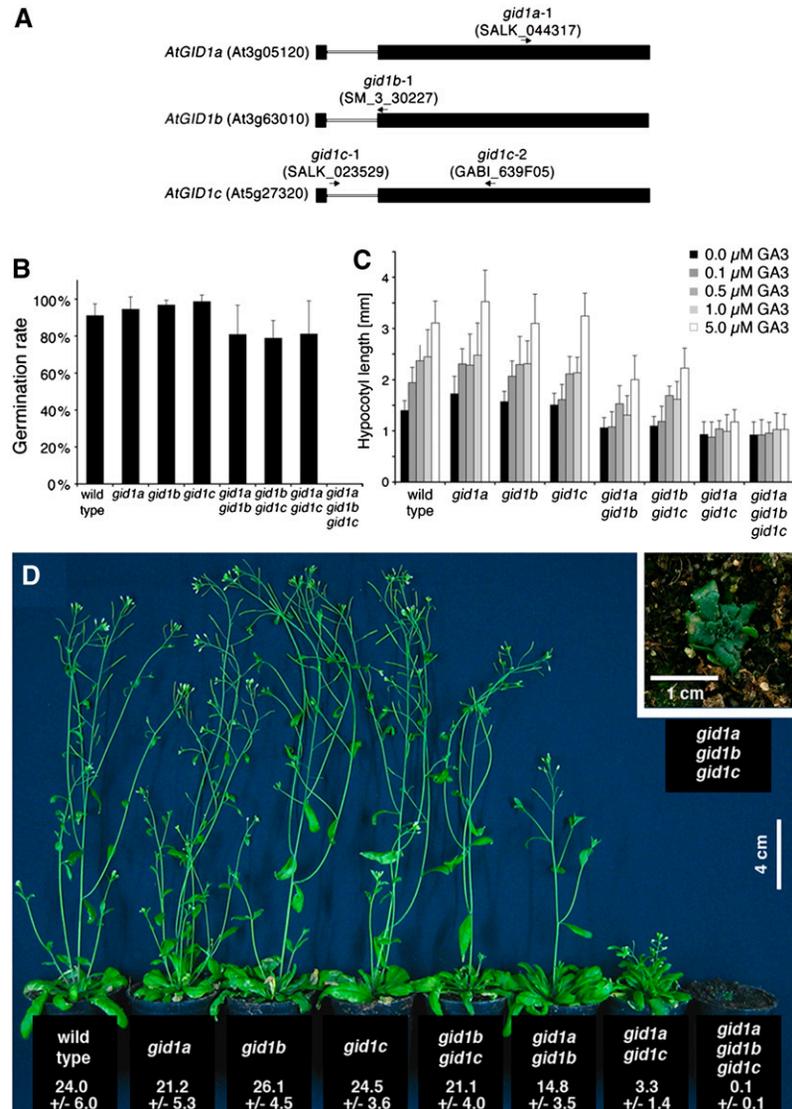


Figure 2. Loss of *Arabidopsis* *GID1* GA Receptor Function Results in GA Insensitivity.

(A) Schematic representation of the genomic organization of the three *Arabidopsis* *GID1* orthologs *GID1A* to *GID1C*. Exons are shown as black boxes and introns as lines. The positions of T-DNA insertions and the names of the *gid1* mutant alleles are indicated by arrows.

(B) Seed germination rate after 4 d as evaluated by root emergence of the *gid1a-1*, *gid1b-1*, and *gid1c-2* alleles and their double and triple mutant combinations ($n \geq 100$). In the case of the *gid1* triple mutant, germination rate was calculated based on the germination rate of a homozygous *gid1a gid1b* double mutant segregating for the *gid1c* mutation.

(C) Hypocotyl elongation in response to GA measured from 5-d-old seedlings grown on GA3-containing media as indicated. The *gid1* triple mutant seedlings used in this experiment were manually removed from the seed coat ($n \geq 10$).

(D) Phenotype of 4-week-old *gid1* mutants as indicated in the panel. The average and SD of the height of 4-week-old *gid1* mutants is indicated below the genotypes ($n \geq 8$).

allele used in our study, identical mutant alleles were used for physiological analysis and genetic experiments. We found that while single mutants of each of the three *GID1* genes do not have obvious defects in GA-controlled growth responses, such as germination, GA-induced hypocotyl elongation, elongation growth, or flowering time, *gid1* double and triple mutants are partially (double mutants) or fully (triple mutants) impaired in these responses (Figures 2B to 2D). Therefore, our *gid1* triple mutants display a complete suppression of GA responses and are phenotypically indistinguishable from severe GA biosynthesis mutants, such as *ga1-3*, in that they fail to germinate and, after manual removal of the seed coat, develop into dark-green severely dwarfed plants with a maximum rosette diameter of 1 cm (Figures 2B to 2D). In contrast with *ga1-3*, which is the most severe GA biosynthesis mutant described in the literature (Koorneef and van der Veen, 1980), and in contrast with the *gid1* triple mutant described in a recent publication (Griffiths et al., 2006), our *gid1* triple mutants never flower even in long-day conditions (8 h dark/16 h light), continuous light conditions, or when treated with GA3 (see Supplemental Figure 4 online). This difference in phenotype severity may be attributable to the fact that we used the allele *gid1c-2* to generate the *gid1a-1 gid1b-2 gid1c-2* triple mutant, whereas the above-mentioned report (Griffiths et al., 2006) made use of the allele *gid1c-1*. The T-DNA insertion of the *gid1c-2* mutation (GABI_639F05) resides in the second exon of the *GID1c* gene, and this mutation may affect gene function more severely than the T-DNA insertion in *gid1c-1* (SALK_023529), which is located in the *GID1c* intron (Figure 2A). Taken together, based on our genetic analyses and the biochemical analyses conducted by others (Griffiths et al., 2006; Nakajima et al., 2006), we conclude that the three *Arabidopsis* GID1 proteins have redundant functions as GA receptors and that *gid1* triple mutants are insensitive to GA.

***gid1* Mutants Are GA Insensitive with Respect to GA-Promoted DELLA Protein Degradation and GA-Controlled Transcriptional Responses**

To examine whether the GA insensitivity observed in the *gid1* triple mutant correlates with DELLA repressor stabilization, we tested RGA and GAI abundance in the *gid1* mutants (Figure 3A). Interestingly, neither the *gid1* single mutants nor the *gid1* double mutants showed the increase in DELLA protein levels expected for mutants impaired in GA perception. Although minor differences in RGA and GAI abundance may be observed in the comparison of individual *gid1* single and double mutants in the experiment shown in Figure 3A, these differences were generally not reproducible and cannot be considered significant. However, we observed a significant and reproducible accumulation of RGA but not of GAI in the *gid1* triple mutant (Figure 3A). Furthermore, following GA treatments that cause complete degradation of these proteins in the wild type, RGA and GAI were found to be fully stabilized in the *gid1* triple mutant (Figure 3B). We thus conclude that the *gid1* triple mutants are GA insensitive with respect to DELLA protein degradation and that GAI and RGA accumulate to different levels in the *gid1* receptor mutants.

Since we could show that *gid1* triple mutants are GA insensitive at the physiological and biochemical level, we next exam-

ined whether their GA insensitivity also extends to GA-regulated transcription. To this end, we dissected *ga1* and *gid1* triple mutant seedlings from seeds, allowed the dissected seedlings to grow for 1 week on growth media, and subjected the phenotypically identical mutant seedlings for 1 h to 100 μ M GA3 or a mock control treatment (three biological replicate samples for each mutant and each treatment). With the exception of the *GA1* and *GID1* genes mutated in the respective loss-of-function mutants, gene expression analyses with the *Arabidopsis* ATH1 gene chip identified only a single gene that is differentially expressed between mock-treated *ga1* and mock-treated *gid1a-c* (data not shown). Thus, *ga1* and *gid1* mutants are not only identical at the phenotypic level but also at the level of gene expression. In turn, the analysis of the GA-treated *ga1* mutant resulted in the identification of 120 GA-repressed and 28 GA-induced genes (Figure 3C; see Supplemental Table 1 online). In line with previous gene expression studies, this analysis identified *GAI* as being induced in response to GA and *GID1A*, *GID1b*, *SLY1*, and several genes encoding proteins required for GA biosynthesis as being repressed in response to GA (see Supplemental Table 1 online) (Cao et al., 2006; Griffiths et al., 2006). Importantly, the expression of the 148 genes regulated by GA in *ga1* was not affected by the GA treatment in the *gid1* triple mutants (Figure 3C; see Supplemental Table 1 online). Furthermore, the direct comparison of the expression profiles of mock-treated and GA-treated *gid1* triple mutants did not lead to the identification of any GA-regulated genes in the *gid1* triple mutant. Thus, our findings suggest that all GA-regulated transcriptional responses are mediated by the GID1 GA receptors in *Arabidopsis*, at least at the seedling stage.

GID1 Receptors and the DELLA Repressors Interact at the Biochemical and Genetic Levels

Next, we generated a transgenic line expressing a fusion protein of GID1A and green fluorescent protein (GFP) under control of the 35S promoter of *Cauliflower mosaic virus* (35S:GID1:GFP). Overexpression of GID1:GFP in the wild-type background resulted in a slight reduction of flowering time and correlated with a slight reduction in RGA protein levels when compared with wild-type plants (Figures 4A and 4C). Furthermore, the 35S:GID1:GFP transgene was able to complement the germination, elongation, and flowering time defects of the *gid1* triple mutant, indicating that the fusion protein retained functionality (Figure 4B). As described for the rice GID1 protein, the GFP-tagged *Arabidopsis* GID1A protein localizes to the nucleus, the presumed site of action of the DELLA repressors, and to the cytoplasm. Furthermore, the localization of the GID1A receptor was not altered by GA treatments or by treatments of the GA biosynthesis inhibitor PAC (Figure 4D; data not shown) (Silverstone et al., 2001; Fleck and Harberd, 2002; Ueguchi-Tanaka et al., 2005).

To gain evidence for the *in vivo* interaction between GID1A and the DELLA repressors, we immunoprecipitated GID1:GFP with an anti-GFP affinity matrix. Using protein extracts of *sly1-10* mutant seedlings, which accumulate the DELLA repressors, we were able to coimmunoprecipitate RGA in a GA-dependent manner (Figure 3D). Our attempts to coimmunoprecipitate GID1:GFP and GAI in a similar experiment were not successful, most likely due to the comparatively lower affinity of the anti-GAI antibody.

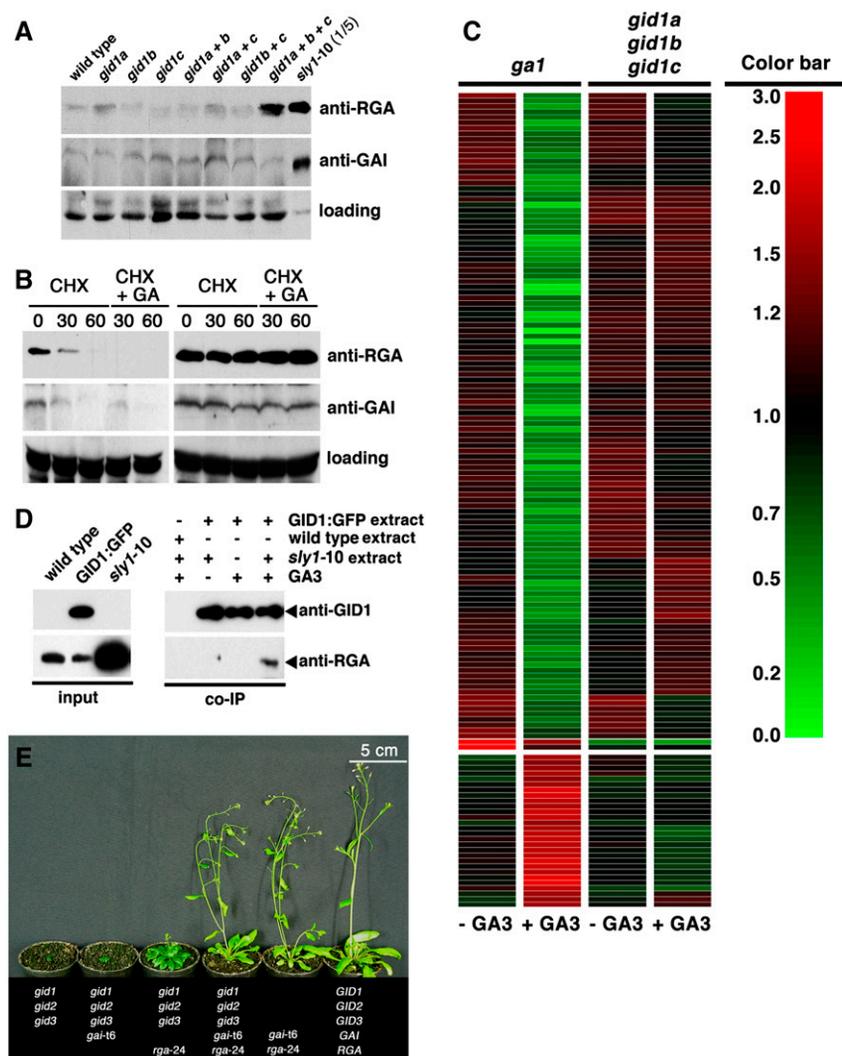


Figure 3. *GAI* and *RGA* Are Major Growth Repressors in *gid1* Triple Mutants.

(A) Abundance of RGA and GAI in the *gid1* mutants. Immunoblots with specific anti-RGA and anti-GAI antibodies (see Supplemental Figure 2 online) using 45 μ g of total protein extract from the wild type and *gid1* mutants as indicated and 9 μ g from *sly1-10* mutants. A cross-reacting band serves as loading control.

(B) RGA and GAI are stabilized in *gid1* triple mutants. Immunoblot with anti-RGA and anti-GAI antibodies using 45 μ g of protein extract from wild-type and *gid1* triple mutant plants after cycloheximide (CHX; 50 μ M) and GA3 (100 μ M) treatments as indicated. A cross-reacting band serves as loading control.

(C) *gid1* triple mutants are GA insensitive with respect to GA-regulated gene expression. Clustered gene tree of the 148 GA-regulated genes in the *ga1* mutant (two columns on the left) and the *gid1* triple mutants (two columns on the right) in the absence and presence of GA as indicated. Coloring of the gene tree is according to the color bar on the right. The complete list of GA-regulated genes and raw expression data are provided in Supplemental Table 1 online.

(D) The GID1::GFP fusion protein coimmunoprecipitates with RGA in a GA-dependent manner. Immunoblots with anti-GID1 and anti-RGA antibodies using 45 μ g of total protein extract as input control (left panel) and after coimmunoprecipitation (co-IP; right panel).

(E) The *rga-24* and *gai-16* mutations suppress the *gid1* triple mutant phenotype (6-week-old plants are shown). All plants are homozygous for the Columbia *ER* allele. At least four quadruple and quintuple mutant plants with identical phenotypes were identified. The *rga-24* *gai-16* double mutants with the Columbia *ER* allele segregating from the cross are indistinguishable from the Columbia wild type.

Nevertheless, this experiment indicates that GID1A can interact with DELLA proteins in vivo.

In rice, the introduction of a *SLENDER RICE* loss-of-function mutant completely suppresses the *gid1* mutant phenotype. In a similar experiment, we introduced *GAI* and *RGA* loss-of-function

alleles (*gai-16* and *rga-24*) into the *Arabidopsis* *gid1* triple mutant background. In the resulting quintuple mutant, we observed a dramatic suppression of almost all aspects of the *gid1* mutant phenotype, including the defects in germination, elongation growth, and flowering time (Figure 3E). Quadruple mutants lacking only *GAI*

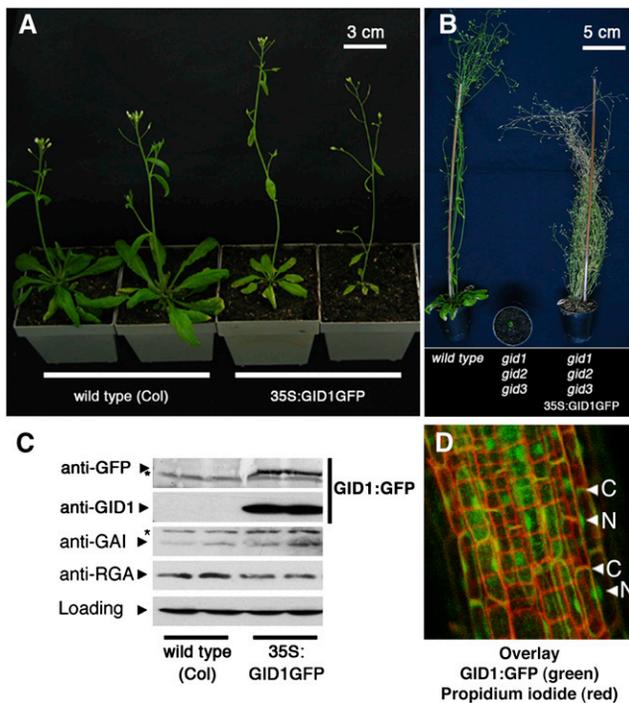


Figure 4. Transgenic 35S:GID1GFP plants overexpress a functional GID1:GFP fusion protein.

(A) The 35S:GID1GFP transgenic plants flower earlier and elongate faster than wild-type plants. Two representative three-week-old wild-type and 35S:GID1GFP lines are shown.

(B) The 35S:GID1GFP transgene complements the *gid1* triple mutant phenotype. 35S:GID1GFP was introgressed into a segregating *gid1* mutant, and complementing lines were identified by genotyping for the three *gid1* mutant alleles and the 35S:GID1GFP transgene in the F2 generation.

(C) Immunoblots with 45 μ g of protein extract indicate that the overexpression of GID1:GFP correlates with a slight reduction of RGA but not of GAI protein levels. Asterisks indicate cross-reacting bands.

(D) GID1:GFP localizes to the nucleus (N) and the cytoplasm (C). Overlay image of confocal images of GID1:GFP (green) as detected in roots of 35S:GID1GFP transgenic plants and propidium iodide (red), which was used to outline the cellular boundaries.

or *RGA* suppressed the *gid1* triple mutant phenotype to a comparatively minor extent, but the suppression by *rga-24* was significantly stronger than that by *gai-t6* (Figure 3E). Since the *gai-t6* and *rga-24* mutations are in a different *Arabidopsis* ecotype (Landsberg *erecta*) than the *gid1* mutations (Columbia), we were concerned with the effect of the genetic background on the mutants' phenotypes. Since the complexity of the genetic experiment and the severity of the mutant phenotypes prevented us from performing repeated backcrosses, we restricted our analysis to quadruple and quintuple mutants that were genotyped as being homozygous wild type for the Columbia allele of the *ERECTA* (*ER*) gene. *ER* is mutated in Landsberg *erecta*, and this mutation is at least in part responsible for the differences in elongation growth between the Columbia and Landsberg *erecta* ecotypes (Torii et al., 1996). A minimum of four plants was iden-

tified for each quadruple and quintuple mutant in the Columbia *ER* background, and all plants belonging to the same group were phenotypically indistinguishable. Taken together, our genetic and biochemical data strongly support the notion that GID1 proteins interact with DELLA proteins in a GA-dependent manner in vivo and that the DELLA repressors GAI and RGA are the major growth repressors in the absence of GA signaling in an *Arabidopsis* GA receptor mutant background.

The GAI DELLA Domain Mediates GID1A GA Receptor Interactions

Since mutations of the GAI DELLA domain and mutations of the GID1 GA receptors confer GA-insensitive growth (Figures 1 and 2), and since DELLA proteins and GID1 proteins interact in vivo (Figure 3), we reasoned that the GAI DELLA domain itself may mediate the interactions with the GID1A GA receptor. Following up on experiments made by others, we used the yeast two-hybrid system to demonstrate that GAI can interact with GID1A in a GA-dependent manner in yeast (Nakajima et al., 2006). We then tested the *gai* mutant variants in this interaction assay and found that all *gai* mutant variants with a partial or full deletion of the DELLA domain fail to interact with GID1A (Figure 5). This finding is in agreement with recent reports that the DELLA domain of RGA is required for GID1A interactions (Griffiths et al., 2006). Consistent with our observation that plants expressing GAI: Sln1D are partially impaired in GA responses, we detected an \sim 10-fold reduction of the interaction between the Sln1D mutant variant and GID1A over a range of GA concentrations (Figure 5C; data not shown). In a complementary experiment, we observed that the GAI DELLA domain alone (amino acids 1 to 73) is sufficient to mediate GA-dependent interactions with GID1A and that the presence of the adjacent VHYNP domain (amino acids 1 to 115) does not contribute to the strength of this interaction. Thus, our results support the notion that the DELLA domain serves as a receiver domain for the GA receptor following GA binding and that the loss of this interaction is the molecular cause for the GA insensitivity observed in the previously reported dwarfing alleles of DELLA repressor genes from a range of species.

DISCUSSION

We were interested in determining the molecular function of the DELLA domain of the DELLA repressor proteins. To this end, we introduced previously identified DELLA domain mutations from *Arabidopsis*, maize, wheat, and barley into *Arabidopsis* GAI (Figure 1A). Genetic evidence suggested that these mutations are responsible for GA-insensitive growth in the respective alleles (Peng et al., 1999b; Chandler et al., 2002). Transgenic *Arabidopsis* plants expressing GAI variants with a deletion of or in the DELLA domain were phenotypically indistinguishable GA-insensitive dwarfed plants that express stabilized *gai* proteins (Figure 1; see Supplemental Figure 1B online). The single amino acid exchange mutation designed based on the barley Sln1D mutant allele showed an intermediate phenotype with respect to plant growth and mutant *gai* protein stabilization, and these data are entirely consistent with a previous study on the SLN1D protein from barley (Gubler et al., 2002). In turn, our interaction studies with the

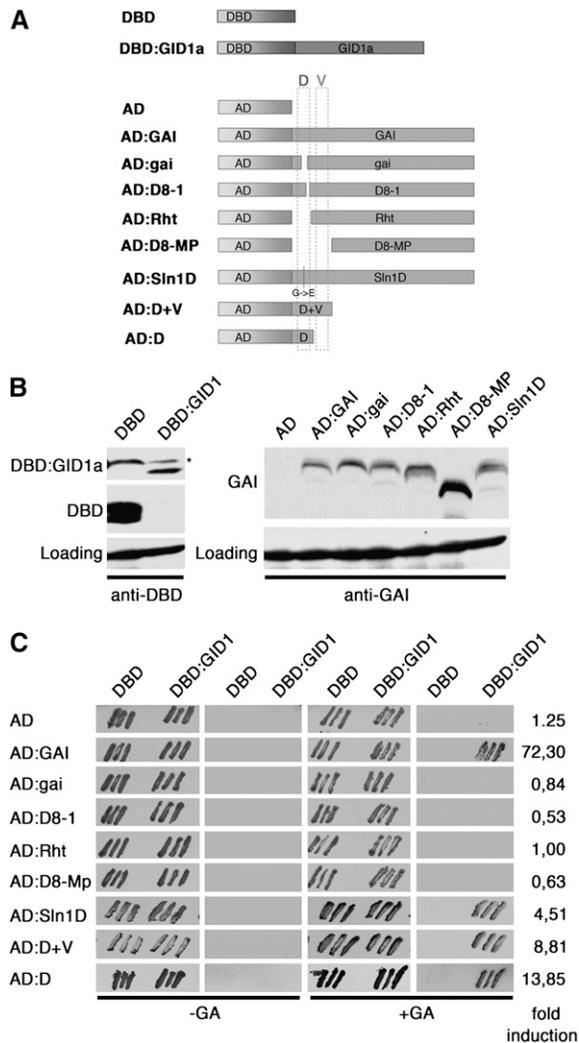


Figure 5. The DELLA Domain Is Required and Sufficient for the Interaction with the GID1A Receptor.

(A) Schematic representation of the constructs used for the yeast two-hybrid interaction study. The positions of the DELLA (D) and the VHYNP (V) domains are indicated.

(B) Immunoblots with anti-GAI (AD constructs; anti-GAI antibodies) and anti-GAL4 (DBD constructs; anti-GAL4 [DBD] RK5C1; Santa Cruz Biotechnology) antibodies demonstrating the expression of the respective fusion proteins in yeast. The asterisk indicates a cross-reacting band. The expression levels of the AD:D and AD:D+V constructs in yeast could not be examined because the anti-GAI peptide antibody does not recognize the GAI N terminus.

(C) Result of the yeast two-hybrid interaction study demonstrating that the DELLA domain is required and sufficient for the GA-dependent GID1A interactions. The first and third columns show yeast transformants (growth control); the second and fourth columns show the result of a qualitative LacZ filter lift assay conducted with yeast grown for 2 d in the absence (left) and presence (right) of 100 μ M GA3 (Duchefa). Indicated on the right are the fold inductions of LacZ enzyme activity of DBD:GID1 AD:construct combinations grown on GA3 over untreated samples as determined using the Galacton-Star luminescent reagent. In agreement with the qualitative assays, the DBD AD:construct combinations (negative controls) did not result in differential LacZ activity in the absence and presence of GA (data not shown).

Arabidopsis GID1A GA receptor and the GAI DELLA repressor mutant proteins indicate that the loss (or reduction in the case of Sln1D) of GA responsiveness can be explained by the loss (or reduction) of GA-dependent GID1A binding (Figure 5). Since we also found that the DELLA domain alone is sufficient to mediate GA-dependent GAI interactions in the yeast two-hybrid system, we propose that the DELLA domain functions as the receiver domain for the activated GID1A receptor. Thus, loss of GA receptor interaction may be molecular cause for GA-insensitive growth of the respective dwarfing alleles from wheat, maize, and barley. At the same time, we of course realize that the ultimate proof for this hypothesis needs to be furnished in the respective crop species, as already done in the case of barley Sln1D (Gubler et al., 2002). In the case of the wheat Rht1 alleles, another but related mechanistic explanation to the one mentioned above may be valid. Based on the nature of the Rht1 mutations, it may be possible that these alleles express an N-terminally truncated GAI ortholog, as used in our study, as well as a peptide containing only the protein's N terminus, including the DELLA domain (Peng et al., 1999b). It cannot be excluded that the expression of this DELLA domain-only peptide titrates out GID1 interaction partners and thereby causes indirectly the stabilization of functional full-length DELLA repressors.

We characterized mutants lacking the three genes encoding GID1 GA receptor function in *Arabidopsis*. To a large extent, our phenotypic analysis is consistent with a report on the function of these genes that was published recently by others (Griffiths et al., 2006). In addition to the phenotypic analysis provided in this other report, we could show that *gid1* double mutants are impaired to the same extent in germination, while the *gid1* triple mutants are unable to germinate (Figure 2B). By contrast, we found that GA-induced hypocotyl elongation and plant height of adult plants are significantly more affected in *gid1a gid1c* mutants than in double mutant combinations containing *gid1b* (Figures 2C and 2D). Analyses of the *gid1* double mutants at the adult stage further indicate that *gid1a* mutations make a stronger contribution to the adult phenotype than the two other genes. These observations are also consistent with the observations published recently (Griffiths et al., 2006). By contrast, however, we noted that our *gid1* triple mutant never flowered and therefore has a more severe phenotype than the previously described *gid1* triple mutant. We attribute this difference to the different *gid1c* alleles that were used in the two studies. We made use of the *gid1c-2* allele, which may be stronger than the *gid1c-1* allele used in the other study. *gid1c-2* has an insertion in the large exon of the *GID1c* gene, while the insertion in *gid1c-1* is in the gene's intron and could potentially be removed by splicing (Figure 2A).

Our analyses also extend the understanding of the interaction between the GID1 proteins and the DELLA repressors (Figure 3). While we show that GAI and RGA are stabilized in the *gid1* triple mutant and that both proteins act as repressors in the *gid1* triple mutant background (Figures 3B and 3E), we also show that GA-regulated transcription is fully impaired in the *gid1* triple mutants (Figure 3C). In this experiment, we had envisioned three different scenarios: First, GA-regulated transcription may be fully repressed in the *gid1* triple mutant, indicating that all transcriptional GA responses are mediated by the three GID1 GA receptors. Second, GA-regulated transcription may be globally reduced

but not fully repressed, a finding indicative of the existence of other proteins with a general role in GA perception and signal transduction. (An alternative explanation for this scenario could have been that the *gid1* triple mutants are not null alleles.) Third, GA-regulated gene expression of a subset of GA-regulated genes can still occur, a finding indicative for the existence of other receptor proteins that control a subset of GA responses. Our gene expression analysis strongly supports the first scenario, suggesting that all transcriptional GA responses, at least at the growth stage examined, are mediated by the GID1 proteins.

While our study shows that the GAI DELLA domain alone (amino acids 1 to 73) is sufficient to mediate interactions with the GID1A receptor, the recently published study on the interaction between GID1 proteins and RGA suggests that the RGA DELLA domain (RGA amino acids 1 to 70) alone is not sufficient to mediate this interaction (Griffiths et al., 2006). In addition to the fact that these two studies use different vector systems, we would like to note that our GAI DELLA domain fragment (GAI amino acids 1 to 73) corresponds based on sequence homologies to the first 89 amino acids of RGA, due to the extended N terminus of RGA. Thus, our fragment covers a considerably longer part of the GAI N terminus downstream of what we define as the DELLA domain than the RGA DELLA domain fragment used in the other study (Figure 1A; see Supplemental Figure 1A online). The longer GAI DELLA domain fragment used in our study may provide additional flexibility to the DELLA domain and thereby permit interactions with the GA receptor. It may also be that the functional DELLA domain is longer than what is generally defined as the DELLA domain (Figure 1A; see Supplemental Figure 1A online) since, in the absence of structural protein data, it is difficult to delimit the boundaries of the DELLA domain solely based on the degree of sequence conservation.

In our experiments, we also detected an effect of GAI stabilization on the abundance of RGA. All lines expressing stabilized mutant *gai* proteins had strongly reduced RGA levels. GA biosynthesis is under negative feedback control of GA, and this feedback control mechanism is known to be impaired in GA signaling mutants that fail to degrade GAI or RGA, such as *gai-1* (Peng and Harberd, 1997). We therefore reasoned that an increase in GA levels promotes the accelerated degradation of RGA in plants expressing stabilized *gai* variants. We could substantiate this hypothesis by our finding that RGA levels increase in plants expressing stabilized *gai* when GA biosynthesis is inhibited with the GA biosynthesis inhibitor PAC. Thus, although we did not examine other levels of control, such as gene transcription, the reduction of RGA levels may at least in part be explained by increases in GA levels after GAI stabilization. Similar observations were made in previous studies where, for example, GAI protein levels were found to be increased in the absence of RGA in *gai-3 rga-24* and *sly1-10 rga-24* loss-of-function mutants compared with the *gai-3* or *sly1-10* single mutants (Dill et al., 2004). It thus appears that the abundance of DELLA repressors is under global control and that a mechanism is in place that controls DELLA protein levels. While one element of this control mechanism is certainly SLY1-mediated GA-dependent DELLA protein turnover, the precise mode of regulation remains to be established. A differential accumulation of the DELLA repressors is also apparent in several of our mutant analyses. For example,

RGA and GAI accumulate and are stabilized in the *sly1-10* mutant, which lacks the F-box protein that promotes RGA and GAI degradation. In turn, only RGA but not GAI accumulates in the *gid1* triple mutant, but neither protein responds to GA in the GA receptor mutant background (Figures 3A and 3B). This difference may be explained by a differential GA-independent turnover of GAI by SLY1. This hypothesis may be supported by the observation that SLY1 interacts significantly better with GAI than with RGA in the yeast two-hybrid system, notably in the absence of GA (Dill et al., 2004). Such a hypothetical GA-independent turnover may explain the differential accumulation of the two repressors in the *gid1* triple mutant. Although we have not been able to resolve such a GAI turnover in our experiments, we cannot exclude its existence and consider it a suitable mechanism to explain the differences in basal DELLA protein levels.

Independent of the molecular mechanism that underlies the differential accumulation of GAI and RGA in specific mutants, it also needs to be said that there is a striking discrepancy in the severity of the phenotypes of the (weak) *sly1-10* and the (strong) *gid1* triple mutant, especially in relation to the (strong and weak) accumulation of the DELLA repressors (e.g., Figure 3A). Thus, there is no good correlation between DELLA protein accumulation, the ability to degrade the repressors, and the severity of a phenotype. It is therefore very likely that, besides GA-dependent protein degradation, alternative molecular mechanisms, such as posttranslational modifications, regulate DELLA repressor activity. Several reports point to a role of phosphorylation in controlling DELLA protein function, but the regulatory role of this modification with respect to DELLA repressor activity is unclear (Sasaki et al., 2003; Gomi et al., 2004; Itoh et al., 2005). Glycosylation by the glycosyl transferase SPINDLY is a second modification that may be implicated in DELLA repressor activity, or more specifically in repressor activation (Silverstone et al., 2007). The identification of the proteins that exert regulatory functions on the DELLA repressors and the identification of the site, nature, and function of DELLA protein modifications will further increase our understanding of the GA signaling pathway in the future.

METHODS

Plant Material

All *gid1* alleles are from *Arabidopsis thaliana* (ecotype Columbia) and were obtained from the Nottingham Arabidopsis Stock Centre and the GABI-KAT facility (Max-Planck Institute for Plant Breeding Research) (Alonso et al., 2003; Rosso et al., 2003). Homozygous mutants were identified by PCR-based genotyping: *gid1a-1* was genotyped using 5'-attB1-CGG-ATCCTGGCTGCGAGCGATGAAGTTAATC-3' and 5'-attB2-CTGCAGTT-AACATTCGCGTTTACAAACGCCG-3' to test for the wild-type gene and 5'-attB2-CTGCAGTTAACATTCGCGTTTACAAACGCCG-3' and LBB1 to test for the T-DNA insertion. *gid1b-1* was genotyped using 5'-ATGGC-TGGTGGTAACGAAGTCAACC-3' and 5'-CTAAGGAGTAAGAAGCACAGGACTTGAC-3' to test for the wild-type gene and 5'-CTAAGGAGTAAGAAGCACAGGACTTGAC-3' together with 5'-CTTATTTTCAGTAAGA-GTGTGGGGTTTTGG-3' to test for the insertion. *gid1c-2* was genotyped using 5'-ACCAGCTGATGCTGGCACTTCACCAAGT-3' and 5'-GGCATTCTGCGTTT ACAATGCAGCTATCT-3' to test for the wild-type gene and 5'-CAGACAGTGGTTCCCTCTCAATACA-3' together with 5'-CCCATTGG-ACGTGAATGTAGACAC-3' to test for the insertion. *rga-24* was genotyped

using 5'-GGTGATTTTCACGGTGGTTG-3' and 5'-TCGCTTAGTAGTTAG-TACTC-3' to amplify the wild-type gene fragment and 5'-CATAGACCA-TAGTATTCGTGA-3' and 5'-TCGCTTAGTAGTTAGTACTC-3' to amplify the mutant allele. *gai-t6* was genotyped using 5'-CTAGATCCGACATTG-AAGGA-3' and 5'-AGCATCAAGATCAGCTAAAC-3' to amplify the wild-type gene and 5'-CTAGATCCGACATTGAAGGA-3' and 5'-TCGGGTAC-GGGATTTTCGCAT-3' to amplify the *gai-t6* insertion allele. The alleles *gid1a-1*, *gid1b-1*, and *gid1c-2* were used to generate mutant combinations. The genotypes of important mutant combinations, such as the *gid1a gid1b gid1c rga-24 gai-t6* mutants, were confirmed three times using independent genomic DNA preparations.

T-DNA Constructs for Plant Transformation

To generate GAI:GAI, GAI:gai, etc., the open reading frames of *GAI* and *gai* mutant variants were obtained by overlap extension PCR and introduced into the vector pGREEN0179 containing 2-kb *GAI* upstream and downstream sequences (Hellens et al., 2000). All constructs were designed and cloned in an identical manner. In detail, the 2-kb *GAI* promoter fragment was amplified by PCR from ecotype Columbia genomic DNA using 5'-CTCGAGTATTACTTCTTTAGAAAAAATAATGTTTGG-3' and 5'-GAATTCATTGGCGATGGATCCCATGGTTGGTTTTTTTCAG-3' and inserted as an *XhoI*-*Bam*HI fragment into pGREEN0179. Subsequently, the 2-kb *GAI* downstream sequence was amplified using 5'-GGATCCATCGCCAAT-GAATTCATAGATGGTGGCTCAATGAATTGATC-3' and 5'-GAGCTCCGTG-GCGGAAGTACCGCTGAAAG-3' and inserted as a *Bam*HI-*Sac*I fragment into the above construct. Into the resulting *Bam*HI and *Eco*RI restriction sites, full-length GAI and *gai* were ligated after amplification from wild-type and *gai-1* mutant genomic DNA. PCR fragments containing gene-specific deletions were then generated and used to replace part of the *GAI* wild-type sequence: For GAI:Rht1, a PCR product was obtained with 5'-GGATC-CGTTATGATGTCTAATGTTCAAGAA-3' and 5'-CTGCAGTCACCCAG-GTCGAAGCGCAAGAG-3'. For GAI:SlN1D, an overlap PCR product was inserted that had been obtained with the primer pairs 5'-GGATCCAAG-AGAGATCATCATCATC-3' and 5'-CATTTCCGGATGACCTAACCTTGTA-CTCAAGAACAGCTAGAAGCTCATCCAT-3' as well as 5'-ATGGATGA-GCTTCTAGCTGTTCTTGAGTACAAGGTTAGGTCATCCGAATG-3' and 5'-CTGCAGTCACCCAGGTCGAAGCGCAAGAG-3'. For GAI(D8-1), an overlap PCR product was obtained with the primer pairs 5'-GGATCCAA-GAGAGATCATCATCATC-3' and 5'-CTACATAAATTCAAGCTGCTCGA-GCCCAGCCATTTCCGGATGACCTAACCTTGTAAC-3' as well as 5'-GGT-TACAAGGTTAGGTCATCCGAATGGCTGGGCTGGAGCAGCTTGAAG-TTATGATG-3' and 5'-CTGCAGTCACCCAGGTCGAAGCGCAAGAG-3' for GAI(D8-1). At least 10 transgenic lines were generated in the Columbia ecotype, and eight lines were analyzed at the phenotypic level.

35S:GID1GFP was generated by inserting the GID1A open reading frame amplified by RT-PCR with the primers 5'-attB1-ATGGCTGC-GAGCGATGAAGTTAATCT-3' and 5'-attB2-CACATTCGCGTTTACA-AACGCCGAAATC-3' into 35S-GW-GFP (a gift from the Max Planck Institute for Plant Breeding Research) via pDONR201 using the Gateway system. At least 10 transgenic lines were generated in the Columbia ecotype, and eight lines were analyzed at the phenotypic level. The 35S:GID1GFP transgene was introduced into the *gid1* triple mutant background. Complementation 35S:GID1GFP *gid1* triple mutant plants were identified in the F2 generation by genotyping as described above.

Immunoblots and Immunoprecipitation

Specific anti-GAI and anti-RGA peptide antibodies were raised in rabbits and affinity-purified against the specific peptides GGDYTTNKRKLC (amino acids 127 to 139 of GAI) and KRHHQFQGRSLNHGC (amino acids 2 to 16 of RGA; Eurogentec). Both peptide sequences are specific for the respective DELLA proteins. Immunoblots were performed using 45 μ g of total plant protein extract prepared in extraction buffer (50 mM

Tris-HCl, 150 NaCl, 0.5% Triton X-100, 10 μ M MG132, 0.1 μ M PMSF, and Sigma-Aldrich protease inhibitor cocktail, pH 7.5). For immunoprecipitation of GID1:GFP, 400 μ g of plant extract from the wild type or a 35S:GID1GFP-expressing line was preincubated with 20 μ L of anti-GFP agarose (Vector Laboratories) in a binding buffer (50 mM Tris-HCl, 150 NaCl, 10 μ M MG132, 0.1 μ M PMSF, and Sigma-Aldrich protease inhibitor cocktail, pH 7.5). Following three washes in wash buffer (50 mM Tris-HCl and 150 NaCl), GID1:GFP fusion protein bound to the matrix was mixed with 200 μ g of protein extract from 7-d-old *sly1-10* mutant seedlings in the presence and absence of 100 μ M GA3 and incubated for 3 h in binding buffer. Following three washes in wash buffer, the resin was resuspended in loading buffer, and equal volumes were loaded for immunoblot analysis. GID1:GFP was detected with an anti-GFP antibody (Invitrogen) or an anti-GID1 peptide antibody raised in rabbits and affinity-purified against the GID1A-specific peptide FGGNERTESEKSLDG (Eurogentec).

Microarray Analysis

For gene expression profiling, nongerminating *ga1* and *gid1* triple mutant seedlings were dissected and grown on solid growth medium for 1 week in continuous light. For each mutant, three replicate samples (biological replicates) were subjected to a mock spray treatment with water (uninduced control), and three replicate samples were subjected to a spray treatment with 100 μ M GA3 (Duchefa). After 1 h, the plant material was frozen in liquid nitrogen, and RNA was extracted from each replicate using the RNeasy kit (Qiagen). Complementary RNA was prepared from 1 μ g of total RNA from each replicate as described using the MessageAmp II Biotin-Enhanced Signal Round aRNA amplification kit (Ambion). In brief, double-stranded artificial DNA was synthesized and biotin-labeled target artificial RNA was prepared by artificial DNA in vitro transcription in the presence of biotinylated UTP and CTP. After purification, artificial RNA was fragmented and used to hybridize the *Arabidopsis* ATH1 GeneChip array (Affymetrix). Hybridization, washing, staining, scanning, and data collection were performed for each replicate sample independently in an Affymetrix GeneChip Fluidics Station 450 and GeneArray Scanner. The microarray computational analysis was performed on CEL data files and analyzed using the robust multiarray average GC method (gcRMA) of the GeneSpring software (version 7.2; Agilent Technologies). Means of the three replicate values were analyzed for each data set. Data sets with expression levels below 50 were excluded from comparative analysis (noise level of expression cutoff). Genes were considered as induced or repressed if their mean expression level deviated >1.75 in a comparison of two samples. Statistical significance of gene expression was tested using a one-way analysis of variance test combined with a Benjamini and Hochberg false discovery rate multiple correction algorithm (GeneSpring version 7.2) with an adjusted P value < 0.05 set as cutoff. The gene tree was generated with the 148 genes identified as being GA regulated using the Pearson correlation and average linkage algorithms of the GeneSpring software. The microarray data were submitted to the Gene Expression Omnibus and are available under the accession numbers GSM177119 to GSM177121 (*ga1* mutant experiment), GSM177122 to GSM177124 (*ga1* mutant + GA3), GSM177125 to GSM177127 (*gid1a-c* mutant experiment), and GSM177128 to GSM177130 (*gid1a-c* mutant experiment + GA3).

Microscopy

The intracellular distribution of GID1:GFP was examined in roots of 35S:GIDGFP plants using a Leica TCS SP2 confocal microscope. Propidium iodide was used to outline the cell boundaries.

Yeast Two-Hybrid System

Yeast two-hybrid constructs were obtained by insertion of *GAI* and its mutant variants into the vector pGAD424(+2) as *Bam*HI-*Pst*I fragments

excised from the pGREEN0179-based GAI constructs described above to generate AD:GAI, AD:gai, etc. (Roder et al., 1996). Constructs expressing only the DELLA domain (AD:D) and the DELLA and VHYNP domains (AD:D+V) were constructed by insertion of a PCR fragment obtained with the primers 5'-GGATCCAAGAGAGATCATCATC-3' and 5'-CTGCAGTCAAGTCTCAGTAGCGAGTTGAGA-3' to generate AD:D or 5'-GGATCCAAGAGAGATCATCATC-3' and 5'-CTGCAGTCAAGCGAACTGATTGAGAATCGCGTC-3' to generate AD:D+V. The *GID1A* open reading frame was obtained by RT-PCR from *Arabidopsis* ecotype Columbia mRNA and inserted in frame into the yeast two-hybrid vector pGBT9. Yeast two-hybrid interaction studies were performed in the yeast strains Y187 and Y190 using standard protocols (Schwechheimer and Deng, 2002). In brief, DBD and DBD:GID1A constructs were transformed into Y190 and mated with Y187 strains harboring AD, AD:GAI, AD:gai, etc. DBD and AD plasmids were selected on dropout medium lacking Leu and Trp. LacZ filter lift assays were performed with yeast clones grown on dropout medium lacking Leu and Trp in the absence and presence of 100 μ M GA3. Quantitative LacZ assays were conducted in a Mithras LB940 luminometer (Berthold) using protein extracts prepared from clones grown in liquid dropout medium lacking Leu and Trp in the absence and presence of 100 μ M GA3 using the Galacton-Star reagent (Tropix) as a luminescent substrate. Average relative light units/ μ g protein were determined from four replicates, and fold induction was calculated.

Accession Numbers

Arabidopsis Genome Initiative locus identifiers for the genes mentioned in this article are as follows: *ER* (AT2G26330), *GID1A* (AT3G05120), *GID1b* (AT3G63010), *GID1c* (AT5G27320), *GAI* (AT1G14920), *RGA* (AT2G01570), and *SLY1* (AT4G24210).

Supplemental Data

The following materials are available in the online version of this article.

Supplemental Figure 1. Alignment of *Arabidopsis* GAI with Maize, Wheat, and Barley Orthologs, and Transgenic GAI:gai Plants Mimic the *gai-1* Gain-of-Function Mutant Phenotype.

Supplemental Figure 2. Anti-GAI and Anti-RGA Antibodies Specifically Recognize the Respective DELLA Protein.

Supplemental Figure 3. Mutants Expressing Stabilized GAI Variants Are GA Insensitive.

Supplemental Figure 4. Growth of *ga1* GA Biosynthesis Mutants but Not That of *gid1* Triple Mutants Can Be Normalized by GA Treatment.

Supplemental Table 1. Genes That Are Repressed or Induced by 100 μ M GA3 Treatment (1 h) in a *ga1* Allele (SALK_109115, Columbia Ecotype) and Their Expression in the *gid1a-c* Triple Mutant.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Gerd Jürgens and Erika Isono (Tübingen University) for critical comments on the manuscript. We also thank Nicholas Harberd (John Innes Centre, Norwich, UK) and Camille Steber (Washington State University, Pullman, WA) for sharing mutant seeds. This work is supported by grants from the Deutsche Forschungsgemeinschaft (Schw751/4 and Schw751/5) and the Sonderforschungsbereich SFB446 to C.S. and by a fellowship from the Landesgraduiertenförderung Baden-Württemberg to E.M.N.D.

Received March 2, 2007; revised March 2, 2007; accepted March 22, 2007; published April 6, 2007.

REFERENCES

- Alonso, J.M., et al. (2003). Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science* **301**: 653–657.
- Cao, D., Cheng, H., Wu, W., Soo, H.M., and Peng, J. (2006). Gibberellin mobilizes distinct DELLA-dependent transcriptomes to regulate seed germination and floral development in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **142**: 509–525.
- Chandler, P.M., Marion-Poll, A., Ellis, M., and Gubler, F. (2002). Mutants at the *Slender1* locus of barley cv. Himalaya. Molecular and physiological characterization. *Plant Physiol.* **129**: 181–190.
- Cheng, H., Qin, L., Lee, S., Fu, X., Richards, D.E., Cao, D., Luo, D., Harberd, N.P., and Peng, J. (2004). Gibberellin regulates *Arabidopsis* floral development via suppression of DELLA protein function. *Development* **131**: 1055–1064.
- Dill, A., Jung, H.-S., and Sun, T.-p. (2001). The DELLA motif is essential for gibberellin-induced degradation of RGA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**: 14162–14167.
- Dill, A., and Sun, T. (2001). Synergistic derepression of gibberellin signaling by removing RGA and GAI function in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* **159**: 777–785.
- Dill, A., Thomas, S.G., Hu, J., Steber, C.M., and Sun, T.P. (2004). The *Arabidopsis* F-box protein SLEEPY1 targets gibberellin signaling repressors for gibberellin-induced degradation. *Plant Cell* **16**: 1392–1405.
- Fleck, B., and Harberd, N.P. (2002). Evidence that the *Arabidopsis* nuclear gibberellin signalling protein GAI is not destabilised by gibberellin. *Plant J.* **32**: 935–947.
- Fu, X., Richards, D.E., Ait-Ali, T., Hynes, L.W., Ougham, H., Peng, J., and Harberd, N.P. (2002). Gibberellin-mediated proteasome-dependent degradation of the barley DELLA protein SLN1 repressor. *Plant Cell* **14**: 3191–3200.
- Fu, X., Richards, D.E., Fleck, B., Xie, D., Burton, N., and Harberd, N.P. (2004). The *Arabidopsis* mutant sleepy1^{gar2-1} protein promotes plant growth by increasing the affinity of the SCF^{SLY1} E3 ubiquitin ligase for DELLA protein substrates. *Plant Cell* **16**: 1406–1418.
- Gale, M.D., and Marshall, G.A. (1973). Insensitivity to gibberellins in dwarf wheats. *Ann. Bot. (Lond.)* **37**: 729–735.
- Gale, M.D., and Marshall, G.A. (1976). The chromosomal location of *GAI 1* and *RHT 1*, genes for gibberellin insensitivity and semi-dwarfism, in a derivative of Norin 10 wheat. *Heredity* **37**: 283–289.
- Gomi, K., Sasaki, A., Itoh, H., Ueguchi-Tanaka, M., Ashikari, M., Kitano, H., and Matsuoka, M. (2004). GID2, an F-box subunit of the SCF E3 complex, specifically interacts with phosphorylated SLR1 protein and regulates the gibberellin-dependent degradation of SLR1 in rice. *Plant J.* **37**: 626–634.
- Griffiths, J., Murase, K., Rieu, I., Zentella, R., Zhang, Z.L., Powers, S.J., Gong, F., Phillips, A.L., Hedden, P., Sun, T.P., and Thomas, S.G. (2006). Genetic characterization and functional analysis of the GID1 gibberellin receptors in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **18**: 3399–3414.
- Gubler, F., Chandler, P.M., White, R.G., Llewellyn, D.J., and Jacobsen, J.V. (2002). Gibberellin signaling in barley aleurone cells. Control of SLN1 and GAMYB expression. *Plant Physiol.* **129**: 191–200.
- Harberd, N., and Freeling, M. (1989). Genetics of dominant gibberellin-insensitive dwarfism in maize. *Genetics* **121**: 827–838.
- Hellens, R.P., Edwards, E.A., Leyland, N.R., Bean, S., and Mullineaux, P.M. (2000). pGreen: A versatile and flexible binary Ti vector for Agrobacterium-mediated plant transformation. *Plant Mol. Biol.* **42**: 819–832.
- Itoh, H., Sasaki, A., Ueguchi-Tanaka, M., Ishiyama, K., Kobayashi, M., Hasegawa, Y., Minami, E., Ashikari, M., and Matsuoka, M. (2005). Dissection of the phosphorylation of rice DELLA protein, SLENDER RICE1. *Plant Cell Physiol.* **46**: 1392–1399.
- Itoh, H., Ueguchi-Tanaka, M., Sato, Y., Ashikari, M., and Matsuoka, M.

- (2002). The gibberellin signaling pathway is regulated by the appearance and disappearance of SLENDER RICE1 in nuclei. *Plant Cell* **14**: 57–70.
- King, K.E., Moritz, T., and Harberd, N.P.** (2001). Gibberellins are not required for normal stem growth in *Arabidopsis thaliana* in the absence of GAI and RGA. *Genetics* **159**: 767–776.
- Koornneef, M., and van der Veen, J.H.** (1980). Induction and analysis of gibberellin sensitive mutants in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Theor. Appl. Genet.* **58**: 257–263.
- Lee, S., Cheng, H., King, K.E., Wang, W., He, Y., Hussain, A., Lo, J., Harberd, N.P., and Peng, J.** (2002). Gibberellin regulates *Arabidopsis* seed germination via RGL2, a GAI/RGA-like gene whose expression is up-regulated following imbibition. *Genes Dev.* **16**: 646–658.
- McGinnis, K.M., Thomas, S.G., Soule, J.D., Strader, L.C., Zale, J.M., Sun, T.P., and Steber, C.M.** (2003). The *Arabidopsis* SLEEPY1 gene encodes a putative F-box subunit of an SCF E3 ubiquitin ligase. *Plant Cell* **15**: 1120–1130.
- Nakajima, M., et al.** (2006). Identification and characterization of *Arabidopsis* gibberellin receptors. *Plant J.* **46**: 880–889.
- Peng, J., Carol, P., Richards, D.E., King, K.E., Cowling, R.J., Murphy, G.P., and Harberd, N.P.** (1997). The *Arabidopsis* GAI gene defines a signaling pathway that negatively regulates gibberellin responses. *Genes Dev.* **11**: 3194–3205.
- Peng, J., and Harberd, N.P.** (1997). Gibberellin deficiency and response mutations suppress the stem elongation phenotype of phytochrome-deficient mutants of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **113**: 1051–1058.
- Peng, J., et al.** (1999b). ‘Green revolution’ genes encode mutant gibberellin response modulators. *Nature* **400**: 256–261.
- Peng, J., Richards, D.E., Moritz, T., Cano-Delgado, A., and Harberd, N.P.** (1999a). Extragenic suppressors of the *Arabidopsis gai* mutation alter the dose–response relationship of diverse gibberellin responses. *Plant Physiol.* **119**: 1199–1208.
- Pysh, L.D., Wysocka-Diller, J.W., Camilleri, C., Bouchez, D., and Benfey, P.N.** (1999). The GRAS gene family in *Arabidopsis*: Sequence characterization and basic expression analysis of the SCARECROW-LIKE genes. *Plant J.* **18**: 111–119.
- Richards, D.E., King, K.E., Ait-Ali, T., and Harberd, N.P.** (2001). How gibberellin regulates plant growth and development: A molecular genetic analysis of gibberellin signaling. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **52**: 67–88.
- Roder, K.H., Wolf, S.S., and Schweizer, M.** (1996). Refinement of vectors for use in the yeast two-hybrid system. *Anal. Biochem.* **241**: 260–262.
- Rosso, M.G., Li, Y., Strizhov, N., Reiss, B., Dekker, K., and Weisshaar, B.** (2003). An *Arabidopsis thaliana* T-DNA mutagenized population (GABI-Kat) for flanking sequence tag-based reverse genetics. *Plant Mol. Biol.* **53**: 247–259.
- Sasaki, A., Itoh, H., Gomi, K., Ueguchi-Tanaka, M., Ishiyama, K., Kobayashi, M., Jeong, D.H., An, G., Kitano, H., Ashikari, M., and Matsuoka, M.** (2003). Accumulation of phosphorylated repressor for gibberellin signaling in an F-box mutant. *Science* **299**: 1896–1898.
- Schwechheimer, C., and Deng, X.W.** (2002). Studying protein-protein interactions with the yeast two-hybrid system. In *Molecular Plant Biology*, P.M. Gilmartin and C. Bowler, eds (Oxford, UK: Oxford University Press), pp. 173–198.
- Silverstone, A.L., Ciampaglio, C.N., and Sun, T.** (1998). The *Arabidopsis* RGA gene encodes a transcriptional regulator repressing the gibberellin signal transduction pathway. *Plant Cell* **10**: 155–169.
- Silverstone, A.L., Jung, H.S., Dill, A., Kawaide, H., Kamiya, Y., and Sun, T.P.** (2001). Repressing a repressor: Gibberellin-induced rapid reduction of the RGA protein in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **13**: 1555–1566.
- Silverstone, A.L., Tseng, T.S., Swain, S.M., Dill, A., Jeong, S.Y., Olszewski, N.E., and Sun, T.P.** (2007). Functional analysis of SPINDLY in gibberellin signaling in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **143**: 987–1000.
- Torii, K.U., Mitsukawa, N., Oosumi, T., Matsuura, Y., Yokoyama, R., Whittier, R.F., and Komeda, Y.** (1996). The *Arabidopsis* ERECTA gene encodes a putative receptor protein kinase with extracellular leucine-rich repeats. *Plant Cell* **8**: 735–746.
- Tyler, L., Thomas, S.G., Hu, J., Dill, A., Alonso, J.M., Ecker, J.R., and Sun, T.P.** (2004). DELLA proteins and gibberellin-regulated seed germination and floral development in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **135**: 1008–1019.
- Ueguchi-Tanaka, M., Ashikari, M., Nakajima, M., Itoh, H., Katoh, E., Kobayashi, M., Chow, T.Y., Hsing, Y.I., Kitano, H., Yamaguchi, I., and Matsuoka, M.** (2005). *GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF1* encodes a soluble receptor for gibberellin. *Nature* **437**: 693–698.
- Winkler, R.G., and Freeling, M.** (1994). Physiological genetics of the dominant gibberellin-nonresponsive maize dwarfs, *Dwarf8* and *Dwarf9*. *Planta* **193**: 341–348.

Gibberellin Regulates PIN-FORMED Abundance and Is Required for Auxin Transport-Dependent Growth and Development in *Arabidopsis thaliana*

Björn C. Willige, Erika Isono, René Richter, Melina Zourelidou, and Claus Schwechheimer¹

Department of Plant Systems Biology, Center for Life and Food Sciences Weihenstephan, Technische Universität München, 85354 Freising, Germany

Plants integrate different regulatory signals to control their growth and development. Although a number of physiological observations suggest that there is crosstalk between the phytohormone gibberellin (GA) and auxin, as well as with auxin transport, the molecular basis for this hormonal crosstalk remains largely unexplained. Here, we show that auxin transport is reduced in the inflorescences of *Arabidopsis thaliana* mutants deficient in GA biosynthesis and signaling. We further show that this reduced auxin transport correlates with a reduction in the abundance of PIN-FORMED (PIN) auxin efflux facilitators in GA-deficient plants and that PIN protein levels recover to wild-type levels following GA treatment. We also demonstrate that the regulation of PIN protein levels cannot be explained by a transcriptional regulation of the *PIN* genes but that GA deficiency promotes, at least in the case of PIN2, the targeting of PIN proteins for vacuolar degradation. In genetic studies, we reveal that the reduced auxin transport of GA mutants correlates with an impairment in two PIN-dependent growth processes, namely, cotyledon differentiation and root gravitropic responses. Our study thus presents evidence for a role of GA in these growth responses and for a GA-dependent modulation of PIN turnover that may be causative for these differential growth responses.

INTRODUCTION

Throughout their development, plants have to integrate a multitude of internal and external signals to adapt their growth to the environment and to guarantee reproductive success. Elucidating the molecular mechanisms of such integration is a central topic in plant biology. In this article, we examine how the plant hormone gibberellin (GA) regulates processes that require the directional transport of the plant hormone auxin and how GA thereby modulates auxin-dependent growth during *Arabidopsis thaliana* development.

The phytohormone auxin (indole-3-acetic acid [IAA]) regulates plant morphogenesis during all stages of development, integrating environmental light and gravity signals to allow directional growth during phototropic and gravitropic responses (Benjamins and Scheres, 2008). At the cellular level, auxin mediates the expression of auxin-responsive genes through the inactivation of AUX/IAA transcriptional repressors that negatively regulate the activity of AUXIN RESPONSE FACTOR transcription factors (Chapman and Estelle, 2009). At the organismal level, auxin is transported through the plant body by a system of AUXIN

RESISTANT1 (AUX1)/LIKE-AUX1 (LAX) (Bennett et al., 1996; Müller et al., 1998; Marchant et al., 1999; Yang et al., 2006; Bainbridge et al., 2008) and PIN-FORMED (PIN) proteins (Kramer and Bennett, 2006; Petrášek et al., 2006; Teale et al., 2006; Vieten et al., 2007) from the sites of auxin biosynthesis to sites of auxin action. In the context of this directional auxin transport, AUX1/LAX proteins have been shown to function as auxin influx facilitators, while PIN proteins are critical facilitators of auxin efflux that are thought to function together with members of the family of MULTIDRUG RESISTANCE/PHOSPHO-GLYCOPROTEIN proteins (Chen et al., 1998; Luschnig et al., 1998; Geisler and Murphy, 2006; Petrášek et al., 2006; Yang et al., 2006; Bandyopadhyay et al., 2007; Blakeslee et al., 2007). Through directional auxin transport and the resulting formation of local auxin maxima or minima, auxin can influence a diverse array of developmental processes, such as organ differentiation in the shoot, root differentiation in the root meristem, and lateral root formation along the differentiated root, as well as tropic responses, such as phototropism and gravitropism.

PIN auxin efflux facilitators are particularly interesting because they have a polar distribution in the plasma membrane of many cells and because their polar distribution apparently allows the prediction of directional auxin transport within the plant body (Grieneisen et al., 2007; Wabnik et al., 2010). At least five PIN family members, namely, PIN1, PIN2, PIN3, PIN4, and PIN7, participate in the cell-to-cell transport of auxin in *Arabidopsis*. These PIN proteins have redundant functions, and mutants lacking multiple *PIN* genes have severe growth and differentiation defects (Blilou et al., 2005; Vieten et al., 2005). Among the five PIN family members, PIN1 and PIN2 are particularly well

¹ Address correspondence to claus.schwechheimer@wzw.tum.de. The author responsible for distribution of materials integral to the findings presented in this article in accordance with the policy described in the Instructions for Authors (www.plantcell.org) is: Claus Schwechheimer (claus.schwechheimer@wzw.tum.de).

 Some figures in this article are displayed in color online but in black and white in the print edition.

 Online version contains Web-only data.
www.plantcell.org/cgi/doi/10.1105/tpc.111.086355

suited for developmental and genetic studies because their loss-of-function mutants have specific phenotypes that can be attributed to the loss of specific auxin-dependent developmental processes: PIN1 is the major auxin efflux facilitator in the *Arabidopsis* shoot and loss of PIN1 impairs cotyledon differentiation, phyllotaxy, and shoot differentiation, thereby displaying the name-giving pin-shaped inflorescences of the *pin1* mutant (Gälweiler et al., 1998). PIN2 regulates primarily root gravitropism, and roots of *pin2* mutants are fully agravitropic (Luschnig et al., 1998; Müller et al., 1998; Utsuno et al., 1998). The latter is the consequence of *pin2* mutants being unable to redistribute auxin via epidermis- and lateral root cap-localized PIN2 proteins so that they cannot generate a lateral auxin maximum at the site of root bending (Ottenschläger et al., 2003).

GA is another important plant hormone and it affects a number of central developmental responses, including germination, elongation growth, and flowering time (Ueguchi-Tanaka et al., 2007a; Schwechheimer, 2008). GA binds to GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF1 (GID1) GA receptors and thereby activates E3 ubiquitin ligases, such as *Arabidopsis* SCF^{SLEEPY1(SLY1)} and SCF^{SNEEZY(SNE)}, which promote the ubiquitylation and ultimately proteolytic degradation of DELLA proteins (Ueguchi-Tanaka et al., 2007b; Willige et al., 2007; Shimada et al., 2008). DELLA proteins are repressors of transcription regulators, such as the PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR family transcription factors, ALCATRAZ, or the JASMONIC ACID ZIM-domain protein (de Lucas et al., 2008; Feng et al., 2008; Arnaud et al., 2010; Hou et al., 2010). Thus, as far as GA action is understood today, GA regulates a transcription factor cascade through the consecutive action of posttranslational and transcriptional derepression events. However, how GA and GA signaling lead to the execution of individual GA responses at the cellular level is not understood.

A number of physiological observations suggest a crosstalk between GA signaling and auxin transport. For example, it has been shown that impaired auxin transport leads to the stabilization of the DELLA repressor REPRESSOR-OF-*ga1-3* (RGA) of the GA pathway in *Arabidopsis* and that DELLA proteins delay root growth in response to the loss of shoot-derived auxin (Fu and Harberd, 2003). Since it has also been reported that auxin can induce the transcription of various GA biosynthesis genes (Frigerio et al., 2006), it may be inferred from this observation that a reduction in GA biosynthesis is causative for a stabilization of DELLA proteins in cells that have reduced auxin levels due to impairments in auxin transport. In turn, reports from various plant species suggest that GA promotes auxin transport: It was reported already in the 1960s that GA application leads to an increase in auxin transport that correlates with an increase in apical dominance in pea (*Pisum sativum*) (Jacobs and Case, 1965). More recently, it was reported that *Arabidopsis* mutants with reduced GA responses have reduced apical dominance (Silverstone et al., 1997), which could be explained physiologically by reduced auxin transport in the primary inflorescence. In line with this hypothesis, a more recent study with poplar (*Populus tremula* × *tremuloides*) shows that exogenous GA application stimulates auxin transport (Björklund et al., 2007). A genetic study conducted in *Arabidopsis* furthermore revealed that the GA pathway, directly or indirectly, represses

the transcription of ARR1 at 5 d after germination in the transition zone of the root meristem (Moubayidin et al., 2010). ARR1 is activated by the cytokinin response pathway and represses the expression of the PIN genes by promoting the transcription of the auxin response regulator SHY2. Thereby, GA and DELLA proteins are seemingly implicated in the control of auxin transport and the coordination between cell division and cell differentiation during this stage of root growth and differentiation (Moubayidin et al., 2010). Taken together, the above-cited studies and observations from different plant species strongly suggest a crosstalk between GA and auxin transport. However, how precisely GA interferes at the molecular and cellular level with auxin transport is not understood as yet.

Here, we present physiological, cell biological, and developmental data that establish that GA is required for proper auxin transport in *Arabidopsis*. We show that the auxin transport impairment in GA mutants can be explained by a decrease in PIN auxin efflux facilitator abundance and reveal that the GA pathway interacts with PIN protein-dependent auxin transport and development during embryogenesis and root gravitropic responses.

RESULTS

Auxin Transport Is Reduced in GA Mutants

As part of a physiological characterization of GA mutants from *Arabidopsis*, we performed auxin transport measurements using sections from primary inflorescences of GA biosynthesis and signaling mutants: (1) *ga1* (SALK_109115; ecotype Columbia [Col]) is a GA *REQUIRING1* (*GA1*) loss-of-function allele that is impaired in an early step of GA biosynthesis due to an insertion in the gene encoding ENT-COPALYL DIPHOSPHATE SYNTHASE1 (Sun and Kamiya, 1994; Willige et al., 2007). Since this *ga1* allele normally does not bolt, the mutant was treated with gibberellic acid (GA3) to suppress its GA deficiency and to induce bolting. GA3 treatment was then omitted for 3 weeks to deplete the mutant of GA before auxin transport was measured from mutant inflorescences. (2) *gid1ac* (ecotype Col) is a loss-of-function mutant of two of three genes encoding the GID1 GA receptor (Willige et al., 2007). *gid1ac* is the most severe GID1 receptor mutant available for these studies because the GID1-deficient *gid1abc* mutant does not produce a stem and its GA response defect cannot be rescued by GA treatments (Willige et al., 2007). (3) *gai-1* (ecotype Landsberg *erecta*) is a dominant gain-of-function allele of the DELLA protein gene *GIBBERELLIC ACID INSENSITIVE* (*GAI*). *gai-1* constitutively represses GA signaling because it is unable to interact with the GA-bound GID1 due to a mutation in the DELLA domain required for GID1 interaction (Peng et al., 1997; Willige et al., 2007). When we examined each of the above-mentioned GA mutants with regard to auxin transport, we noted with interest that each of the tested mutants is compromised in auxin transport when compared with the respective Col and Landsberg *erecta* wild types (Figure 1). This suggests that proper GA biosynthesis and signaling are required for proper auxin transport.

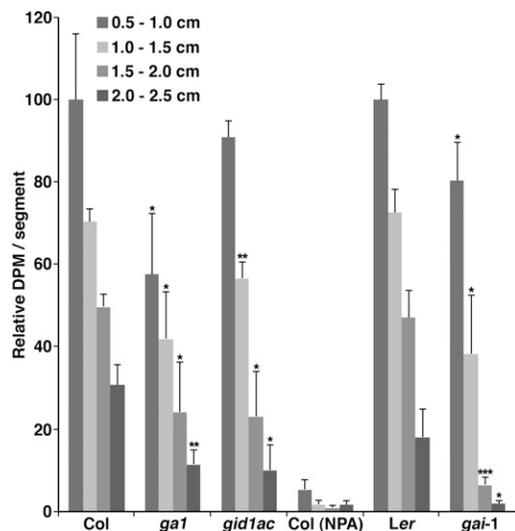


Figure 1. GA Biosynthesis and Signaling Are Required for Proper Auxin Transport.

Auxin transport was measured in primary inflorescence stem segments of *ga1*, *gid1ac*, and *gai-1* mutants and the respective *Col* and *Landsberg erecta* (*Ler*) wild types by placing a 2.5-cm stem segment in inverted orientation in a solution containing radiolabeled IAA. After 2 h, the lowermost 5-mm stem segment that had been in direct contact with the IAA solution was discarded, and IAA uptake was quantified by scintillation counting in four 5-mm segments. The distance of the respective individual stem segment from the IAA solution is indicated. In the presence of 100 μ M NPA, IAA transport is strongly reduced, indicating that active transport of IAA was measured. Three replicate measurements were analyzed in each experiment, and the experiment was repeated three times. The data for each mutant are expressed relative to the data of the first segment (0.5 to 1.0 cm) of the respective wild-type control. The average and the standard deviation of one experiment are shown. Significance values (Student's *t* test: *0.01 < *P* < 0.05; **0.001 < *P* < 0.01; ****P* < 0.001) denote the significance of the individual segments in comparison to the corresponding wild-type segment.

GA Is Required for PIN Protein Accumulation in Stems and Root Tips

Directional auxin transport requires the activities of AUX1/LAX auxin influx carriers and PIN auxin efflux facilitators. Since the reduction in auxin transport observed in GA mutants may be caused by differences in the abundance of these transport proteins, we next sought to examine PIN and AUX1 protein distribution and abundance in the wild type and in GA-deficient backgrounds. To this end, we looked at the cellular abundance and intracellular distribution of the auxin influx carrier AUX1 and the auxin efflux facilitators PIN1, PIN2, or PIN3 in the roots of transgenic lines expressing fluorescent protein-tagged versions of these proteins in solvent control-(mock)-treated seedlings and following treatments with the GA biosynthesis inhibitor paclobutrazol (PAC) (Rademacher, 2000). Via live-cell imaging, we did not observe any obvious differences in the abundance or distribution of AUX1:yellow fluorescent protein (YFP) following PAC treatment (see Supplemental Figure 1 online). However, we observed a considerable reduction in the abundance of PIN1:

green fluorescent protein (GFP), PIN2:GFP, and PIN3:GFP in the meristematic zone of roots after PAC treatment (Figure 2A). We then introgressed the *PIN:PIN:GFP* transgenes into the *ga1* background and could subsequently confirm the GA dependency of PIN protein abundance also in this GA-deficient background (Figure 2A). Neither in PAC-treated wild-type seedlings nor in the *ga1* background did we note a change in the polarity of the individual PIN:GFP proteins (see Supplemental Figure 2A online). A quantification of the respective fluorescence intensities revealed a reduction of plasma membrane-localized GFP signals to 18 and 28% in the case of PIN1 (*n* = 60 stele cells), 6 and 10% for PIN2 (*n* = 60 epidermal cells), and 37 and 33% of PIN3 (*n* = 60 stele cells) in the meristematic zone of root tips of PAC-treated seedlings or *ga1* mutants, respectively, when compared with the same region of roots from untreated wild-type seedlings (Figure 2B). In each case, the reduction in PIN protein levels could be suppressed by supplying the GA-deficient seedlings with GA3 for 24 h (Figures 2A and 2B) or by growing them on GA3-containing medium (see Supplemental Figure 3 online). Taken together, these findings thus reveal that PIN protein abundance in the meristematic zone of the root is modulated by GA. We further noted that this GA-dependent modulation of PIN levels is restricted to cells of the root meristem and is not observed in the elongation or differentiation zone of the root (see Supplemental Figures 2B and 2C online).

We then substantiated the live-cell imaging results on differential PIN protein accumulation in the root using immunoblots of PIN proteins. Because the live-cell imaging data had suggested that PIN protein levels are specifically reduced in the root meristematic zone, we examined the accumulation of PIN1 (and PIN1:GFP) as well as that of PIN2 by immunoblot using protein extracts prepared from entire roots as well as from dissected root tips (1.5 to 2 mm) of wild-type and *ga1* mutant seedlings (Figure 3A). In line with the observations made by live-cell imaging that PIN protein levels are dependent on GA only in the root tip, our immunoblot analysis of whole root protein extracts revealed that PIN protein levels are not modulated by the presence or absence of GA (Figure 3B, PIN1; Figure 3D, PIN1:GFP; Figure 3F, PIN2). More importantly, however, we found PIN levels to be reduced when we specifically analyzed protein extracts prepared from root tips (Figure 3C, PIN1; Figure 3E, PIN1:GFP; Figure 3G, PIN2). The quantification of immunoblots from three independent biological replicate samples performed with root tip protein extracts revealed a reduction in PIN protein accumulation to ~70% of the wild-type levels. Specifically, this quantification revealed a reduction for PIN1 to 72.4% \pm 11.1% (Figure 3C), for PIN1:GFP to 69.0% \pm 11.3% (Figure 3E), and for PIN2 to 68.6% \pm 5.4% (Figure 3G) when normalized to the respective loading control and compared with the wild type. That the reductions in PIN protein levels are smaller in the immunoblot analyses (Figure 3) than when observed by live-cell imaging (Figure 2) can be explained by the fact that the meristematic zone where differences in the accumulation of PIN1 and PIN2 are apparent by live-cell imaging is smaller (e.g., 0.5 to 0.6 mm in the case of PIN1:GFP) than what can be manually dissected for the preparation of protein extracts from root tips (1.5 to 2 mm) (Figure 3A). The differential accumulation of PIN protein in the root meristem is therefore partially masked by PIN

protein from the region above the meristem. In summary, we conclude that PIN protein levels are reduced in the root meristems of GA-deficient seedlings, inviting the conclusion that auxin transport and particularly auxin efflux is impaired in these seedlings.

Since our initial experiments revealed that auxin transport is reduced in inflorescence stem segments of GA biosynthesis and signaling mutants (Figure 1), we also examined whether PIN protein levels are modulated by GA in the shoot. To this end, we examined PIN1 protein accumulation in the inflorescence stems of *ga1*, *gid1ac*, and *gai-1* mutants. In agreement with the reduced auxin transport observed in these mutants (Figure 1), we found in each case reduced PIN protein accumulation when compared with the wild type (Figures 3H to 3J), inviting the conclusion that reduced PIN1 protein levels may be the cause for the mutants' reduced auxin transport.

PIN Gene Transcription Cannot Explain Differential PIN Protein Accumulation

The reduction of PIN protein levels in the root meristematic region in the absence of GA may be explained by reduced *PIN* transcription. We therefore examined *PIN* gene expression using previously established and characterized *PIN*: β -glucuronidase (*GUS*) reporter lines (Vietsen et al., 2005). This gene expression analysis showed that the expression of *PIN1*:*GUS* in the root tip is increased in the absence of GA and reduced following GA treatment (Figure 4A). Thus, the observed transcriptional regulation of *PIN1*:*GUS* does not explain the behavior of the PIN1 protein, which shows the opposite behavior in being reduced in the absence of GA and increased in its presence (Figures 2 and 3). The expression of *PIN2*:*GUS* was unaltered when the wild type and *ga1* were compared, and although PAC treatment of *PIN2*:*GUS* led to a reduction of *GUS* activity in the wild type, this effect was not GA-reversible, indicating that this PAC effect is not related to the effect of PAC on GA biosynthesis (Rademacher, 2000) (Figure 4B). In the case of *PIN3*:*GUS*, we did not observe any expression changes in *ga1* or following PAC treatment (Figure 4C). *PIN4*:*GUS*, which we did not analyze at the protein level, showed the same differential transcriptional regulation as *PIN1*:*GUS*, but these differences appeared less pronounced since the activity of this reporter in the wild type is considerably higher than that of *PIN1*:*GUS* (Figure 4D). In the case of *PIN7*:*GUS*, we noted a moderate and GA-reversible reduction of *PIN7*:*GUS* expression in the columella root cap under GA-deficient conditions (Figure 4E). Since we have not analyzed PIN7 distribution in the root, we cannot correlate this observation with the behavior of the corresponding PIN7 protein. Taken together, we conclude from our gene expression analysis of the individual *PIN* genes that their gene expression behavior does not explain the differential GA-dependent accumulation of the PIN proteins that we observed in the GA biosynthesis and signaling mutants.

GA Deficiency Promotes Vacuolar Degradation of PIN2:GFP

We next turned to examine the cellular behavior of PIN2:GFP, which is already well understood with regard to its intracellular trafficking and its vacuolar turnover (Kleine-Vehn et al., 2008). We

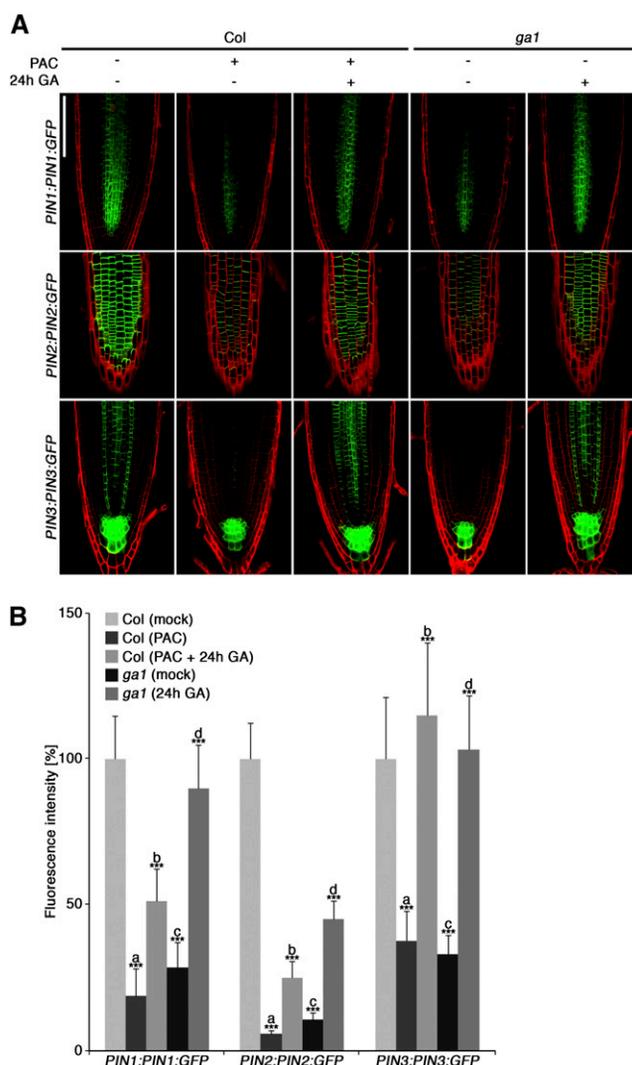


Figure 2. Cell Biological Evidence for a Reduction of PIN Protein Abundance in GA-Deficient Backgrounds.

(A) Confocal scans of the stele region (PIN1:GFP and PIN3:GFP) and the epidermis (PIN2:GFP) of root tips of 7-d-old wild-type (*Col*) and *ga1* mutant seedlings. For PAC and GA treatments of wild-type seedlings (*Col*), 4-d-old seedlings were transferred to media containing 10 μ M PAC and grown for an additional 2 d. The seedlings were then transferred and grown for 24 h on 10 μ M PAC without or with 10 μ M GA3 (24 h GA). *ga1* mutants were transferred after 6 d to medium containing 10 μ M GA3 (or a solvent control) and analyzed after 24 h. Identical microscope settings were used to image each individual PIN:GFP protein. Bar = 0.1 mm.

(B) Quantification of the fluorescence signals from cells as shown and imaged in **(A)**. For each quantification, fluorescence of the basal membrane (PIN1:GFP and PIN3:GFP) or the apical membrane (PIN2:GFP) of at least 60 cells was measured using the Olympus FV1000 software. Intensities are shown relative to mock-treated *Col* wild-type cells. Average and standard deviation are shown for each quantification. In a Student's *t* test, all differences are extremely statistically significant (***P* < 0.001). a, b, c, and d denote the respective pairs used for comparison: a, *Col* (mock) to *Col* (PAC); b, *Col* (PAC) to *Col* (PAC + 24 h GA); c, *Col* (mock) to *ga1* (mock); d, *ga1* (mock) to *ga1* (24 h GA).

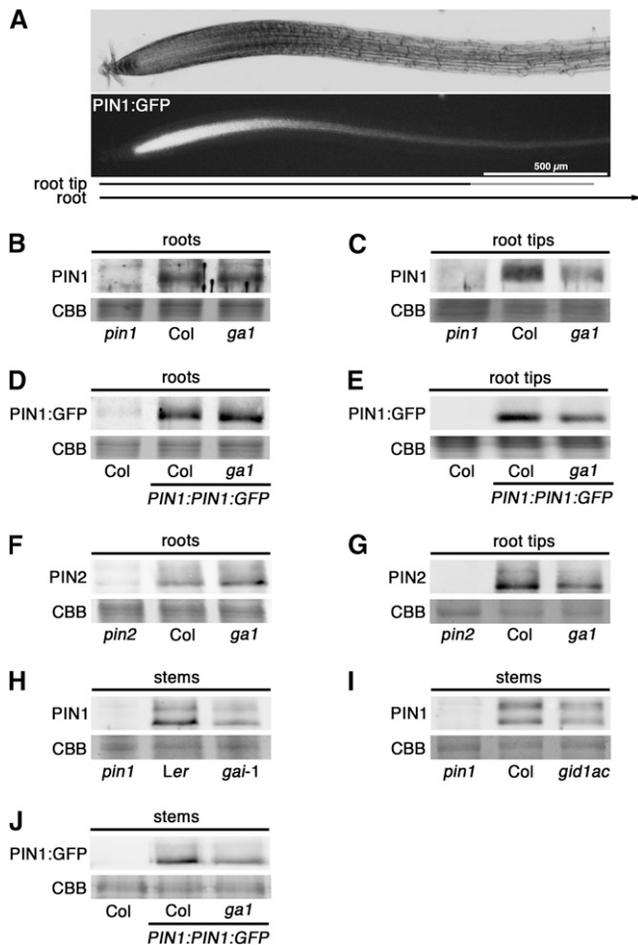


Figure 3. Biochemical Evidence for a Reduction of PIN Protein Levels in GA Mutant Backgrounds.

(A) Bright-field and fluorescence images of an *Arabidopsis* *PIN1:PIN1:GFP* transgenic root. The black and gray lines under the root images indicate the 1.5- to 2-mm root tip that was dissected to prepare root tip-specific protein extracts. The black line corresponds to 0 to ≤ 1.5 mm, and the gray line corresponds to >1.5 to 2 mm.

(B) and **(C)** Immunoblots with anti-PIN1 antibody of total protein extracts (15 μ g) prepared from roots **(B)** and root tips **(C)** of 7-d-old *pin1*, wild-type, and *ga1* seedlings.

(D) and **(E)** Immunoblots with anti-GFP antibody of total protein extracts (15 μ g) prepared from roots **(D)** and root tips **(E)** of 7-d-old wild-type and *PIN1:PIN1:GFP* as well as *ga1 PIN1:PIN1:GFP* seedlings.

(F) and **(G)** Immunoblots with anti-PIN2 of membrane protein extracts prepared from 45 μ g total protein of 7-d-old seedling roots from *pin2*, wild-type (Col), and *ga1* mutants **(F)** or total protein extracts (15 μ g) prepared from root tips **(G)**.

(H) to **(J)** Immunoblots with anti-PIN1 antibody **(H)** and **(I)** and anti-GFP antibody **(J)** of total protein extracts (15 μ g) prepared from stems of the GA pathway mutants, their respective wild-type controls, and *pin1* mutant or nontransgenic controls as indicated. Particularly obvious in these immunoblots is the detection of two PIN1-specific bands, which we suggest to correspond to unmodified and posttranslationally modified variants of PIN1, such as phosphorylated PIN1 (Zourelidou et al., 2009). Coomassie blue (CBB)-stained protein bands of the control gels (below each blot) serve as loading controls.

examined the vacuolar targeting of PIN2:GFP in the wild type and *ga1* mutants using Concanamycin A (ConA), which blocks protein degradation in the vacuole by inhibiting vacuolar H-ATPase activity and vacuole acidification (Páli et al., 2004). In this experiment, we observed more cells with a vacuolar PIN2:GFP signal per seedling in *ga1* (experiment 1: 50.3%, $n = 230$ cells; experiment 2: 56.3%, $n = 477$ cells) than in the wild type (experiment 1: 41.6%, $n = 278$ cells; experiment 2: 44.0%, $n = 572$ cells) (Figures 5A and 5B). The effect of ConA on PIN2:GFP vacuolar targeting was even more pronounced when we examined the effect of the drug using immunoblots of root tips dissected from ConA-treated *ga1* and wild-type seedlings (Figure 5C). Whereas PIN2 levels were much lower in the extracts from untreated *ga1* seedling root tips (see also Figure 3G), PIN2 accumulated to similar levels in *ga1* and the wild type following ConA treatment (Figure 5C). We interpret this finding as demonstrating that similar amounts of PIN2 protein are translated in the wild type and the *ga1* mutant but that more PIN2 protein is targeted to the vacuole in *ga1*, leading ultimately to a reduction of PIN2 abundance in *ga1* (Figure 5C). The conclusion that there is a differential GA-dependent targeting of PIN2 to the vacuole is further substantiated by our observation that the basal levels of PIN2 are increased in a GA3-treated *ga1* mutant when compared with the untreated (mock) *ga1* control (Figure 5D). Importantly, the differential accumulation of PIN2 is also observed in immunoblots when vacuolar protein targeting was inhibited by Wortmannin (WM), a drug that blocks the transport of PIN2 from the prevacuolar compartment to the vacuole (Figure 5E) (Matsuoka et al., 1995). In summary, our data suggest that the decrease of PIN2 levels at the plasma membranes of root tip cells in *ga1* is the result of an increased vacuolar targeting of PIN2 in the absence of GA.

GA Promotes Proper Cotyledon Differentiation together with PIN1

In order to evaluate the contribution of GA signaling to PIN- and auxin transport-regulated development, we subsequently examined the morphology of *ga1* mutant seedlings with regard to phenotypes that may be explained by defects in auxin transport (Friml, 2003; Weijers and Jürgens, 2005; Benjamins and Scheres, 2008). *pin1* mutants or wild-type embryos treated with the auxin transport inhibitor *N*-1-naphthylphthalamic acid (NPA) have defects in cotyledon morphology, positioning, and number (Gälweiler et al., 1998; Hadfi et al., 1998; Zourelidou et al., 2009). Although these phenotypes appear only with a relatively low penetrance in *pin1* mutants (13.3%; $n = 97$ [of 388 *pin1/PIN1*]), the occurrence of these phenotypes is commonly explained by defects in auxin transport or signaling (Figures 6A and 6B). We wanted to examine whether GA contributes to auxin transport-dependent processes during embryogenesis but were facing the problem that GA treatment is needed to promote flower development and fertility in the *ga1* mutant. To avoid an effect of GA3 treatments on the development of *ga1* mutants during embryogenesis, we omitted GA application after flower formation when preparing seeds for the analysis described below. In *ga1* mutants that were generated in this way, we noted that *ga1* seedlings (1.8%; $n = 443$) have the typical cotyledon defects of *pin1*

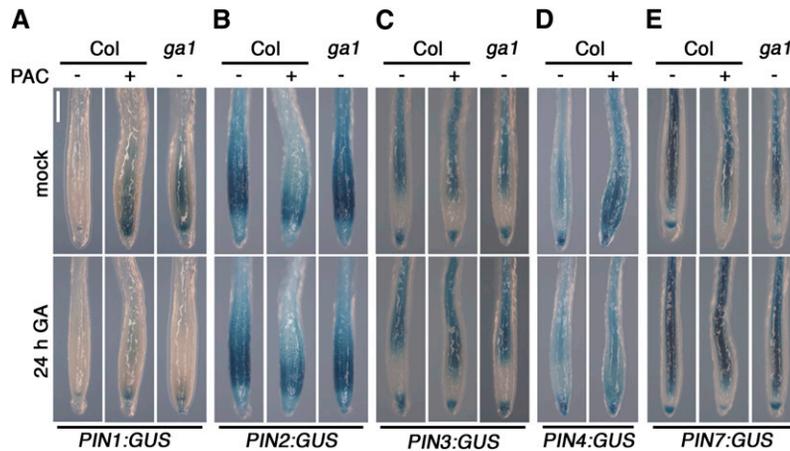


Figure 4. *PIN* Gene Expression in Root Tips Does Not Explain Differences in PIN Protein Abundance in the Absence of GA Biosynthesis.

Photographs of wild-type and *ga1* seedling root tips expressing promoter:*GUS* fusions of *PIN1:GUS* (A), *PIN2:GUS* (B), *PIN3:GUS* (C), *PIN4:GUS* (D), and *PIN7:GUS* (E). Seven-day-old seedlings were stained for *GUS* activity. PAC and GA3 treatments were performed in an identical manner to that described in Figure 2. *PIN4:GUS* was not introgressed into the *ga1* background. Bar = 0.2 mm.

mutants (Figures 6A and 6B). Importantly, we noticed a strong increase in the number of such seedlings when we combined the *ga1* and *pin1* mutations (25%; $n = 225$ [of 900 *ga1 pin1/PIN1* progeny seedlings]). Strikingly, the number of phenotypic seedlings exceeded the calculated sum (15.1%) for such seedlings from the single mutants (1.8% for *ga1* and 13.3% for *pin1*). Since homozygous *pin1* or *ga1 pin1* seedlings can be obtained only as segregants from (*ga1/ga1 pin1/PIN1*) heterozygous parents, we confirmed the correlation of the cotyledon phenotypes with the *ga1* and *pin1* mutations by genotyping. Among 35 cotyledon-defective seedlings from the progeny of a *ga1/ga1 pin1/PIN1* parent plant, we found that all but one of the tested seedlings was homozygous for the *pin1* mutation (Figure 6C). We thus conclude that *GA1* (and consequently GA biosynthesis) is needed for proper cotyledon development and suggest that *GA1* and *PIN1* interact genetically. Since we had observed that GA pathway mutants have decreased auxin transport (Figure 1) and that PIN protein levels are reduced in GA pathway mutants (Figures 2 and 3), we suggest that the cotyledon phenotypes observed in *ga1* and *ga1 pin1* double mutants are a consequence of defects in GA-dependent auxin transport regulation.

GA Is Required for Proper Root Gravitropism

We next tested the role of GA biosynthesis and signaling in root gravitropism, which requires the auxin efflux facilitator PIN2. Roots of *pin2* mutants fail to establish a lateral auxin maximum that is formed in the root tip following gravistimulation, and *pin2* mutants are fully agravitropic (Luschnig et al., 1998; Ottenschläger et al., 2003). When we examined gravitropic responses in *ga1* mutant roots as well as in the three possible double mutant combinations of the three *GID1* receptor genes, we found that each of the tested mutants is less gravitropic than the wild type (Figure 7A; see Supplemental Figure 4 online). To test whether the defect in gravitropic response is mediated by DELLA proteins, we also examined the *ga1 gai-t6 rga-t2 rgl1-1 rgl2-1*

mutant, which lacks four of the five functionally redundant *Arabidopsis* DELLA repressors. In this analysis, we found that the partial agravitropism of *ga1* roots is fully suppressed in the absence of DELLA protein function (Figure 7A), allowing us to conclude that proper root gravitropism requires GA biosynthesis and DELLA repressor-mediated GA signaling.

Root gravitropic responses correlate with a redistribution of auxin in the root tip and the establishment of a new lateral auxin maximum, which can be monitored with the auxin (response) reporter *DR5:GUS* (Sabatini et al., 1999), allowing the visualization of the formation of an asymmetric *GUS* signal at the lower side of the gravistimulated root. We therefore examined *DR5:GUS* activity and distribution in root tips following gravistimulation of wild-type and *ga1* mutant seedlings. Here, we found that the establishment of the new lateral auxin (*DR5:GUS*) maximum at the lower side of the root tip is significantly delayed in the *ga1* mutant (Figures 7B and 7C). Whereas almost all of the tested wild-type seedlings ($n \geq 22$) established the new *GUS* expression maximum within 2 h following gravistimulation, only 9 and 68% of the *ga1* mutant seedlings ($n \geq 18$) had established the lateral auxin maximum at 2 and 4 h after gravistimulation, respectively. Thus, the observed delay in gravitropic root bending in *ga1* correlates with the reduction of PIN and PIN2 protein levels as well as with a delay in the PIN2-dependent lateral distribution of the *DR5:GUS* expression peak and auxin maximum.

DISCUSSION

In this study, we examine the contribution of GA to auxin transport and auxin transport-regulated growth and development in *Arabidopsis*. Our interest in the crosstalk of these two hormones was triggered by the observation that auxin transport is decreased in GA biosynthesis and signaling mutants from *Arabidopsis* (Figure 1). PINs are the major auxin efflux facilitators

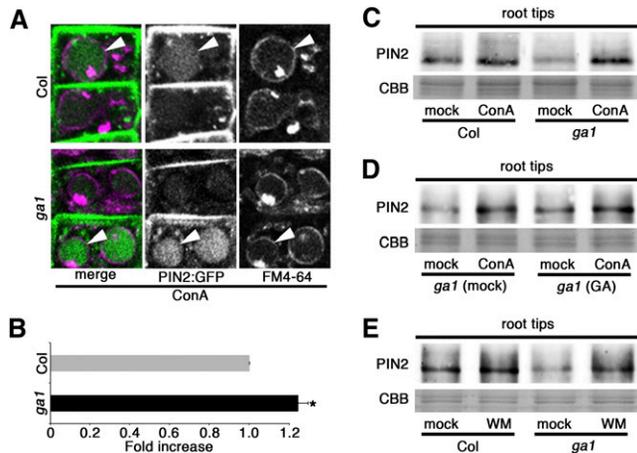


Figure 5. PIN2 Abundance in the Vacuole Is Increased and Hypersensitive to ConA and WM in *ga1*.

(A) Confocal images of epidermis cells of *PIN2::PIN2::GFP*-expressing wild-type and *ga1* seedling roots treated for 7 h with 1 μ M ConA. On the left, FM4-64 (magenta) and PIN2:GFP (green) are shown in an overlay image (merge). FM4-64 is used to stain the tonoplast (right panels), and PIN2:GFP is shown in the middle panels. Arrowheads indicate PIN2:GFP-accumulating and FM4-64-labeled vacuoles. Laser settings were adjusted so that comparable PIN2:GFP signal intensities were obtained in wild-type and *ga1* seedlings.

(B) Quantification of the number of cells per seedling containing PIN2:GFP-accumulating vacuoles in the wild type (Col) and in *ga1*. Two experiments were performed. $n = 278$ cells from six wild-type (Col) seedlings and $n = 230$ cells from seven *ga1* seedlings were examined in the first experiment; $n = 572$ from 11 wild type (Col) and $n = 477$ from 10 *ga1* seedlings were examined in the second experiment. The results are expressed as the fold increase and standard deviation in the number of cells with PIN2:GFP-accumulating vacuoles per seedling. The asterisk denotes the significance (Student's *t* test $P < 0.05$) of the average of both experiments with regard to the wild type (Col).

(C) to (E) Immunoblot with anti-PIN2 on total protein extract (10 μ g) prepared from root tips of 6-d-old seedlings treated with 1 μ M ConA for 7 h [(C) and (D)] or 33 μ M WM for 6 h (E). The immunoblot in (D) was performed with *ga1* seedlings grown on 1 μ M GA3 or on a solvent control (mock). Coomassie blue (CBB)-stained protein bands of the control gels serve as loading controls.

in *Arabidopsis*, and we show that the auxin transport defect of the GA pathway mutants and their auxin transport-dependent phenotypes, which we discuss below, can best be explained by a reduction of PIN protein levels (Figures 2 and 3). At the same time, we did not observe any changes in PIN protein polarity (Figures 2 and 4; see Supplemental Figure 2A online), and we therefore hypothesize that the reduction in auxin transport is the consequence of a reduction of PIN protein abundance rather than that of a change in the direction of auxin transport.

We also sought to understand the mechanisms that lead to a reduction of PIN protein levels in the GA mutants. To this end, we examined different *PIN* gene promoter GUS lines and their response to the lack of GA, either by introducing these transgenes into the *ga1* background or by inhibiting GA biosynthesis with PAC (Figure 4). For *PIN2* and *PIN3*, we did not observe any effects of GA on their expression in the root meristem where we

had observed major GA-dependent changes in the accumulation of their protein products. For two *PIN* genes, *PIN1* and *PIN4*, we found a GA-dependent decrease of *PIN* gene transcription, while PIN1 protein showed the opposite behavior (PIN4 was not tested in our study). It may thus be envisioned that the loss of PIN protein levels and the concomitant loss of auxin efflux leads, at least in the case of PIN1, to the activation of a compensatory

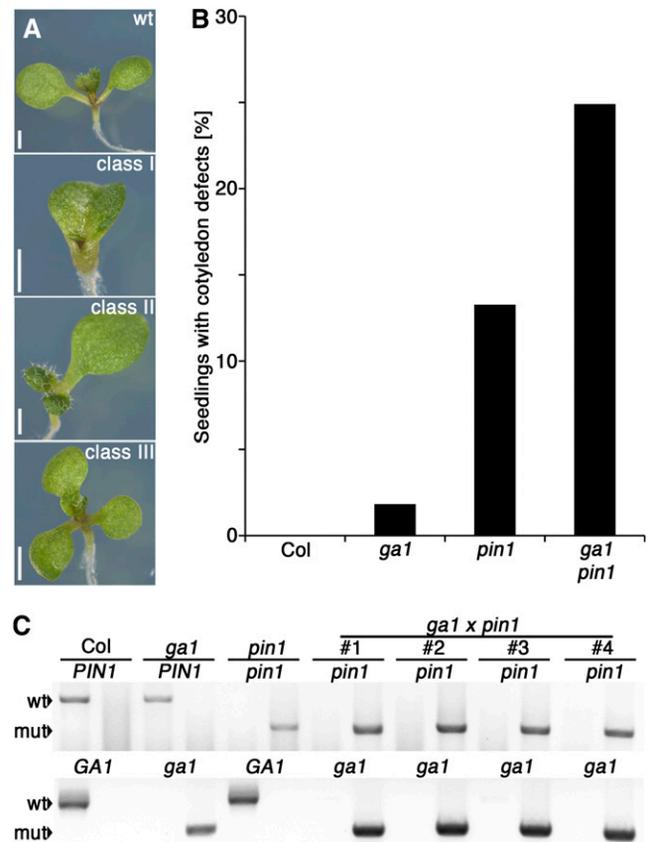


Figure 6. GA Biosynthesis Is Required for Normal Seedling Development.

(A) Photographs of 8-d-old *ga1* seedlings with wild-type (wt) or mutant morphology with fused cotyledons (class I), single cotyledons (class II), and triple cotyledons (class III). Mutants with similar cotyledon defects have been described for *pin1* mutants. Bar = 1 mm.

(B) Frequency of seedlings with cotyledon defects as shown in (A) in the wild type (Col; $n = 424$), in *ga1* ($n = 443$) and *pin1* ($n = 97$ of 388) single mutants, as well as in *ga1 pin1* ($n = 225$ of 900) double mutants. The frequency of homozygous *pin1* seedlings was calculated based on the expectation that 25% of the progeny of the *pin1/PIN1* GA1/GA1 and the *pin1/PIN1 ga1/ga1* parent lines segregate for the *pin1/pin1* genotype. The GA1 and PIN1 loci are on different chromosomes and therefore segregate independently.

(C) The homozygosity for the mutant *pin1* locus was confirmed by genotyping for all but one of 35 progeny seedlings of a *pin1/PIN1 ga1/ga1* parent that displayed aberrant cotyledon morphology. Shown is a representative genotyping result for GA1, PIN1, and the corresponding mutant (mut) alleles from individual seedlings of the indicated genotypes. [See online article for color version of this figure.]

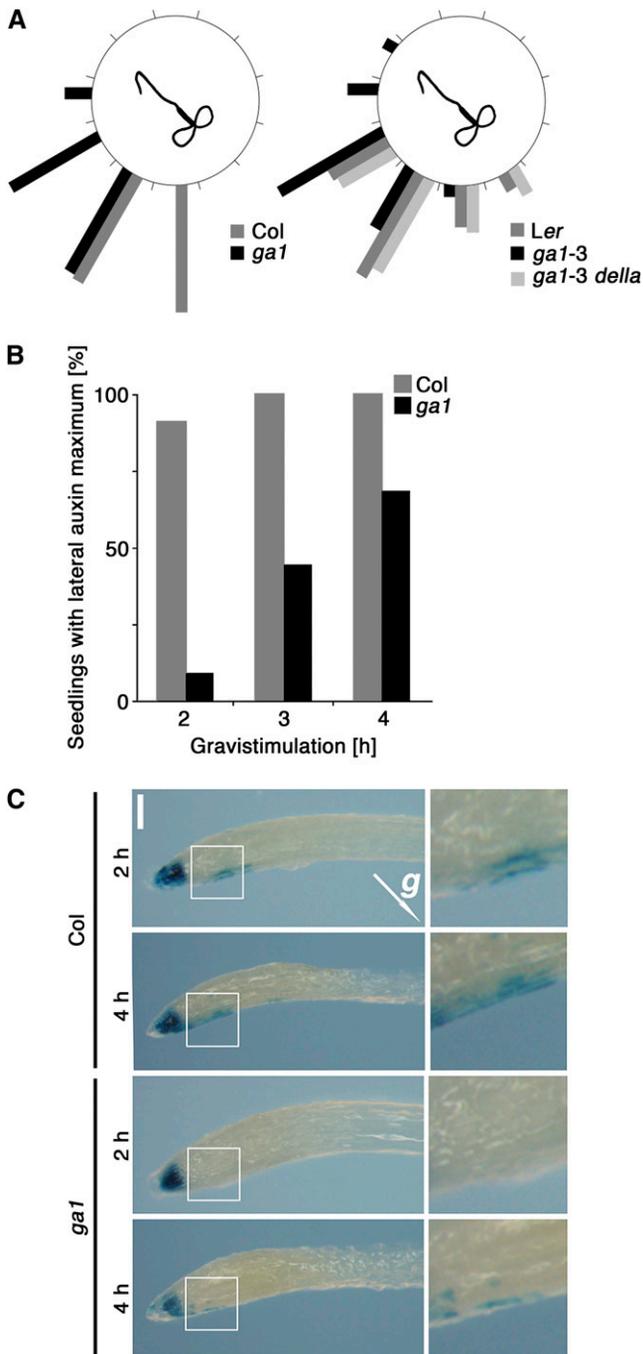


Figure 7. Reduced Gravitropic Response in the GA Biosynthesis Mutant *ga1*.

(A) Root gravitropic response histogram of two *ga1* alleles and their respective Col and Landsberg *erecta* (*Ler*) wild types as well as a *ga1-3 della* (*ga1-3 gai-t6 rga-t2 rgl1-1 rgl2-1*) mutant where GA signaling is derepressed due to loss-of-function mutations in four of the five DELLA protein genes from *Arabidopsis*. At least 36 seedlings were scored of each genotype.

(B) Quantification of seedlings with a lateral auxin maximum at the lower side of the root tip expressing the reporter GUS from the *DR5:GUS* auxin (response) reporter transgene following gravistimulation for 2, 3, and 4 h.

transcriptional feedback mechanism. The existence of such compensatory transcriptional feedback mechanisms has already previously been postulated in a study that showed that the loss of individual *PIN* genes results in the transcriptional upregulation of other *PIN*s (Vietsen et al., 2005). In summary, our analysis indicates that the transcriptional regulation observed with the GUS reporters does not reflect the differences in *PIN* protein abundance that can be observed in the same backgrounds (Figures 2 and 3). Notably, our finding that GA is not a major positive regulator of *PIN* gene transcription is different from the role of GA previously reported in a study that examined the contribution of the DELLA protein RGA to the transcription of the AUX/IAA-type regulator *SHY2*, which is a transcriptional repressor of *PIN* gene expression, notably of *PIN1*, *PIN3*, and *PIN7*, in the transition zone of the root meristem of young seedlings (Dello loio et al., 2008; Moubayidin et al., 2010). There, it had been observed that the transcription of *SHY2* is dependent on the presence and absence of the DELLA protein RGA. From this observation it was inferred that *PIN* gene transcription and *PIN* protein abundance, and consequently directional auxin transport, may be regulated in a DELLA- and GA-dependent manner in the transition zone of the root meristem (Moubayidin et al., 2010). We now show that in addition to this transcriptional regulation mechanism, which applies to the root transition zone, another regulatory mechanism exists that cannot be explained by transcriptional regulation. Since transcriptional regulation mechanisms could not explain the GA-dependent differences in *PIN* protein abundance, we turned to examining the behavior of *PIN2:GFP*. In these analyses, we observed a more pronounced increase in the vacuolar abundance of *PIN2:GFP* in *ga1* mutants following ConA treatment, which blocks the acidification of the vacuole and thereby impairs vacuolar proteolysis. In agreement with this observation, we found a stronger increase in the abundance of *PIN2* also in immunoblots of protein extracts prepared from root tips of ConA-treated *ga1* seedlings. Importantly, the effect of ConA on *PIN2* accumulation in *ga1* mutants could be suppressed by GA treatment, indicating that the process can directly be modulated by the hormone. WM treatment, which blocks the vacuolar transport of *PIN* proteins, also led to a stronger increase in *PIN2* protein levels in root tips. Our cell biological and immunoblot analyses therefore suggest that the differential GA-dependent accumulation of *PIN* proteins can at least in part be explained by increased *PIN* vacuolar targeting. Through which trafficking pathway *PIN* protein is targeted to the vacuole as well as which GA-dependent regulator controls *PIN* vacuolar targeting remains to be elucidated. Since we noted that the effect of GA on *PIN* accumulation is not immediate but requires several hours, we are tempted to speculate that *PIN* vacuolar targeting is controlled by an as yet unknown de novo

$n \geq 22$ (Col *DR5:GUS*) and $n \geq 18$ (*ga1 DR5:GUS*) per time point and genotype.

(C) Representative photographs of *Arabidopsis* roots of Col *DR5:GUS* and *ga1 DR5:GUS* seedlings following a 2 and 4 h of gravistimulation. The panels on the right are a magnification of the framed area of the roots shown on the left. The arrow indicates the gravity vector *g*. Bar = 0.1 mm.

synthesized transport regulator downstream from the GA signaling pathway.

In our studies, we also demonstrate a role for GA in two auxin transport-dependent processes, cotyledon development and root gravitropism, that, taken together, correlate with the reduction in auxin transport that we infer from the reduction of PIN protein levels that can be observed in GA pathway mutants. Defects in the proper initiation, positioning, and development of cotyledons are hallmark phenotypes of mutants deficient in auxin transport, such as *pin1* (Galweiler et al., 1998), or auxin transport regulatory kinases, such as *pid* (Benjamins et al., 2001) and *d6pk* (Zourelidou et al., 2009). We observed several defects in cotyledon development in GA-deficient *ga1* mutants (Figure 6A); however, they were seen only when care was taken to avoid the suppression of the GA deficiency of the *ga1* mutant by omitting GA treatments after flower formation and during embryogenesis. As is normally the case for cotyledon development defects (Hadfi et al., 1998; Zourelidou et al., 2009; Huang et al., 2010), the penetrance of this phenotype in *ga1* was relatively low but strongly increased in the presence of the sensitizing *pin1* mutation (Figure 6). We thus conclude that GA is required in addition to PIN1 to promote proper auxin transport-dependent development during cotyledon formation. This establishes a previously unrecognized role for GA in cotyledon development with regard to auxin transport and auxin transport regulation. At least one previous study reports a cotyledon formation defect in a mutant with altered GA levels; however, this observation was not discussed in the context of auxin transport or auxin signaling (Singh et al., 2010). In that work, seedlings with altered cotyledon numbers were observed among the progeny of transgenic lines in which GA levels were reduced due to the misexpression of a GA catabolic *GA2OX/DASE* gene. Based on our observation that the *ga1* mutant also has cotyledon formation defects and the correlation of this phenotype with altered PIN protein abundance, it may now be argued that the reduction of GA, and consequently PIN-mediated auxin transport, is causative for the seedling phenotypes observed in the previous study (Singh et al., 2010).

We further demonstrate that GA is involved in root gravitropism, a process that strictly requires the activity of PIN2 (Figure 7). Importantly, we find that GA contributes to, but is not strictly required for, root gravitropic responses. Since we also show that the reduced gravitropism of GA mutants correlates with a reduction of the formation of a new lateral auxin maximum in the root tip, we argue that GA regulates PIN protein levels and thereby promotes the redistribution of auxin that is required for root tip bending.

In summary, we propose that GA promotes developmental and growth processes that require auxin transport mediated by PIN auxin efflux facilitators (Figure 8). Based on this finding, it may be speculated that the growth defects of GA biosynthesis and signaling mutants are a result of altered auxin transport. However, experiments that would address the question of whether auxin transport defects repress growth at the whole plant level are difficult to perform since they may require the tissue-specific overexpression of different PIN proteins uncoupled from their posttranslational regulation mechanisms. Since our analysis of the root gravitropism phenotype suggests that

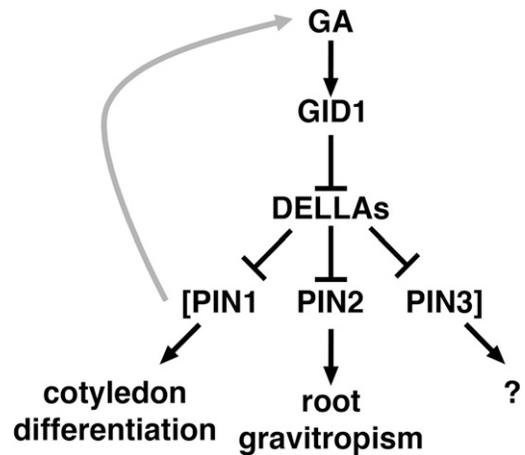


Figure 8. Model of the Proposed Role of GA and GA Signaling in the Regulation of PIN Protein Abundance and PIN-Mediated Development and Growth Responses.

GA promotes the derepression of DELLA repressors by inducing their degradation via GID1 and SCF^{SLY1} (data not shown). DELLA repressor degradation is required for normal PIN protein accumulation at the plasma membrane. In the case of PIN2, this regulation involves the differential GA-dependent targeting of the protein to the vacuole. Transcriptional regulation cannot explain the differences in protein abundance that we observed for PIN1, PIN2, and PIN3. The gray arrow makes reference to previous publications that show that a reduction of (PIN-mediated) auxin transport leads to stimulation of the expression of GA biosynthesis genes (Fu and Harberd, 2003; Frigerio et al., 2006).

these responses require GA as well as the suppression of DELLA repressor activity (Figure 7), we propose that the DELLA repressors may regulate the transcription of a gene required for PIN vacuolar targeting. The identification of such GA-dependent regulators will be the subject of further studies.

METHODS

Biological Material

ga1 (SALK_109115), *ga1-3*, *ga1-3 gai-t6 rga rgl1-1 rgl2-2 (ga1-3 della)*, *gai-1*, *gid1a-1* (SALK_044317) *gid1b-1* (SM_3_30227) (*gid1ab*), *gid1a-1 gid1c-2* (GABI_639F05) (*gid1ac*), *gid1b-1 gid1c-2 (gid1bc)*, and *pin1* (SALK_047613) mutants were previously described and characterized (Peng et al., 1997; Achard et al., 2006; Willige et al., 2007; Zourelidou et al., 2009). *pin2* (SALK_042899) mutant lines (*Arabidopsis thaliana* Col) were identified in the SIGNAL database (<http://signal.salk.edu/cgi-bin/tdnaexpress>) and obtained from the Nottingham Arabidopsis Stock Centre. *PIN1:PIN1:GFP*, *PIN2:PIN2:GFP*, *PIN3:PIN3:GFP*, and *AUX1:YFP:AUX1* were gifts from Jiri Friml, Christian Luschnig, Masao Tasaka, and Malcolm Bennett, respectively (Swarup et al., 2001; Benková et al., 2003; Abas et al., 2006; Zádňíková et al., 2010). Transgenic lines expressing *PIN1:GUS*, *PIN3:GUS*, and *PIN7:GUS* were previously described (Vieta et al., 2005) and obtained from the Nottingham Arabidopsis Stock Centre, and *PIN2:GUS* and *PIN4:GUS* (Vieta et al., 2005; Abas et al., 2006) were gifts from Christian Luschnig. *DR5:GUS* was a gift from Tom Guilfoyle. Wild-type and mutant *GA1* and *PIN1* loci were identified by PCR-based genotyping using the primers 5'-CAGACCC-GAGACAGTAACTGC-3' and 5'-TCTCTACTCGAGGCAAGCTTG-3' to

test for *GA1* and 5'-TCTTACTCTCGAGGCAAGCTTG-3' together with LBb1-3 to test for the T-DNA insertion in *ga1* (SALK_109115); wild-type *PIN1* was detected with the primers 5'-CAAAAACACCCCCAAAATTTTC-3' and 5'-AATCATCACAGCCACTGATCC-3' and 5'-AATCATCACAGCCA-CGTGATCC-3' together with LBb1-3 to test for *pin1* (SALK_047613).

ga1 mutant seeds were incubated at 4°C in 20 μM GA3 (*ga1-3*) and 100 μM GA3 (*ga1* SALK_109115) for 5 d to induce germination. Seeds were then thoroughly washed five times in water and grown on standard growth medium (Murashige and Skoog [MS] medium/1% Suc). Adult plants were grown on standard soil mixtures. To rescue the phenotype of *ga1* mutants, plants were sprayed repeatedly with 100 μM GA. GA treatment was omitted after flower formation when growing the *ga1* and *ga1 pin1/PIN1* mutants to be able to assess the contribution of GA biosynthesis to embryo development.

Auxin Transport Measurements

For auxin transport measurements, 25-mm stem segments were cut above the rosette of 6- to 7-week-old wild-type or mutant plants and placed for 30 min in an inverted orientation in 30 μL auxin transport buffer (500 pM IAA, 1% Suc, and 5 mM MES, pH 5.5). The stem segments were then transferred to auxin transport buffer containing 11 kBq (417 nM) radiolabeled [3H]IAA (GE Healthcare), with or without 100 μM NPA. After 2 h, the lowermost 5-mm segment was discarded because it was in direct contact with the radiolabeled [3H]IAA and 5-mm segments were dissected from the stem and macerated overnight in 300 μL Hydroxide of Hyamine 10-X (Packard Instrument Company). The solution was then neutralized by the addition of 300 μL acetic acid, and the uptake of [3H]IAA was quantified using a Wallac WinSpectral 1414 liquid scintillation counter (Perkin-Elmer Life Sciences). Three replicate measurements were performed for each genotype, and the experiment was repeated three times with reproducible results. The result of one experiment is shown.

Physiological Experiments

Gravitropic responses were measured in seedlings grown on vertically oriented plates containing MS medium/1% Suc. Seven-day-old seedlings were then transferred to the dark and kept in a vertical orientation for an additional 2 h. Subsequently, plates were reoriented by 135° and scanned after 6 h to determine their root angles using ImageJ software (NIH).

Cell Biology

For GUS staining of *PIN:GUS* lines, 7-d-old seedlings were fixed in heptane for 15 min and stained for 30 min (*PIN2:GUS*), 2 h (*PIN3:GUS*, *PIN4:GUS*, and *PIN7:GUS*), or 16 h (*PIN1:GUS*) with GUS-staining solution [100 mM Na-phosphate buffer, pH 7.0, 2 mM K₄Fe(CN)₆, 2 mM K₃Fe(CN)₆, 0.1% Triton X-100, and 1 mg/mL X-Gluc] and subsequently destained in 70% ethanol. For GUS staining of gravistimulated *DR5:GUS* transgenic lines, seedlings were incubated in GUS-staining solution [100 mM Na-phosphate buffer, pH 7.0, 0.5 mM K₄Fe(CN)₆, 0.5 mM K₃Fe(CN)₆, 0.5% Triton X-100, and 1 mg/mL X-Gluc] for 16 h. GUS-stained seedlings were analyzed and photographed using a Leica MZ16 stereomicroscope with a PLAN-APOX1 objective (Leica). The number of seedlings with an asymmetric *DR5:GUS* maximum at the lower side of the root tip was quantified following GUS staining at 0, 2, 3, and 4 h after reorientation of 7-d-old seedlings to 135° (Figure 7B).

Fluorescence microscopy for identifying PIN:GFP and YFP:AUX1 distribution was performed using an Olympus BX61 fluorescence microscope with an XM10 digital black-and-white camera and a UPlanFL 4× objective (Olympus) or a FV1000/IX81 laser scanning confocal microscope with UAPO40XW3/340 (Figure 2A) and UPLSAPO60XW/1.2 ob-

jectives (Figures 2B, 5A, and 5B). Images were obtained and processed using the cellSens Dimension or FluoView software.

For PAC and GA treatments of wild-type seedlings (Col), 4-d-old seedlings were transferred to media containing 10 μM PAC and grown for an additional 2 d. The seedlings were then transferred and grown for 24 h on 10 μM PAC (PAC) without or with 10 μM GA3 (24 h GA). *ga1* mutants were transferred after 6 d to medium containing 10 μM GA3 (or a solvent control) and analyzed after 24 h. For FM4-64 staining, seedlings were incubated in 1 μM FM4-64 (Invitrogen) for 10 min 5 to 7 h before microscopy. For ConA (1 μM) treatment, 5- to 8-d-old seedlings were grown in standard growth medium (MS medium/1% Suc) supplemented for 7 h with the inhibitor.

Protein Extraction and Immunoblotting

Total protein extracts were prepared in extraction buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.5% Triton X-100, 10 μM MG132, 0.1 μM PMSF, and protease inhibitor cocktail [Sigma-Aldrich]). When detected from roots, nonspecific background bands were detected in PIN2 immunoblots from total protein extracts. To solve this problem, proteins were extracted from microsomal membrane fractions in this case. To this end, plant roots were homogenized in extraction buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 50 mM EDTA, 50 mM NaF, 10 mM NaVO₃, 10 μM MG132, 0.1 μM PMSF, and protease inhibitor cocktail). Extracts were centrifuged for 5 min at 10,000g, and the supernatants were further centrifuged for 1 h at 100,000g in a Sorvall MTX 500 benchtop centrifuge (ThermoScientific). P100 Pellets were homogenized in 2× Laemmli and heated by 45°C for 5 min prior to loading onto the gels for immunoblotting. For ConA (1 μM) and WM (33 μM) treatments, 6-d-old seedlings were grown in standard growth medium (MS medium/1% Suc) supplemented with the inhibitors for 7 and 6 h, respectively. Anti-GFP (1:3000; Invitrogen), anti-PIN1 (1:4000; Nottingham Arabidopsis Stock Centre), and anti-PIN2 (1:3000; Agrisera) were used for immunoblotting. Coomassie Brilliant Blue-stained gels were used to control for equal loading.

Accession Numbers

Arabidopsis Genome Initiative locus identifiers for the genes mentioned in this article are as follows: *AUX1* (AT2G38120), *GA1* (AT4G02780), *GAI* (AT1G14920), *GID1A* (AT3G05120), *GID1B* (AT3G63010), *GID1C* (AT5G27320), *PIN1* (AT1G73590), *PIN2* (AT5G57090), *PIN3* (AT1G70940), *PIN4* (AT2G01420), *PIN7* (AT1G23080), *RGA* (AT2G01570), *RGL1* (AT1G66350), and *RGL2* (AT3G03450).

Supplemental Data

The following materials are available in the online version of this article.

Supplemental Figure 1. YFP:AUX1 Protein Levels Are Not Obviously Altered in PAC-Treated Seedling Roots.

Supplemental Figure 2. GA Deficiency Does Not Affect PIN Protein Polarity and Does Not Alter Their Abundance in Differentiated Root Tissues.

Supplemental Figure 3. The Decrease in PIN:GFP Protein Abundance in *ga1* Can Be Fully Suppressed by Long-Term GA3 Treatment.

Supplemental Figure 4. *gid1* Mutants Impaired in GA Receptor Function Have a Reduced Gravitropic Response.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Anthi Katsiarimpa and Inês Barbosa for critical reading of the manuscript as well as various colleagues for sharing published and

unpublished material. This work was supported by the following grants from the Deutsche Forschungsgemeinschaft to C.S.: SCHW751/6-1 (Arabidopsis Functional Genomics Network), SCHW751/7-1 (SPP1365), and SCHW751/8-1.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

B.C.W., E.I., R.R., M.Z., and C.S. designed the research. B.C.W., E.I., R.R., and M.Z. performed the research. B.C.W., E.I., R.R., M.Z., and C.S. analyzed data, and B.C.W. and C.S. wrote the article.

Received April 13, 2011; revised May 13, 2011; accepted May 18, 2011; published June 3, 2011.

REFERENCES

- Abas, L., Benjamins, R., Malenica, N., Paciorek, T., Wiśniewska, J., Moulinier-Anzola, J.C., Sieberer, T., Friml, J., and Luschnig, C. (2006). Intracellular trafficking and proteolysis of the Arabidopsis auxin-efflux facilitator PIN2 are involved in root gravitropism. *Nat. Cell Biol.* **8**: 249–256. Erratum. *Nat. Cell Biol.* **8**: 424.
- Achard, P., Cheng, H., De Grauwe, L., Decat, J., Schoutteten, H., Moritz, T., Van Der Straeten, D., Peng, J., and Harberd, N.P. (2006). Integration of plant responses to environmentally activated phytohormonal signals. *Science* **311**: 91–94.
- Arnaud, N., Girin, T., Sorefan, K., Fuentes, S., Wood, T.A., Lawrenson, T., Sablowski, R., and Østergaard, L. (2010). Gibberellins control fruit patterning in *Arabidopsis thaliana*. *Genes Dev.* **24**: 2127–2132.
- Bainbridge, K., Guyomarc'h, S., Bayer, E., Swarup, R., Bennett, M., Mandel, T., and Kuhlemeier, C. (2008). Auxin influx carriers stabilize phyllotactic patterning. *Genes Dev.* **22**: 810–823.
- Bandyopadhyay, A., et al. (2007). Interactions of PIN and PGP auxin transport mechanisms. *Biochem. Soc. Trans.* **35**: 137–141.
- Benjamins, R., Quint, A., Weijers, D., Hooykaas, P., and Offringa, R. (2001). The PINOID protein kinase regulates organ development in Arabidopsis by enhancing polar auxin transport. *Development* **128**: 4057–4067.
- Benjamins, R., and Scheres, B. (2008). Auxin: The looping star in plant development. *Annu. Rev. Plant Biol.* **59**: 443–465.
- Benková, E., Michniewicz, M., Sauer, M., Teichmann, T., Seifertová, D., Jürgens, G., and Friml, J. (2003). Local, efflux-dependent auxin gradients as a common module for plant organ formation. *Cell* **115**: 591–602.
- Bennett, M.J., Marchant, A., Green, H.G., May, S.T., Ward, S.P., Millner, P.A., Walker, A.R., Schulz, B., and Feldmann, K.A. (1996). Arabidopsis *AUX1* gene: A permease-like regulator of root gravitropism. *Science* **273**: 948–950.
- Björklund, S., Antti, H., Uddestrand, I., Moritz, T., and Sundberg, B. (2007). Cross-talk between gibberellin and auxin in development of Populus wood: Gibberellin stimulates polar auxin transport and has a common transcriptome with auxin. *Plant J.* **52**: 499–511.
- Blakeslee, J.J., et al. (2007). Interactions among PIN-FORMED and P-glycoprotein auxin transporters in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **19**: 131–147.
- Billou, I., Xu, J., Wildwater, M., Willemsen, V., Paponov, I., Friml, J., Heidstra, R., Aida, M., Palme, K., and Scheres, B. (2005). The PIN auxin efflux facilitator network controls growth and patterning in Arabidopsis roots. *Nature* **433**: 39–44.
- Chapman, E.J., and Estelle, M. (2009). Mechanism of auxin-regulated gene expression in plants. *Annu. Rev. Genet.* **43**: 265–285.
- Chen, R., Hilson, P., Sedbrook, J., Rosen, E., Caspar, T., and Masson, P.H. (1998). The *Arabidopsis thaliana* *AGRAVITROPIC 1* gene encodes a component of the polar-auxin-transport efflux carrier. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 15112–15117.
- Dello Ioio, R., Nakamura, K., Moubayidin, L., Perilli, S., Taniguchi, M., Morita, M.T., Aoyama, T., Costantino, P., and Sabatini, S. (2008). A genetic framework for the control of cell division and differentiation in the root meristem. *Science* **322**: 1380–1384.
- de Lucas, M., Davière, J.M., Rodríguez-Falcón, M., Pontin, M., Iglesias-Pedraz, J.M., Lorrain, S., Fankhauser, C., Blázquez, M.A., Titarenko, E., and Prat, S. (2008). A molecular framework for light and gibberellin control of cell elongation. *Nature* **451**: 480–484.
- Feng, S., et al. (2008). Coordinated regulation of *Arabidopsis thaliana* development by light and gibberellins. *Nature* **451**: 475–479.
- Frigerio, M., Alabadí, D., Pérez-Gómez, J., García-Cárcel, L., Phillips, A.L., Hedden, P., and Blázquez, M.A. (2006). Transcriptional regulation of gibberellin metabolism genes by auxin signaling in Arabidopsis. *Plant Physiol.* **142**: 553–563.
- Friml, J. (2003). Auxin transport - Shaping the plant. *Curr. Opin. Plant Biol.* **6**: 7–12.
- Fu, X., and Harberd, N.P. (2003). Auxin promotes Arabidopsis root growth by modulating gibberellin response. *Nature* **421**: 740–743.
- Gälweiler, L., Guan, C., Müller, A., Wisman, E., Mendgen, K., Yephremov, A., and Palme, K. (1998). Regulation of polar auxin transport by AtPIN1 in Arabidopsis vascular tissue. *Science* **282**: 2226–2230.
- Geisler, M., and Murphy, A.S. (2006). The ABC of auxin transport: the role of p-glycoproteins in plant development. *FEBS Lett.* **580**: 1094–1102.
- Grieneisen, V.A., Xu, J., Marée, A.F., Hogeweg, P., and Scheres, B. (2007). Auxin transport is sufficient to generate a maximum and gradient guiding root growth. *Nature* **449**: 1008–1013.
- Hadfi, K., Speth, V., and Neuhaus, G. (1998). Auxin-induced developmental patterns in *Brassica juncea* embryos. *Development* **125**: 879–887.
- Hou, X., Lee, L.Y., Xia, K., Yan, Y., and Yu, H. (2010). DELLAs modulate jasmonate signaling via competitive binding to JAZs. *Dev. Cell* **19**: 884–894.
- Huang, F., Zago, M.K., Abas, L., van Marion, A., Galván-Ampudia, C. S., and Offringa, R. (2010). Phosphorylation of conserved PIN motifs directs Arabidopsis PIN1 polarity and auxin transport. *Plant Cell* **22**: 1129–1142.
- Jacobs, W.P., and Case, D.B. (1965). Auxin transport, gibberellin, and apical dominance. *Science* **148**: 1729–1731.
- Kleine-Vehn, J., Leitner, J., Zwiewka, M., Sauer, M., Abas, L., Luschnig, C., and Friml, J. (2008). Differential degradation of PIN2 auxin efflux carrier by retromer-dependent vacuolar targeting. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**: 17812–17817.
- Kramer, E.M., and Bennett, M.J. (2006). Auxin transport: A field in flux. *Trends Plant Sci.* **11**: 382–386.
- Luschnig, C., Gaxiola, R.A., Grisafi, P., and Fink, G.R. (1998). EIR1, a root-specific protein involved in auxin transport, is required for gravitropism in *Arabidopsis thaliana*. *Genes Dev.* **12**: 2175–2187.
- Marchant, A., Kargul, J., May, S.T., Muller, P., Delbarre, A., Perrot-Rechenmann, C., and Bennett, M.J. (1999). AUX1 regulates root gravitropism in Arabidopsis by facilitating auxin uptake within root apical tissues. *EMBO J.* **18**: 2066–2073.
- Matsuoka, K., Bassham, D.C., Raikhel, N.V., and Nakamura, K. (1995). Different sensitivity to wortmannin of two vacuolar sorting signals indicates the presence of distinct sorting machineries in tobacco cells. *J. Cell Biol.* **130**: 1307–1318.
- Moubayidin, L., Perilli, S., Dello Ioio, R., Di Mambro, R., Costantino, P., and Sabatini, S. (2010). The rate of cell differentiation controls the Arabidopsis root meristem growth phase. *Curr. Biol.* **20**: 1138–1143.

- Müller, A., Guan, C., Gälweiler, L., Tänzler, P., Huijser, P., Marchant, A., Parry, G., Bennett, M., Wisman, E., and Palme, K. (1998). *AtPIN2* defines a locus of Arabidopsis for root gravitropism control. *EMBO J.* **17**: 6903–6911.
- Ottenschläger, I., Wolff, P., Wolverton, C., Bhalerao, R.P., Sandberg, G., Ishikawa, H., Evans, M., and Palme, K. (2003). Gravity-regulated differential auxin transport from columella to lateral root cap cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**: 2987–2991.
- Páli, T., Dixon, N., Kee, T.P., and Marsh, D. (2004). Incorporation of the V-ATPase inhibitors concanamycin and indole pentadiene in lipid membranes. Spin-label EPR studies. *Biochim. Biophys. Acta* **1663**: 14–18.
- Peng, J., Carol, P., Richards, D.E., King, K.E., Cowling, R.J., Murphy, G.P., and Harberd, N.P. (1997). The Arabidopsis *GAI* gene defines a signaling pathway that negatively regulates gibberellin responses. *Genes Dev.* **11**: 3194–3205.
- Petrásek, J., et al. (2006). PIN proteins perform a rate-limiting function in cellular auxin efflux. *Science* **312**: 914–918.
- Rademacher, W. (2000). GROWTH RETARDANTS: Effects on gibberellin biosynthesis and other metabolic pathways. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **51**: 501–531.
- Sabatini, S., Beis, D., Wolkenfelt, H., Murfett, J., Guilfoyle, T., Malamy, J., Benfey, P., Leyser, O., Bechtold, N., Weisbeek, P., and Scheres, B. (1999). An auxin-dependent distal organizer of pattern and polarity in the Arabidopsis root. *Cell* **99**: 463–472.
- Schwechheimer, C. (2008). Understanding gibberellic acid signaling—Are we there yet? *Curr. Opin. Plant Biol.* **11**: 9–15.
- Shimada, A., Ueguchi-Tanaka, M., Nakatsu, T., Nakajima, M., Naoe, Y., Ohmiya, H., Kato, H., and Matsuoka, M. (2008). Structural basis for gibberellin recognition by its receptor GID1. *Nature* **456**: 520–523.
- Silverstone, A.L., Mak, P.Y., Martínez, E.C., and Sun, T.P. (1997). The new *RGA* locus encodes a negative regulator of gibberellin response in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* **146**: 1087–1099.
- Singh, D.P., Filardo, F.F., Storey, R., Jermakow, A.M., Yamaguchi, S., and Swain, S.M. (2010). Overexpression of a gibberellin inactivation gene alters seed development, *KNOX* gene expression, and plant development in Arabidopsis. *Physiol. Plant.* **138**: 74–90.
- Sun, T.P., and Kamiya, Y. (1994). The Arabidopsis *GA1* locus encodes the cyclase ent-kaurene synthetase A of gibberellin biosynthesis. *Plant Cell* **6**: 1509–1518.
- Swarup, R., Friml, J., Marchant, A., Ljung, K., Sandberg, G., Palme, K., and Bennett, M. (2001). Localization of the auxin permease AUX1 suggests two functionally distinct hormone transport pathways operate in the Arabidopsis root apex. *Genes Dev.* **15**: 2648–2653.
- Teale, W.D., Paponov, I.A., and Palme, K. (2006). Auxin in action: Signalling, transport and the control of plant growth and development. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **7**: 847–859.
- Ueguchi-Tanaka, M., Nakajima, M., Katoh, E., Ohmiya, H., Asano, K., Saji, S., Hongyu, X., Ashikari, M., Kitano, H., Yamaguchi, I., and Matsuoka, M. (2007b). Molecular interactions of a soluble gibberellin receptor, GID1, with a rice DELLA protein, SLR1, and gibberellin. *Plant Cell* **19**: 2140–2155.
- Ueguchi-Tanaka, M., Nakajima, M., Motoyuki, A., and Matsuoka, M. (2007a). Gibberellin receptor and its role in gibberellin signaling in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* **58**: 183–198.
- Utsuno, K., Shikanai, T., Yamada, Y., and Hashimoto, T. (1998). *Agr*, an Agravitropic locus of *Arabidopsis thaliana*, encodes a novel membrane-protein family member. *Plant Cell Physiol.* **39**: 1111–1118.
- Vieten, A., Sauer, M., Brewer, P.B., and Friml, J. (2007). Molecular and cellular aspects of auxin-transport-mediated development. *Trends Plant Sci.* **12**: 160–168.
- Vieten, A., Vanneste, S., Wisniewska, J., Benková, E., Benjamins, R., Beeckman, T., Luschnig, C., and Friml, J. (2005). Functional redundancy of PIN proteins is accompanied by auxin-dependent cross-regulation of *PIN* expression. *Development* **132**: 4521–4531.
- Wabnik, K., Kleine-Vehn, J., Balla, J., Sauer, M., Naramoto, S., Reinöhl, V., Merks, R.M., Govaerts, W., and Friml, J. (2010). Emergence of tissue polarization from synergy of intracellular and extracellular auxin signaling. *Mol. Syst. Biol.* **6**: 447.
- Weijers, D., and Jürgens, G. (2005). Auxin and embryo axis formation: The ends in sight? *Curr. Opin. Plant Biol.* **8**: 32–37.
- Willige, B.C., Ghosh, S., Nill, C., Zourelidou, M., Dohmann, E.M., Maier, A., and Schwechheimer, C. (2007). The DELLA domain of GA INSENSITIVE mediates the interaction with the GA INSENSITIVE DWARF1A gibberellin receptor of *Arabidopsis*. *Plant Cell* **19**: 1209–1220.
- Yang, Y., Hammes, U.Z., Taylor, C.G., Schachtman, D.P., and Nielsen, E. (2006). High-affinity auxin transport by the AUX1 influx carrier protein. *Curr. Biol.* **16**: 1123–1127.
- Zádníková, P., et al. (2010). Role of PIN-mediated auxin efflux in apical hook development of Arabidopsis thaliana. *Development* **137**: 607–617.
- Zourelidou, M., Müller, I., Willige, B.C., Nill, C., Jikumaru, Y., Li, H., and Schwechheimer, C. (2009). The polarly localized D6 PROTEIN KINASE is required for efficient auxin transport in *Arabidopsis thaliana*. *Development* **136**: 627–636.