

Zellstreckung/Phototropismus

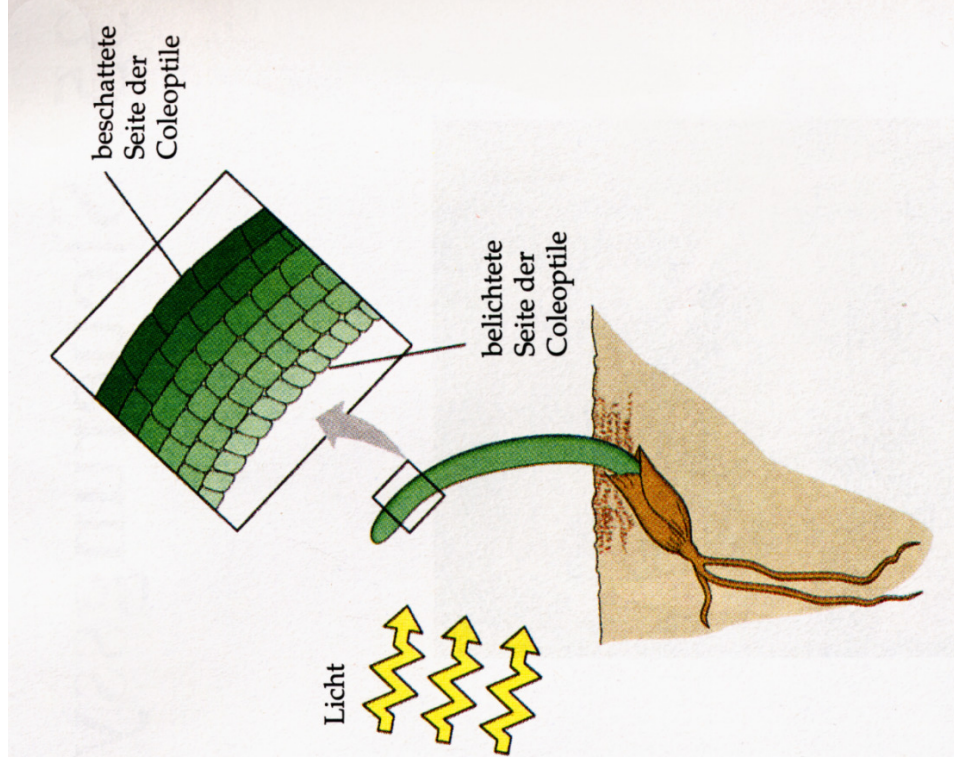


Phototropismus



- Zeitrafferaufnahmen von Haferkoleoptilen, die von links mit Blaulicht bestrahlt wurden.
- Effektiv: Blaulicht

Krümmung erfolgt durch Zellstreckung auf der dem Licht abgewandten Seite



Darwin 1880

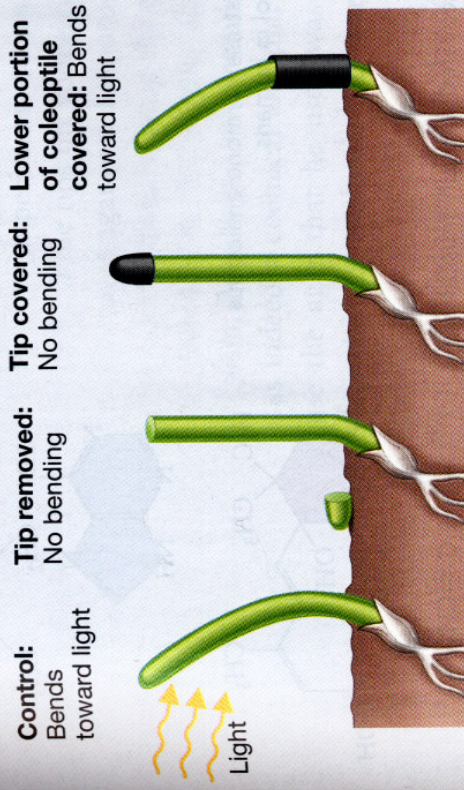


Question: Where is light sensed to initiate phototropism in grass seedlings?

Hypothesis: Light is sensed at the tip of a coleoptile.

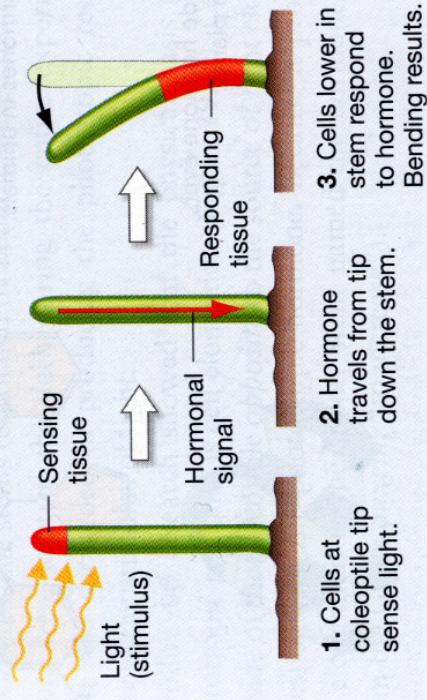
Alternative hypothesis: Light is sensed elsewhere in the coleoptile.

Experimental setup and Results:

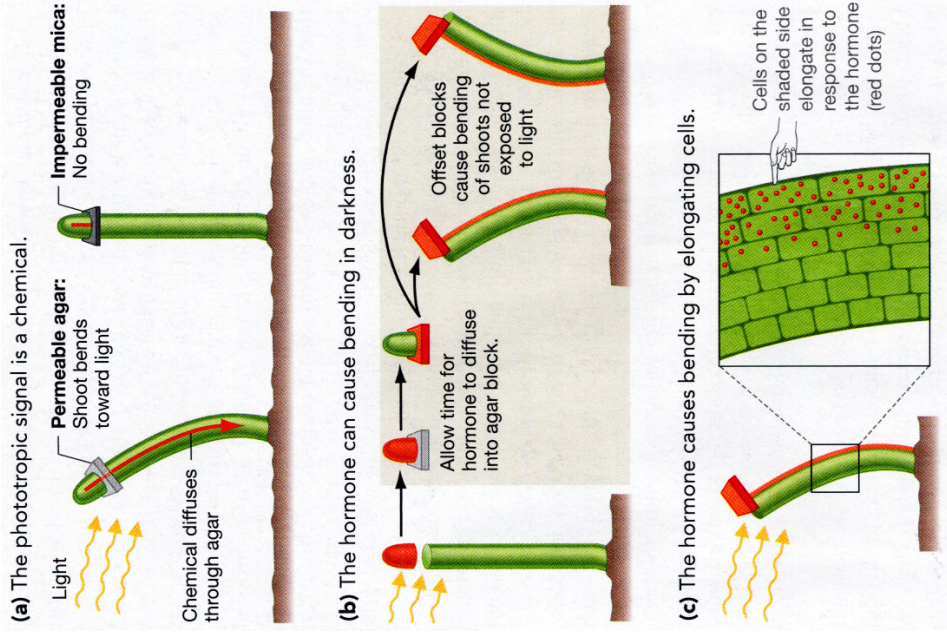


Conclusion: Light responsible for triggering phototropism is sensed at the coleoptile tip.

Interpretation:



Frits Went 1926

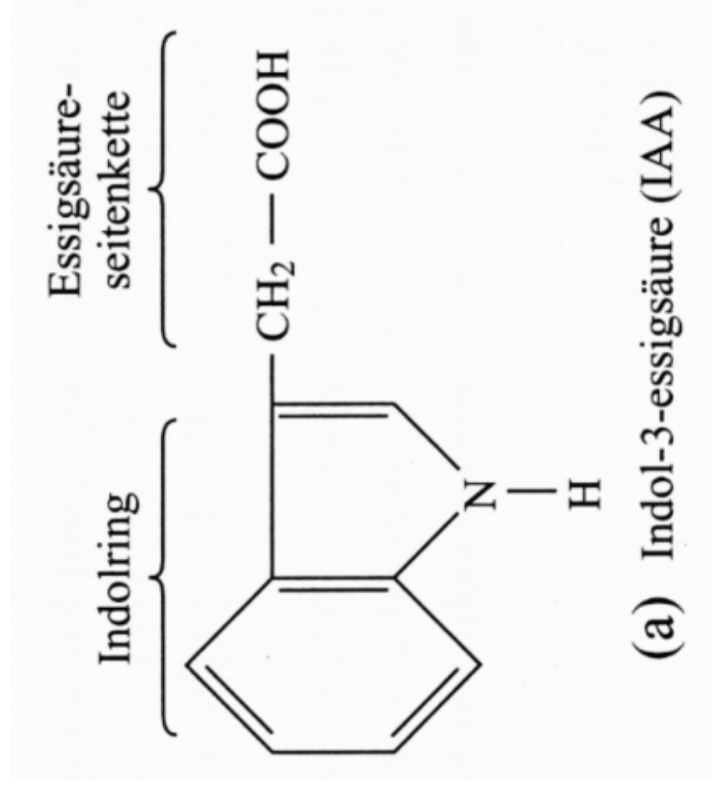


- Konzept:
Chemischer Wirkstoff, der Wachstum fördert
Auxin (griechisch: *auxein*, *wachsen*)

Isolierung des Auxins



- Isolierung aus Pflanzenmaterial zunächst nicht möglich, da Mengen zu gering ($24 \mu\text{g}/1 \text{ kg}$)
- 1904 Im Urin und in Hefeextrakten konnte man Substanzen mit Auxin-Wirkung nachweisen
- 1934 Aufklärung der Struktur
- 1941 Nachweis in Pflanzen



Auxin und Cytokinin



- Auxin und Cytokinin werden unbedingt für das Wachstum und die Entwicklung der Pflanzen gebraucht (es gibt keine Mutanten, die in diesem Biosyntheseweg einen Defekt haben)
- Im Unterschied dazu, gibt es Mutanten, die in der Gibberellinsäure- oder der Abscisinsäurebiosynthese defekt sind.

Biostat für Auxin



(A)



(B)

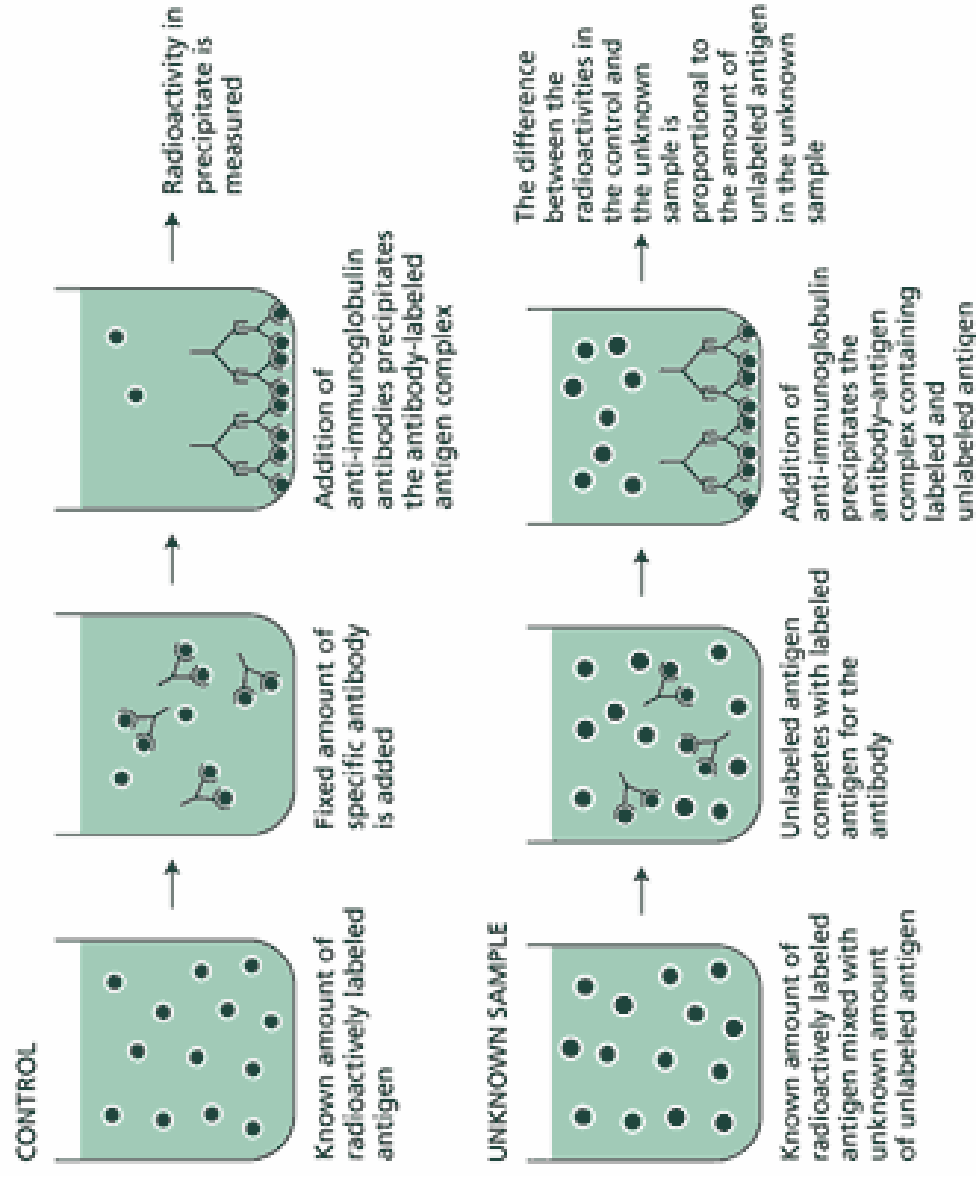


Auxin hat jedoch noch andere Effekte

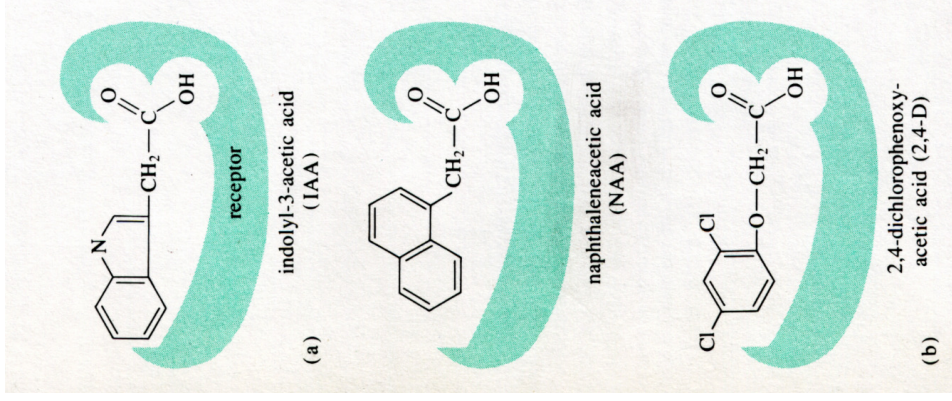


-
- Etablierung der apikal/basalen Achse im Embryo
 - In Kombination mit Cytokin: Callus-Bildung
 - Wurzelbildung

Immunologischer Nachweis von Auxin

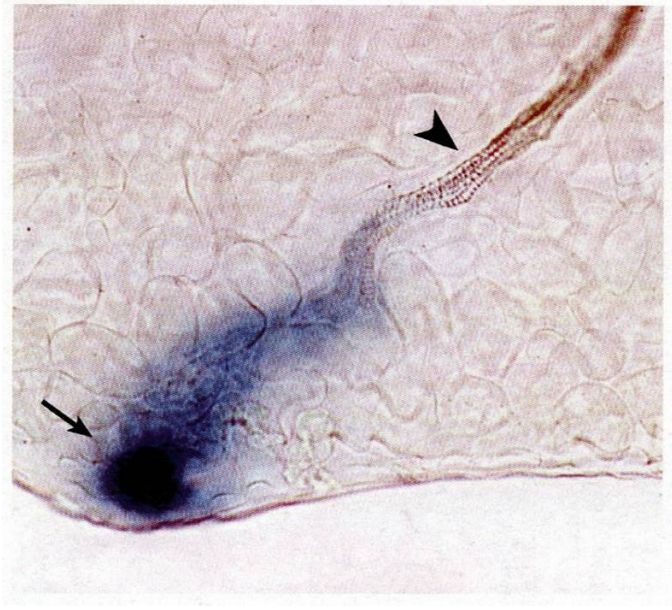


Synthetische Auxin-Derivate



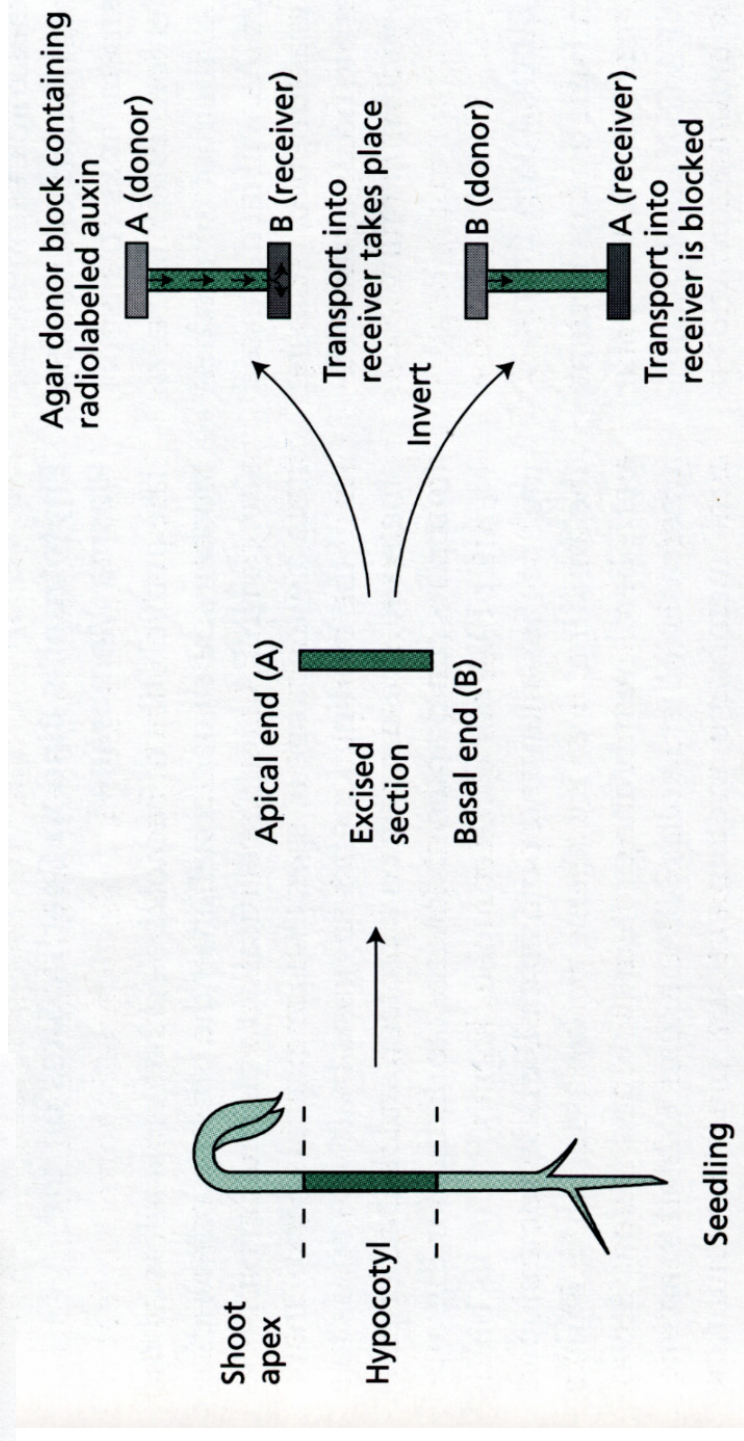
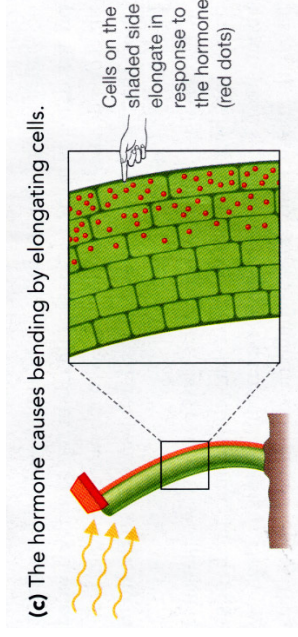
- Herstellung von synthetischen Derivaten, die in der Pflanze nicht so schnell abbaubar sind

Synthese von Auxin



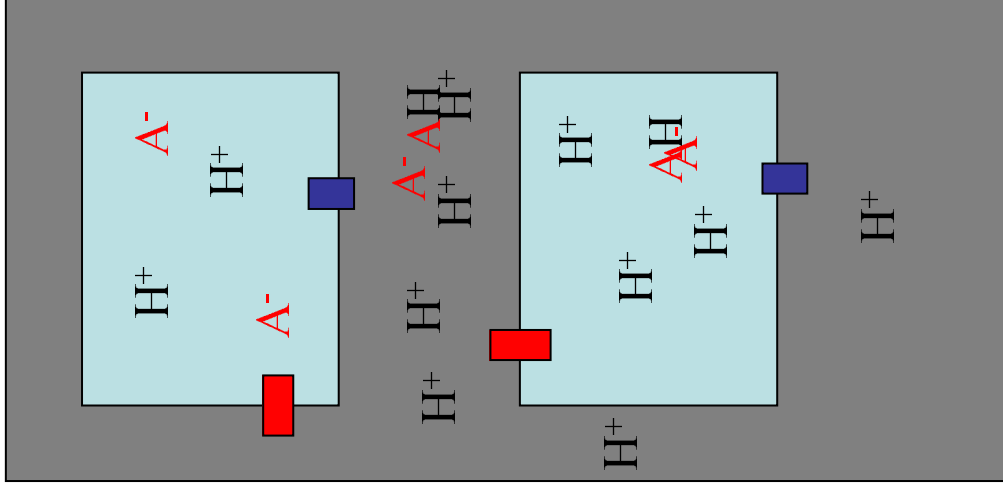
- Sprossapikalmeristem
- Blattprimordien
- Junge Blätter

Polarer Transport von Auxin

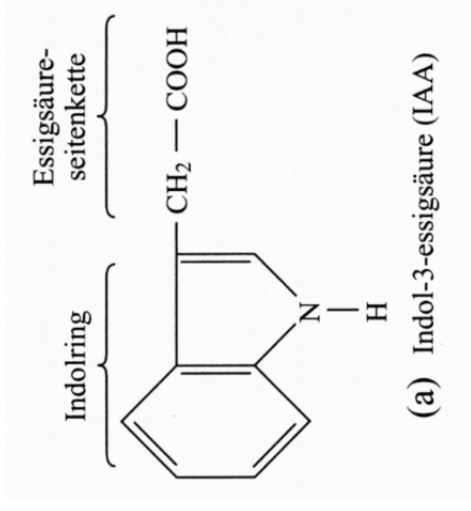




Polarer Auxin-Transport



 Protonenpumpe (ATPase)



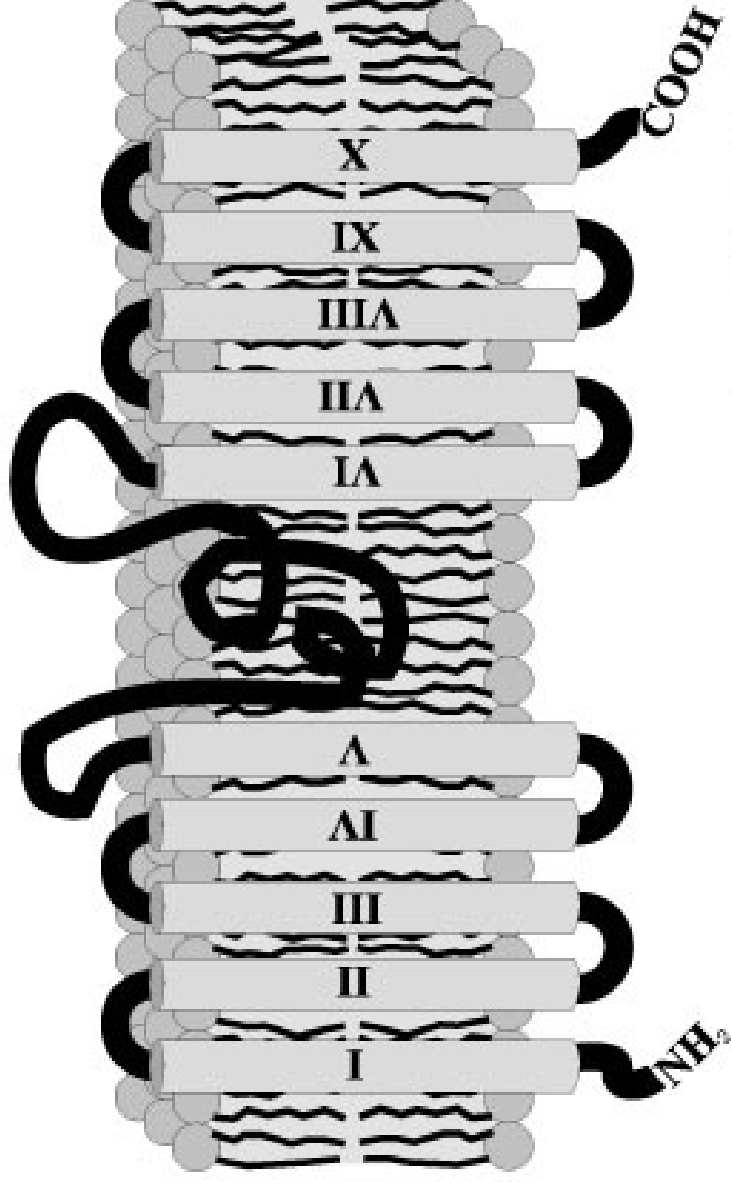
Prinzip der Ionenfalle

Auxin-Influx



-
- Passive Diffusion der protonierten Form von Auxin (IAAH) (25% des apoplastischen Auxins liegt in dieser Form vor)
 - Sekundär aktiver Transport von IAA- durch den $2H^{+}$ - IAA⁻ Symporter (durch diesen aktiven Prozess wird die Transportgeschwindigkeit erhöht)

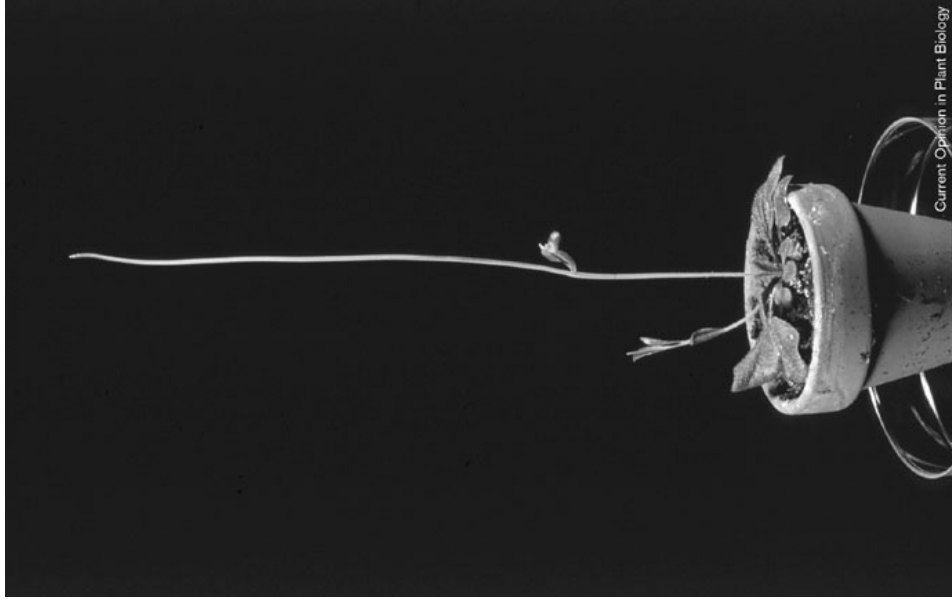
Auxin-Transport: PIN-Proteine



Current Opinion in Plant Biology

- Auxin-transportierende Proteine haben Transmembrandomänen für die Verankerung in die Membran

Suche nach den Transportproteinen

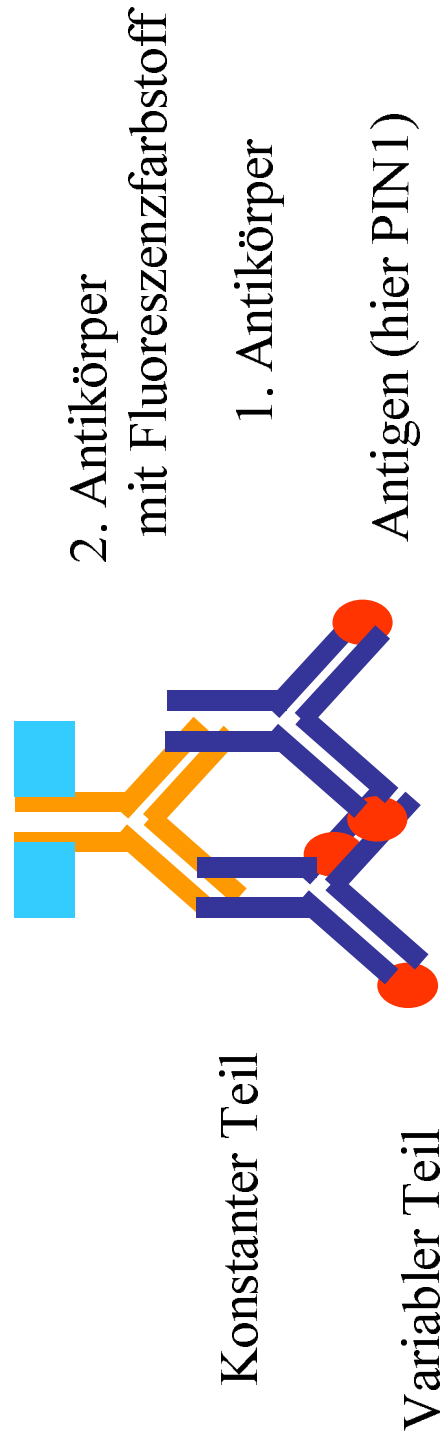


- Phänotyp in Gegenwart von NPA, einem Hemmstoff des Auxin-Transports
- Die *pin1* Mutante hat den gleichen Phänotyp

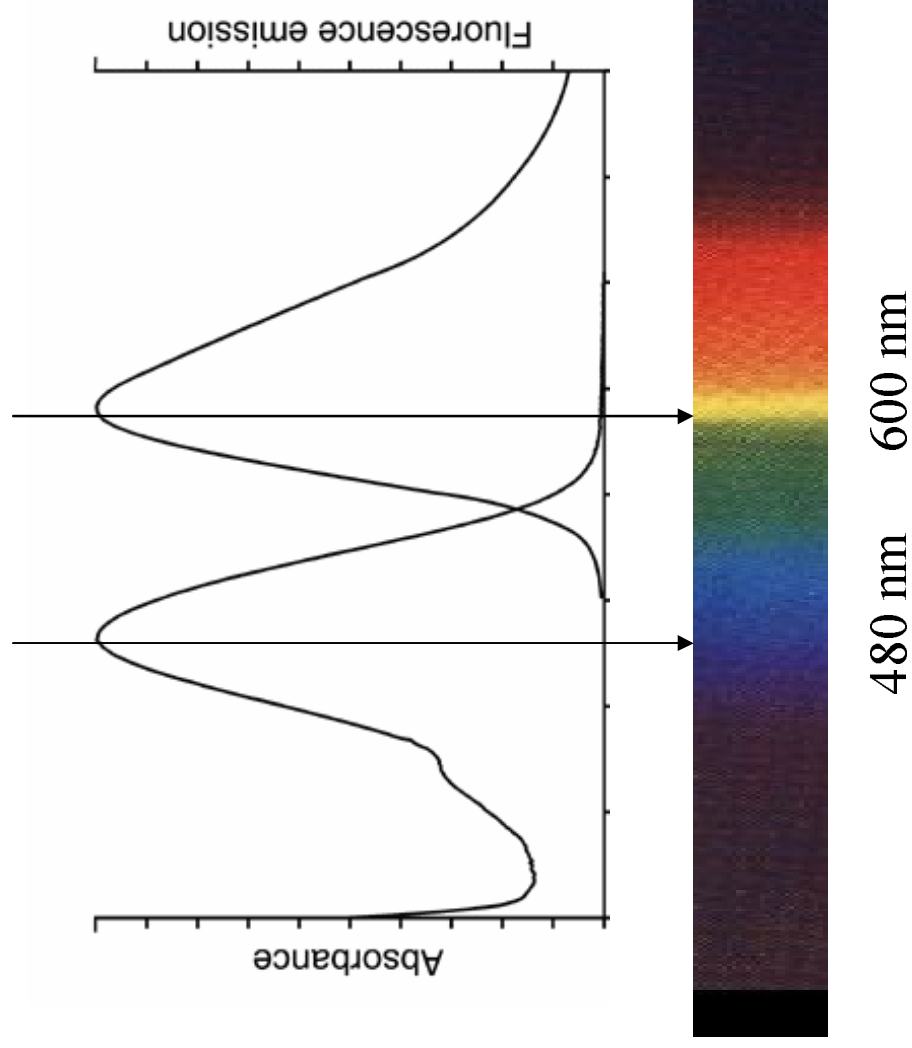
Lokalisierung des PIN1-Proteins



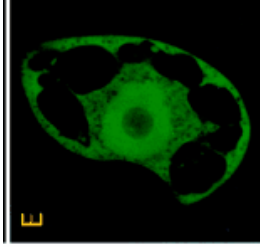
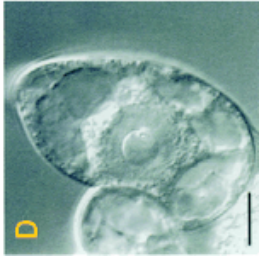
- Gegen das PIN Protein wurden Antikörper hergestellt
- Präparat: Längsschnitt durch das Hypokotyl
- Inkubation des Präparats mit dem Antikörper, der PIN1 erkennt
- Inkubation des Präparates mit einem 2. Antikörper, der den konstanten Teil des 1. Antikörpers erkennt.



Fluoreszenzfarbstoffe



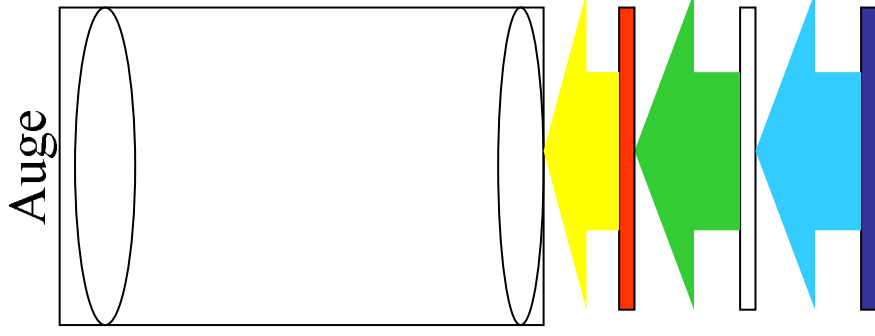
Fluoreszenzmikroskopie



Emissionslicht (600 nm)

Nicht absorbiertes
Anregungslicht und
emittiertes Licht

Anregungslicht



Tubus mit Objektiv
und Okular

Sperrfilter

Präparat

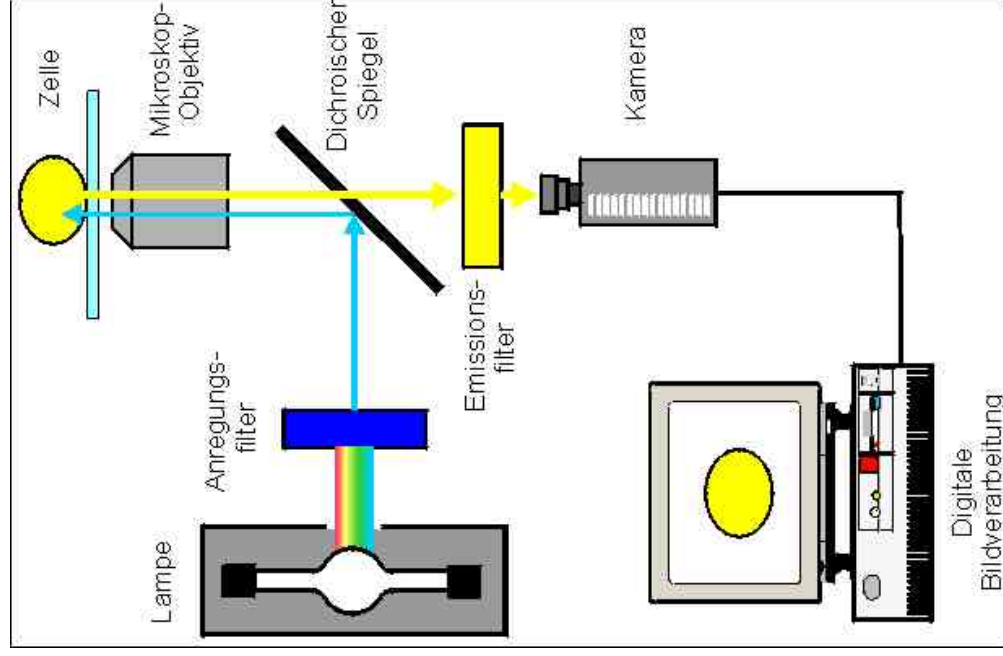
Anregungsfilter, Licht der

Wellenlänge 480 nm passiert den

Filter

Weißes Mikroskopierlicht

Fluoreszenzmikroskopie



Lokalisierung des PIN1-Proteins

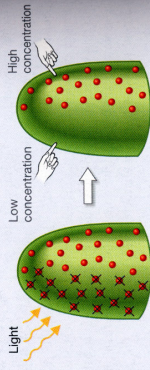


- Der Antikörper erkennt Proteine am basalen Teil der Zelle
- Der Nachweis des Antikörpers erfolgte über einen 2. Antikörper, der eine Fluoreszenzmarkierung trägt.



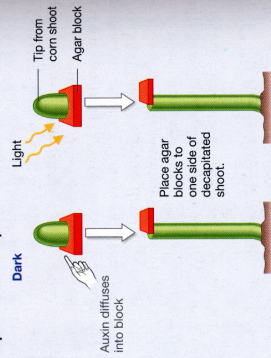
Question: How does an asymmetric distribution of auxin in shoot tips, which causes bending, develop?

Hypothesis: Auxin is destroyed on the sunny side of a shoot tip, resulting in an asymmetric distribution.



Null hypothesis: Auxin is not destroyed by light on the sunny side of a shoot tip.

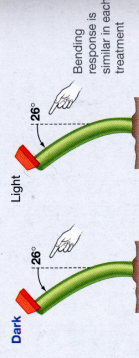
Experimental setup:



Prediction: The agar block beneath the light-treated shoot tip will elicit a smaller bending response.

Prediction of null hypothesis: Agar blocks from dark-treated and light-treated shoot tips will lead to similar bending responses.

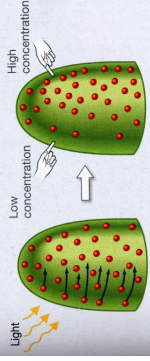
Results:



Conclusion: Auxin is not destroyed by light on the sunny side of a shoot tip. Null hypothesis is supported.

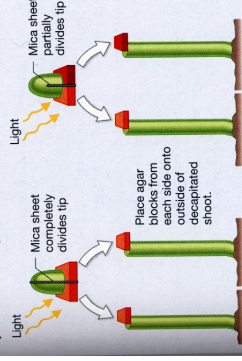
Question: How does an asymmetric distribution of auxin in shoot tips, which causes bending, develop?

Hypothesis: Auxin moves from the sunny side to the shady side of shoot tip, resulting in an asymmetric distribution.



Null hypothesis: Auxin does not move from the sunny side to the shady side of the shoot tip.

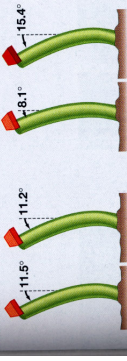
Experimental setup:



Prediction: In completely divided tip, both agar blocks will elicit the same degree of bending. In partially divided tip, block receiving the most light will elicit less bending.

Prediction of null hypothesis: The same degree of bending will occur in all treatments.

Results:

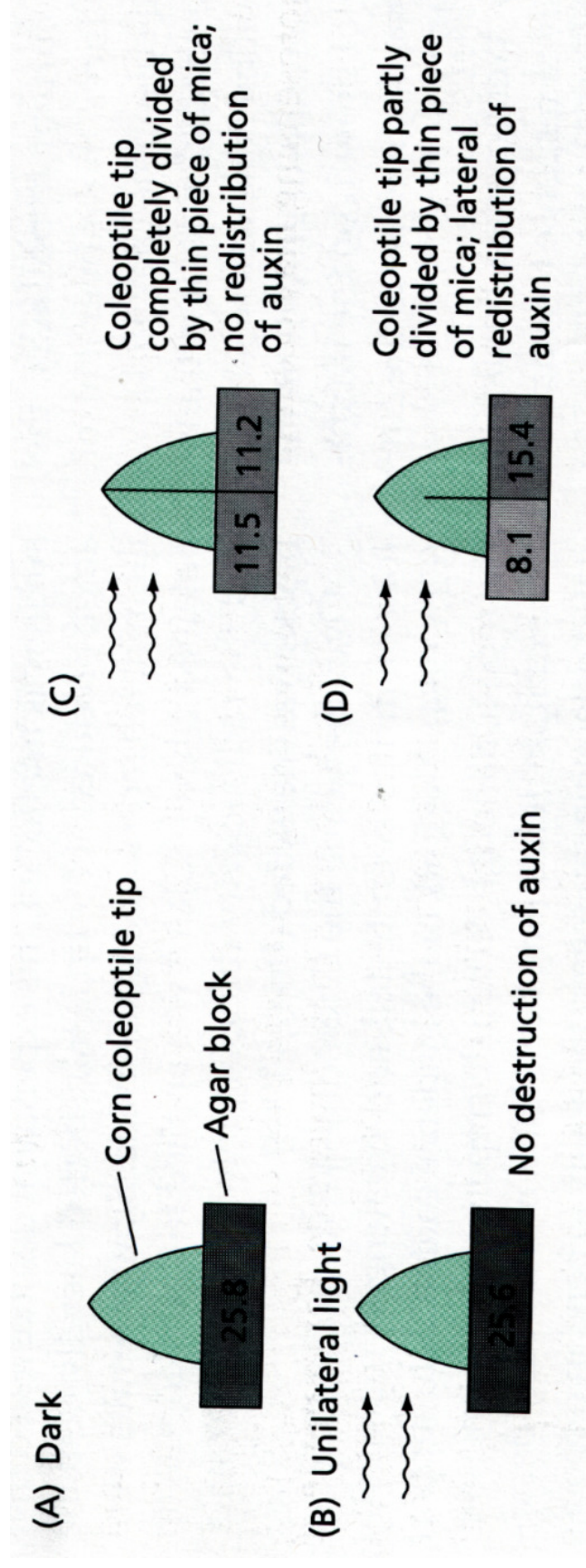


Interpretation: Mica prevented flow of auxin to shaded side, and shoots bend the same amount.

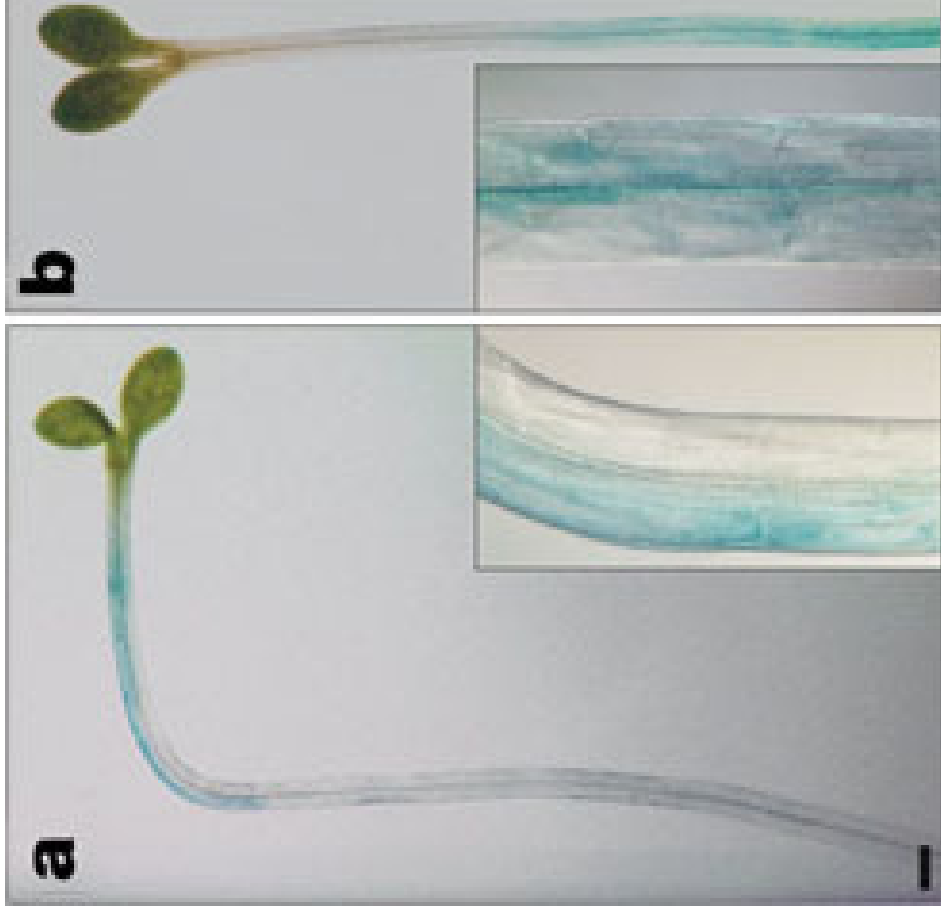
Interpretation: Auxin redistributed to shaded side, which bent more than sunny side.

Conclusion: Asymmetric distribution of auxin results from lateral redistribution in tip.

Lateral Transport von Auxin

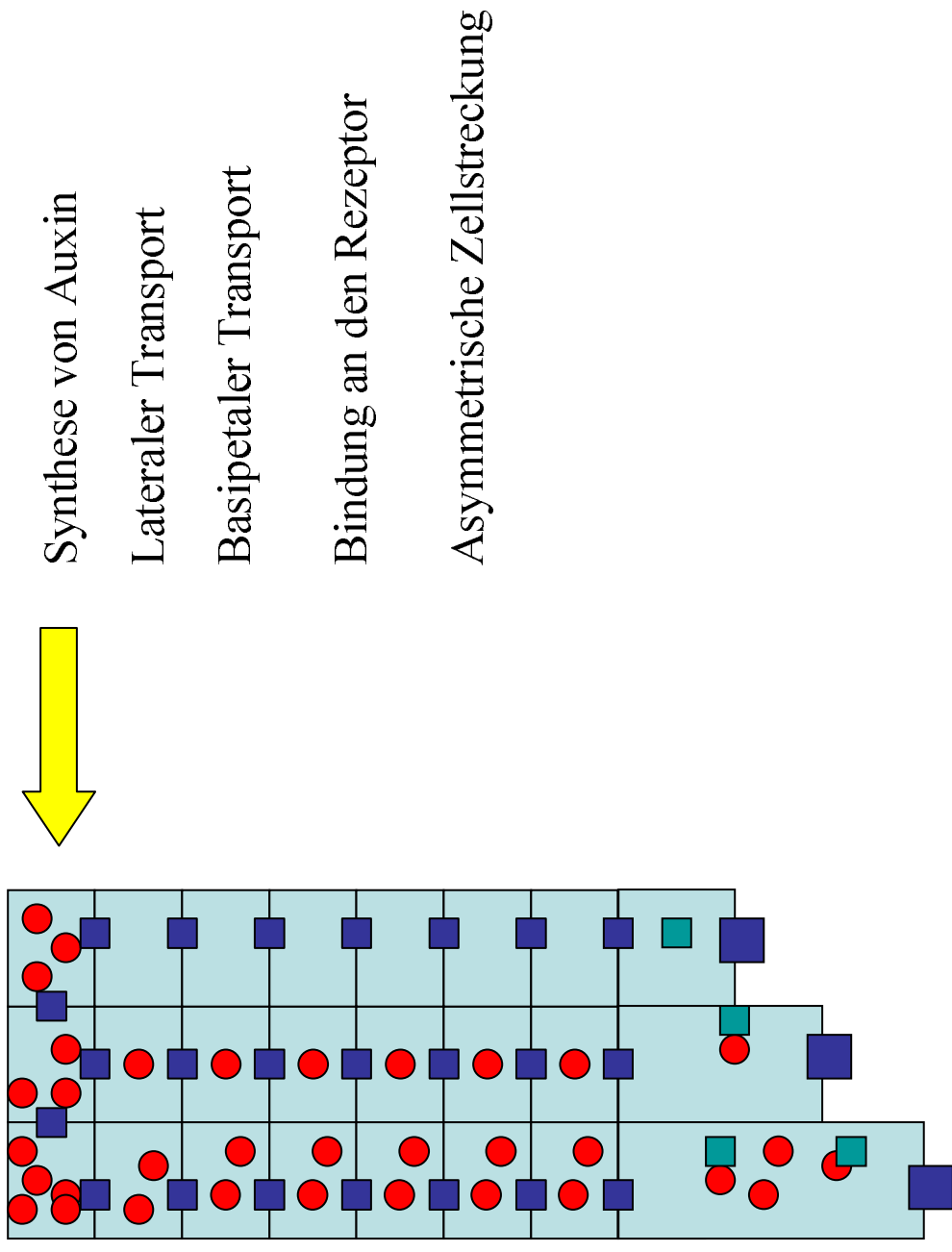


Asymmetrische Verteilung von Auxin beim Phototropismus



- Biotest: Auxin-induzierbarer Promotor kontrolliert die Expression des Reportergens β -Glucuronidase
- a) Auxin akkumuliert auf der Licht-abgewandten Seite und induziert das Reportergen
- b) NPA, ein Hemmstoff des Auxin-Transport, verhindert asymmetrische Auxin-Verteilung und Krümmung zum Licht.

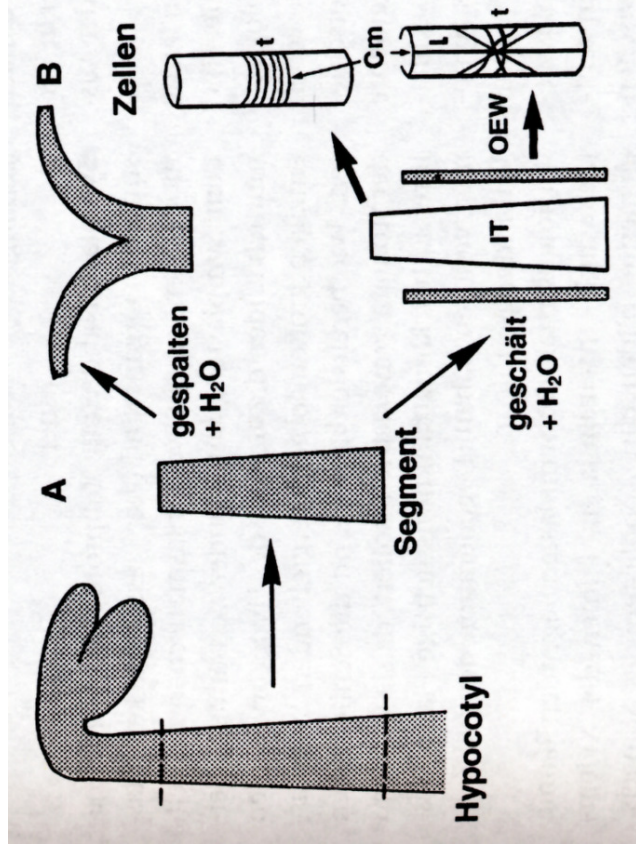
Licht-induzierter Quertransport

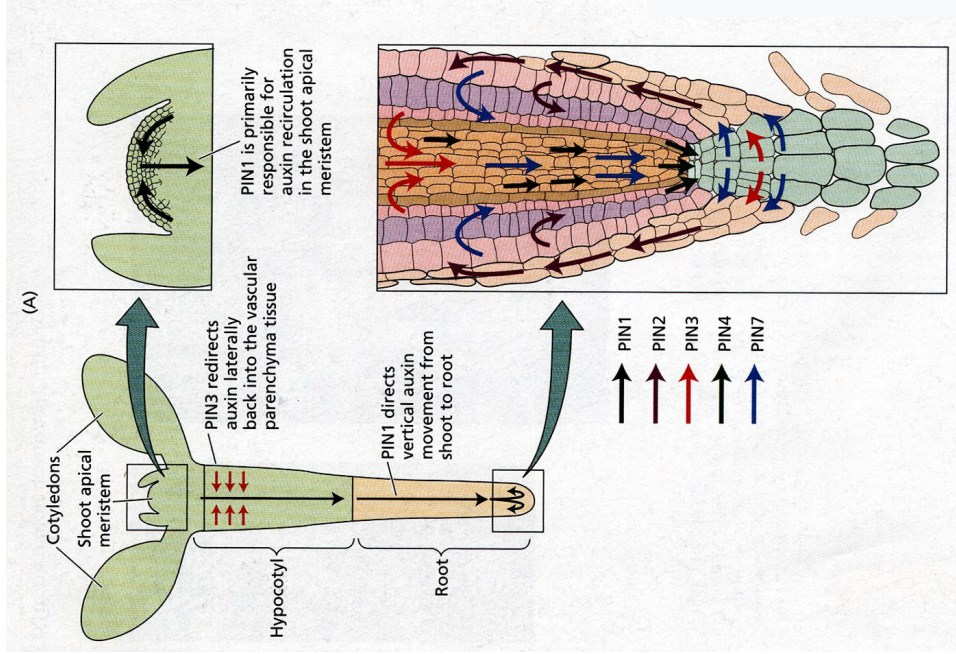


Die Zellstreckung erfolgt primär in den Epidermiszellen

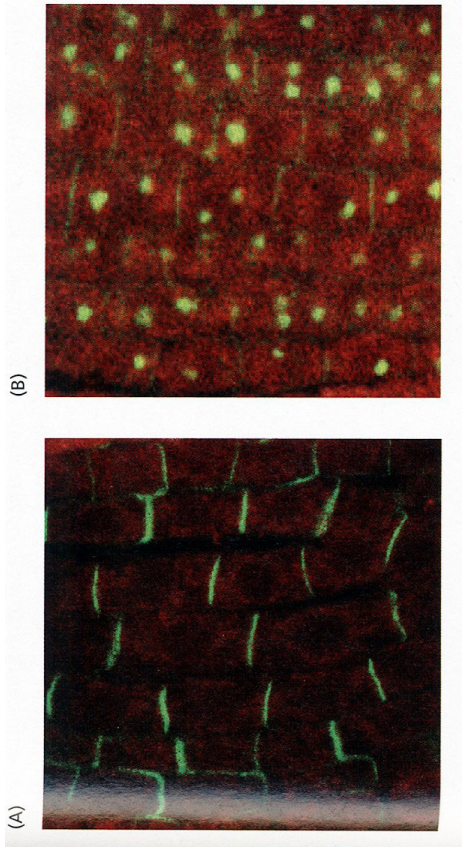


- Die Epidermiszellen haben eine dickere Zellwand als die subepidermalen Zellen
- Die subepidermalen Zellen können sich strecken, sobald die Epidermiszellen dies zulassen
- **Gewebespannung**



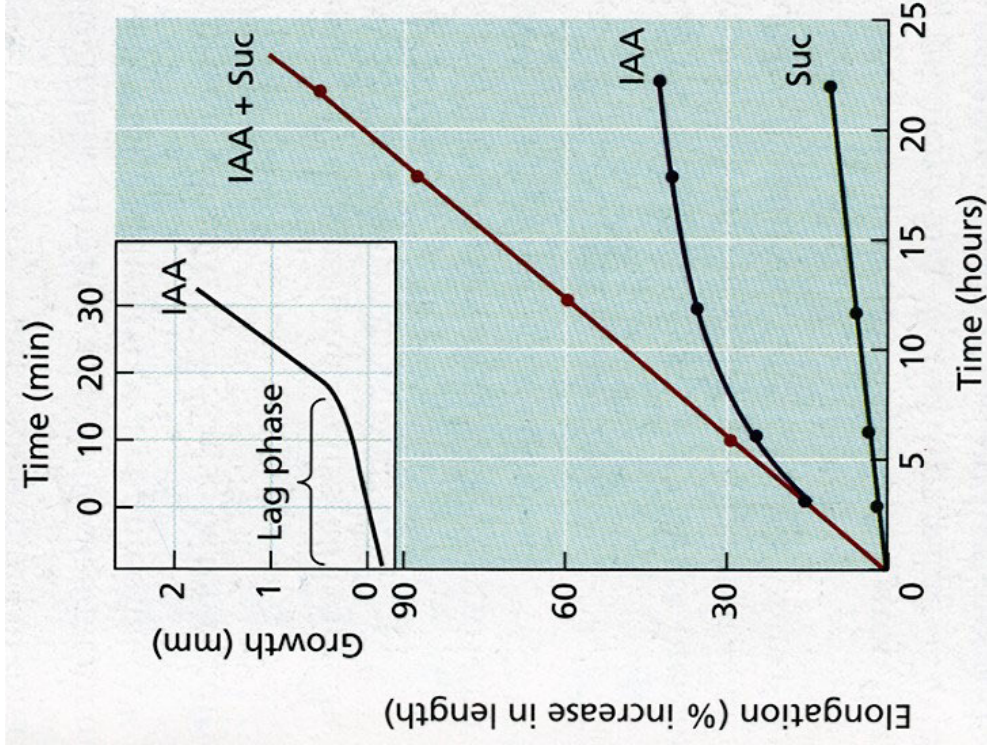


Regulation der Lokalisation der PIN Proteine



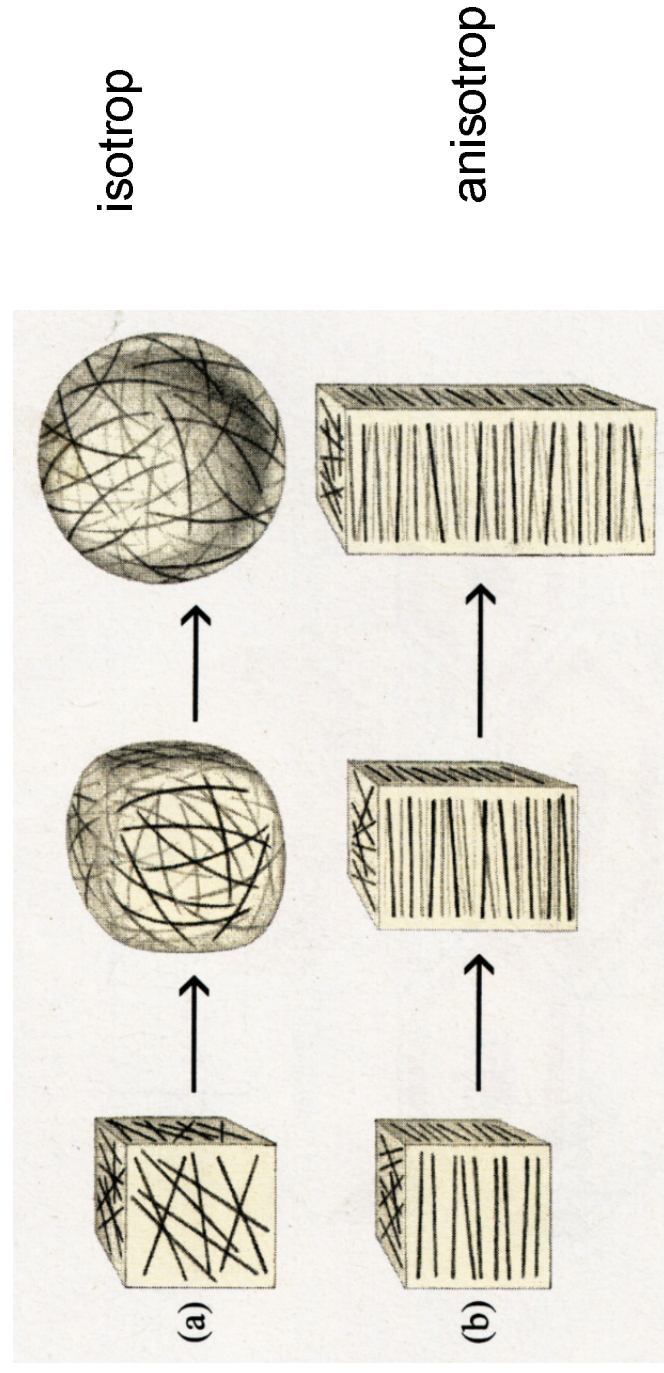
- Brefeldin A bewirkt, dass Golgi Vesikel in der Nähe des Kerns aggregieren.
- Dies führt dazu, dass die PIN Proteine in diesen Vesikeln vorzufinden sind.
- Schlussfolgerung: Vesikel mit PIN Proteinen werden ständig durch Endocytose der Plasmamembran internalisiert und wieder zur Plasmamembran transportiert.

Physiologie der Zellstreckung

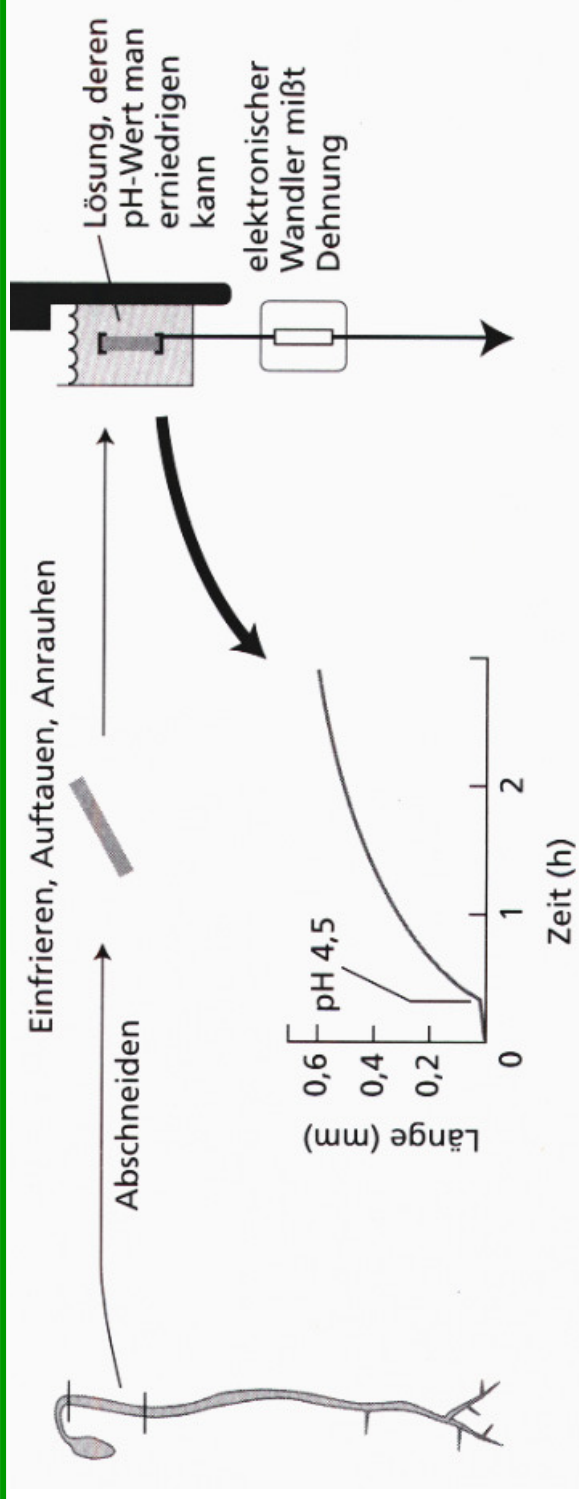


- Messungen am besten mit dekapitierten Coleoptilen (keine eigene Auxin Synthese)
- Sucrose wirkt als Osmoticum und kann auch durch KCl ersetzt werden
- Wachstum erfordert die Neusynthese von Proteinen (energieabhängig)

Richtung der Zelldehnung

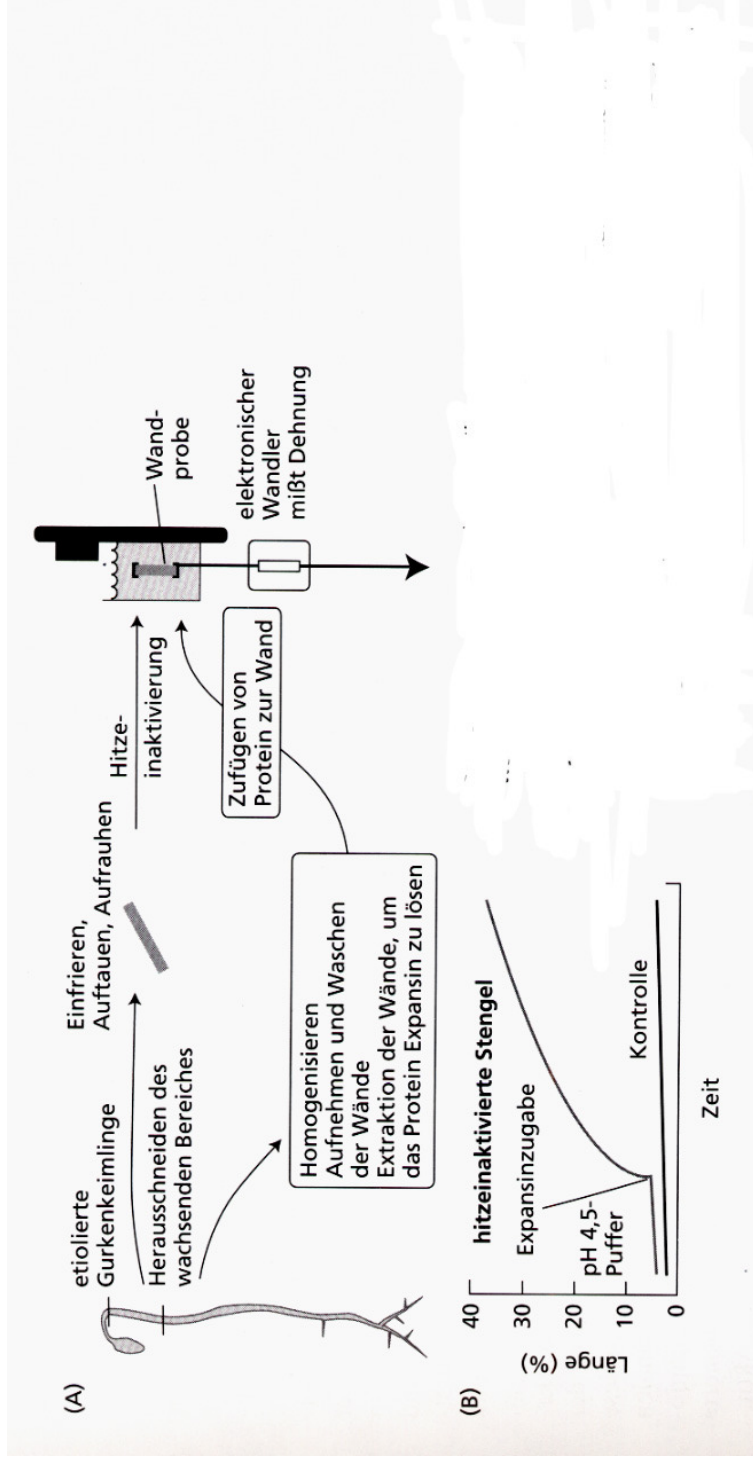


Säurewachstum



- Einfrieren und Auftauen führt zum Abtöten des Protoplasten
- Anrauhuen der Cuticula erlaubt besseren Pufferaustausch
- Probe wird unter Zugspannung gesetzt
- Vorbehandlung mit Proteasen inhibiert den Vorgang

Expansine



Proteine sind an der Dehnung beteiligt:

Expansine katalysieren die pH-abhängige Dehnung und Druckentspannung von Zellwänden

Wahrscheinlich wirken sie an der Grenzfläche von Mikrofibrillen und Hemicellulosen

Auxin stimuliert die ATPase-Aktivität



- Aktivierung der Enzymaktivität
- Aktivierung der Synthese
- Der pilzliche Wirkstoff Fusicoccin stimuliert die ATPase Aktivität und das Zellwachstum

