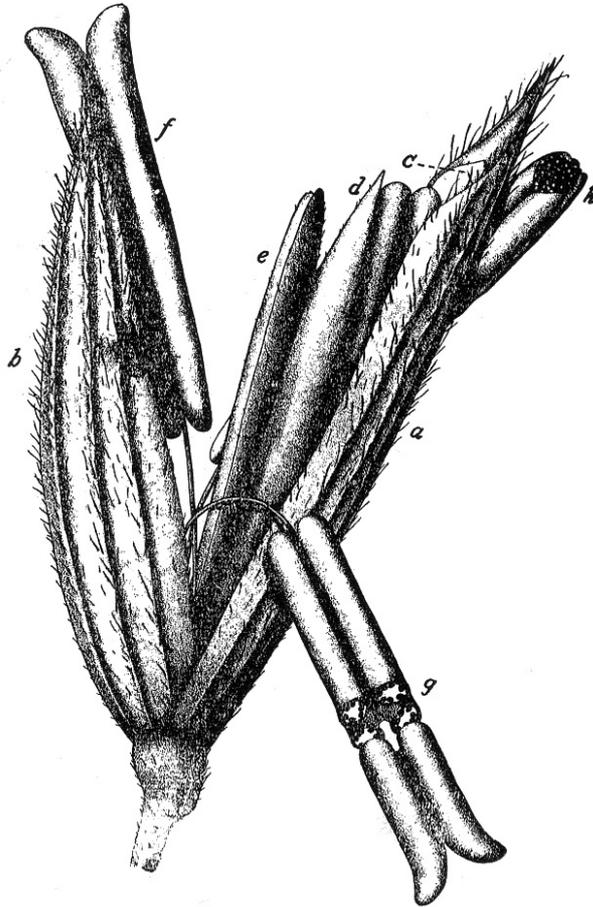


**Identifizierung und funktionelle Charakterisierung
einer pollenspezifisch exprimierten *Pti1*-homologen
Kinase aus *Zea mays* L.**



Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereichs Biologie
der Universität Hamburg

vorgelegt von

MARKUS M. HERRMANN

Hamburg 2004

Genehmigt vom
Fachbereich Biologie der Universität Hamburg
auf Antrag von Herrn Professor Dr. U. Wienand
Weiterer Gutachter der Dissertation
Herr Professor Dr. H. Lörz

Tag der Disputation: 16. April 2004

Hamburg, den 02. April 2004



Professor Dr. Arno Frühwald
Dekan

Titelbild: Männliche Maisblüte zum Zeitpunkt der Anthesis

aus T.A. Kiesselbach: The Structure and Reproduction of Corn.
50th Anniversary Ed., Cold Spring Harbory Laboratory Press, 1999.

Meinen Freunden

Ahme den Gang der Natur nach.
Ihr Geheimnis ist Geduld.

RALPH WALDO EMERSON

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	V
1. Einleitung	1
1.1. Pollenentwicklung	2
1.2. Pollinierung	3
1.3. Flavonole und die Fertilität von Pollen	7
1.4. Analogien zwischen Prozessen der Pollinierung und der Interaktion von Pathogen und Wirt	8
1.5. Genexpression während der Pollenentwicklung und Pollinierung	12
1.6. Promotoren von pollenspezifisch exprimierten Genen	14
1.7. Zielsetzung	15
2. Materialien und Methoden	
2.1. Materialien	16
2.1.1. Chemikalien, Radiochemikalien, Enzyme und <i>Kits</i>	16
2.1.2. Medien und Reagenzien	16
2.1.3. Größenstandards	16
2.1.4. Primer	17
2.1.5. Deponierte <i>ZmPti1</i> -Nukleinsäuresequenzen	18
2.1.6. Vektoren und Bakterienstämme	18
2.1.7. Pflanzenmaterial	19
2.2. Methoden	20
2.2.1. Molekularbiologische Standardmethoden	20
2.2.2. Ernte von Maisgeweben	20
2.2.2.1. <i>in vitro</i> Keimung von Maispollen	21
2.2.2.2. Rollenkultur zur Keimung von Maiskörnern	21
2.2.3. Analyse von DNA	22
2.2.3.1. Präparation von genomischer DNA	22
2.2.3.2. Amplifikation von DNA-Fragmenten (<i>PCR</i>)	22
2.2.3.3. Markierung von DNA-Fragmenten	23
2.2.3.3.1. Markierung von DNA-Fragmenten mit Digoxigenin	23
2.2.3.3.2. Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten	24
2.2.3.4. <i>Southern Blot</i> Transfer und Hybridisierung mit spezifischen digoxigeninmarkierten DNA-Sonden	24
2.2.3.5. Genomische <i>Southern Blot</i> Analyse und Hybridisierung mit spezifischen DNA-Sonden	25

2.2.4.	Analyse von RNA	26
2.2.4.1.	RNA-Extraktion	26
2.2.4.2.	RNA-Agarosegel-Elektrophorese	27
2.2.4.3.	<i>Northern Blot</i> Transfer und Hybridisierung mit spezifischen DNA-Sonden	27
2.2.4.4.	<i>PCR</i> Ansatz zum Nachweis spezifischer mRNAs	28
2.2.5.	Analyse von Proteinen	29
2.2.5.1.	Überexpression rekombinanter Proteine	29
2.2.5.2.	Denaturierende Affinitätsaufreinigung rekombinanter His-Fusionsproteine	30
2.2.5.3.	Native Affinitätsaufreinigung rekombinanter His-Fusionsproteine	30
2.2.5.3.1.	Native Affinitätsaufreinigung mit <i>Ni-NTA Magnetic Agarose Beads</i>	31
2.2.5.3.2.	Native Affinitätsaufreinigung mit Ni-NTA Agarose (Minipräp)	31
2.2.5.3.3.	Native Affinitätsaufreinigung mit Ni-NTA Agarose (Maxipräparation)	32
2.2.5.4.	Native Proteinaufreinigung rekombinanter MBP-Fusionsproteine	32
2.2.5.5.	Native Proteinaufreinigung rekombinanter GST-Fusionsproteine	33
2.2.5.6.	Gesamtproteinextrakte aus Pflanzengeweben	33
2.2.5.6.1.	Gesamtproteinextrakte aus <i>in vitro</i> gekeimtem Pollen	34
2.2.5.7.	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	34
2.2.5.8.	Synthese eines polyklonalen Antikörpers	35
2.2.5.8.1.	Test des polyklonalen Antikörpers	35
2.2.5.9.	<i>Western Blot</i> von SDS-Gelen	35
2.2.5.10.	<i>Western</i> Detektion	36
2.2.5.11.	Kinase Assays	37
2.2.5.11.1.	Standard-Phosphorylierungsassay	37
2.2.5.11.2.	Interaktions-Kinase-Assay	38
2.2.5.11.3.	<i>in-gel</i> Assay	38
2.2.5.11.4.	Trocknung von SDS-Polyacrylamid-Gelen	40
2.2.6.	<i>SMART™</i> cDNA-Synthese	41
2.2.7.	Subtraktive Hybridisierungen	41
2.2.7.1.	Subtraktive Hybridisierung nach BUCHANAN-WOLLASTON und AINSWORTH	42
2.2.7.1.1.	<i>Dot-Blot</i> Hybridisierung	42
2.2.7.2.	Suppressive subtraktive Hybridisierung (SSH)	43
2.2.7.2.1.	Differentielle Durchmusterung der Subtraktionsklone der suppressiven subtraktiven Hybridisierung	44
2.2.8.	Erstellung und Analyse einer cDNA-Bibliothek – <i>SMART™ cDNA Library Construction</i>	45
2.2.8.1.	Durchmusterung der cDNA-Bibliothek mit spezifischen Sonden	45
2.2.8.2.	Konversion von isolierten λ <i>TripEx2™</i> -Phagen in Plasmide	46

2.2.9.	Analyse einer genomischen Bibliothek	46
2.2.9.1.	Durchmusterung einer genomischen Bank mit spezifischen Sonden	46
2.2.9.2.	Vortest isolierter Phagen-Populationen durch <i>PCR</i>	47
2.2.9.3.	Isolierung von Phagen-DNA	47
2.2.9.4.	<i>Southern</i> Analyse von Phagen-DNA	47
2.2.9.5.	<i>inverse PCR</i> zur Amplifikation unbekannter DNA-Bereiche	48
2.2.10.	Herstellung von Dauerkulturen	49
2.2.11.	Herstellung kompetenter Zellen und Transformation	49
2.2.12.	Biolistische Transformationen	50
2.2.12.1.	Herstellung stabil transformierter Maispflanzen	50
2.2.12.2.	Transiente Transformation von Maisgeweben	52
2.2.12.2.1.	Transiente Transformation von <i>in vitro</i> keimendem Maispollen	52
2.2.12.2.2.	Transiente Transformation von Maisembryonen	53
2.2.12.3.	Analyse transient transformierter Maisgewebe	53
2.2.12.3.1.	Histochemischer GUS-Nachweis	53
2.2.12.3.2.	Quantitative Bestimmung der GUS- und <i>Luciferase</i> -Aktivität	53
2.2.13.	Sequenzierung von DNA	55
2.2.14.	Computergestützte Auswertung und Analyse	56
3.	Ergebnisse	
3.1.	Identifizierung von differentiell exprimierten Genen bei Mais, die an der Pollenentwicklung und -fertilität beteiligt sind	57
3.1.1.	Subtraktive Hybridisierung	57
3.1.2.	Subtraktive Hybridisierung nach BUCHANAN-WOLLASTON und Ainsworth	58
3.1.2.1.	<i>Dot Blot</i> Hybridisierung der Subtraktionsklone	58
3.1.2.2.	Sequenzanalysen der identifizierten Subtraktionsklone	60
3.1.2.3.	<i>Northern</i> und <i>Southern</i> Analysen der identifizierten Subtraktionsklone	61
3.1.3.	Suppressive subtraktive Hybridisierung (BD BIOSCIENCES)	63
3.1.4.	Fazit aus den subtraktiven Hybridisierungen	63
3.2.	Isolierung eines <i>Pti1</i>-homologen Gens <i>ZmPti1</i>	64
3.2.1.	Isolierung einer <i>Pti1</i> -homologen cDNA aus Mais	64
3.2.2.	Analyse der abgeleiteten Aminosäuresequenz von <i>ZmPti1</i>	66
3.2.2.1.	<i>ZmPti1</i> codiert für eine Serin/Threonin-Proteinkinase	69
3.2.3.	Genomische Organisation des <i>ZmPti1</i> -Gens	72
3.2.3.1.	Isolierung eines genomischen <i>ZmPti1</i> -Klons	72
3.2.3.2.	Genomische <i>Southern</i> Analysen mit <i>ZmPti1</i>	75

3.3.	Analyse von <i>ZmPti1</i>	77
3.3.1.	mRNA-Expression von <i>ZmPti1</i>	77
3.3.1.1.	<i>Northern</i> Analysen zur Expression des <i>ZmPti1</i> -Gens	77
3.3.1.2.	PCR-Ansatz zur Analyse der Expression des <i>ZmPti1</i> -Gens	79
3.3.2.	Charakterisierung des <i>ZmPti1</i> -Promotors	81
3.3.2.1.	<i>in silico</i> Analysen des <i>ZmPti1</i> -Promotors	81
3.3.2.2.	Expressionsanalysen mit transient transfomierten <i>ZmPti1</i> -Promotorkonstrukten	84
3.3.3.	Expression des ZmPTI1-Proteins	90
3.3.3.1.	Überexpression des rekombinanten ZmPTI1-6His-Fusionsproteins	90
3.3.3.2.	Synthese eines polyklonalen Antikörpers gegen ZmPTI1	92
3.3.3.3.	<i>Western</i> Analyse von ZmPTI1 in Proteinextrakten verschiedener Maisgewebe	94
3.3.4.	Funktionsanalyse von ZmPTI1	98
3.3.4.1.	Überexpression von rekombinatem ZmPTI1(K100N)-6His-Fusionsprotein	98
3.3.4.2.	Kinase Assays	99
3.3.4.2.1.	Phosphorylierungsassay des ZmPTI1	100
3.3.4.2.2.	Phosphorylierungsassay des ZmPTI1 mit Gesamtproteinextrakten	101
3.3.4.2.3.	Interaktions-Kinase-Assay des ZmPTI1 mit verschiedenen Gesamtproteinextrakten	104
3.3.4.2.4.	<i>in-gel</i> Kinase Assay	107
3.3.5.	<i>Post-transcriptional Gene Silencing</i> (PTGS)	112
3.3.5.1.	Herstellung von <i>ZmPti1 knock-out</i> Pflanzen	114
3.3.5.2.	Analyse der transgenen <i>ZmPti1 knock-out</i> Pflanzen	116
3.3.5.3.	Unterschiede in der Fertilität des transgenen Pollens	126
4.	Diskussion	129
4.1.	Subtraktive Hybridisierungen zur Identifizierung von Genen, die an der Pollenentwicklung und -fertilität beteiligt sind	129
4.2.	Charakterisierung der PTI1-homologen Proteinkinase ZmPTI1	132
4.3.	Bedeutung von ZmPTI1 für die Pollenkeimung	139
4.4.	Ausblick	146
5.	Zusammenfassung	147
6.	Literaturverzeichnis	149

Abkürzungsverzeichnis

Chemikalien und Lösungen

DIG	Digoxigenin
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TE	Tris-EDTA

Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
SDS	Natriumdodecylsulfat
SSC	Natriumchlorid-Natriumcitrat
X-Gal	(5-Brom-4-chlor-3-indolyl)- β -D-galactosid

Molekularbiologische Abkürzungen

A	Adenin
Ac	Accession
AK	Antikörper
AS	Aminosäure
C	Cytosin
cDNA	komplementäre DNA
Ci	Curie
dap	Tage nach Bestäubung
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dba	Tage vor Anthesis
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
dUTP	Desoxyuridintriphosphat
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>

EST	<i>expressed sequence tag</i> : teilsequenzierte cDNA in Datenbanken
G	Guanin
I	Intron
mRNA	Boten-RNA
N	Nukleotid (A, G, C, T oder U)
NTP	Nukleosidtriphosphat
ORF	offener Leserahmen
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pfu	plaquebildende Einheiten
Poly(A) ⁺	
RNA	polyadenylierte RNA
R	Purin (A oder G)
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale RNA
T	Thymin
U	Uracil
UTR	nicht-translatierte Region
Y	Pyrimidin (C, T oder U)

Einheiten und andere Abkürzungen

b	Basen
bp	Basenpaar
°C	Grad Celsius
d	Tage
Da	Dalton
fmol	Femtomol
g	Gramm
GH	Gewächshaus
xg	Erdbeschleunigung
h	Stunden
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
l	Liter
M	molar
mA	Milliampère
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mM	millimolar
mmol	Milimol
μ g	Mikrogramm

μ l	Mikroliter
μ mol	mikromolar
min	Minute
mol	Mol
μ M	Mikromol
ng	Nanogramm
nM	nanomolar
OD	optische Dichte
Pa	Pascal
RLU	relative Licht Einheiten
rpm	Umdrehungen je Minute
RT	Raumtemperatur
sec	Sekunde
u	Enzymeinheiten
UTR	untranslatierter Bereich
UV	ultraviolettes Licht
Vol	Volumen
v/v	Volumen/Volumen
w/v	Gewicht/Volumen

1. Einleitung

Die Erhaltung der eigenen Art ist das zentrale Ziel aller Organismen. Eine wichtige, wenn nicht entscheidende Rolle in diesem Zusammenhang spielt die Vermehrung und Ausbreitung von Organismen und deren Reproduktion. Bei Pflanzen haben sich im Laufe der Evolution zwei Fortpflanzungsweisen entwickelt. Die asexuelle vegetative Fortpflanzung, die allein auf mitotischer Zellteilung beruht und in der Regel zu erbgleichen Nachkommen führt und die sexuelle Fortpflanzung, bei der eine Rekombination des elterlichen Erbguts stattfindet. Die Bedeutung der geschlechtlichen oder generativen Fortpflanzung ist weniger in der Vermehrung, als vielmehr in der Rekombination der Erbanlagen zu sehen. Diese, sich stetig wiederholende Vermischung der Erbanlagen verschiedener Individuen schafft die Voraussetzung für eine Evolution und Anpassung an sich ändernde Umweltbedingungen (STRASBURGER, 1991).

Grundlage der sexuellen Fortpflanzung ist die Entwicklung geschlechtlich differenzierter, haploider Keimzellen (Gameten), die zur Zygote verschmelzen. Aus der diploiden Zygote entwickelt sich der Sporophyt, der nach einer mehr oder weniger langen, somatischen Entwicklungsphase die gametenbildende Generation, den Gametophyten, hervorbringt. Dieser ist bei Samenpflanzen (*Spermatophyta*) heteromorph, da die getrennt geschlechtlichen Gametophyten im Vergleich zum Sporophyten stark reduziert sind. Dies ermöglicht eine beschleunigte geschlechtliche Fortpflanzung (STRASBURGER, 1991).

Der Pollen, der männliche Gametophyt der Samenpflanzen, entwickelt sich in den Antheren. Im reifen Zustand enthält er neben Genprodukten seines vegetativen und generativen Kerns auch Produkte aus der sporophytischen Genexpression des Tapetums. Aufgrund des dehydrierten Zustands des Pollens zum Zeitpunkt der Anthesis liegen die RNAs, Proteine und bioaktiven Moleküle zunächst in einer inaktiven Form vor (TAYLOR und HEPLER, 1997). Bei der Rehydrierung des Pollens auf einem kompatiblen Stigma der weiblichen Blüte werden die eingelagerten Genprodukte aktiviert und erlauben das zügige Auswachsen des Pollenschlauchs. Im Anschluss an die Penetration des Stigmas durchwächst der Pollenschlauch auch den Stylus (Narbenfaden) und entläßt zur Befruchtung der weiblichen Samenanlage die beiden Spermazellen in den Embryosack, wo die doppelte Befruchtung stattfindet. Aus der Befruchtung der Eizelle geht die Zygote hervor, aus der Befruchtung der diploiden Zentralzelle das triploide Endosperm.

Die Untersuchung der molekularen Vorgänge und ihrer Regulation während der Pollenkeimung, des Pollenschlauchwachstums und der Befruchtung ist im Hinblick auf das Verständnis dieser grundlegenden biologischen Prozesse von besonderer Relevanz. Darüber hinaus stellt Pollen mit dem Prozess der Pollinierung ein attraktives Modellsystem zur Untersuchung von Zell-Zell-Interaktionen, Signaltransduktionswegen sowie des polaren Spitzenwachstums

dar (FRANKLIN-TONG, 1999). Um diese Prozesse zu verstehen, hat die Erforschung der zugrunde liegenden Genexpression eine zentrale Bedeutung. Zudem sind bisher nur wenige Gene beschrieben worden, deren Expression direkt durch die Pollenkeimung induziert wird oder mit dem Pollenschlauchwachstum in Verbindung steht.

Mais besitzt neben Petunie, Lilie, Tabak, Tomate und einigen *Brassica*-Arten aufgrund seiner getrenntgeschlechtlichen Blüten, seiner relativ großen Pollen und gut etablierter Methoden zur *in vitro* Kultur und Fertilisation (u.a. KRANZ und LÖRZ, 1993; KRANZ *et al.*, 1998; SCHREIBER und DRESSELHAUS, 2003) hervorragende Eigenschaften, um molekulare Fragestellungen der Pollenkeimung zu bearbeiten.

Vergleichende Genexpressionsanalysen bieten die Möglichkeit Einsicht in die molekularen Abläufe während der Pollenkeimung und des Pollenschlauchwachstums in Angiospermen zu erlangen. Zur Identifizierung von Genen, die an der Pollenentwicklung und -keimung beteiligt sind, steht beim Mais u.a. die molekularbiologisch und biochemisch gut charakterisierte Mutante *white pollen* (*whp*, COE *et al.*, 1981) zur Verfügung. Diese enthält aufgrund des Ausfalls der Chalconsynthase, dem Schlüsselenzym der Anthocyanbiosynthese, keine Flavonole im Pollen. Der Pollen ist daher farblos und aufgrund der Flavonoldefizienz männlich steril. Die Sterilität der *whp*-Mutante ist auf ein eingeschränktes, vorzeitig arretiertes Pollenschlauchwachstum zurückzuführen, dass durch künstliche Zufuhr von Flavonolen kompensiert werden kann (MO *et al.*, 1992; POLLAK *et al.*, 1995).

1.1. Pollenentwicklung

Die Entwicklung des Pollens erfolgt in den Antheren des Sporophyten. Aus dem zentralen Archespor der Antheren entstehen die Pollenmutterzellen. Diese sind in dem einschichtigen Tapetum eingebettet, das für die Ernährung und Wandbildung der sich entwickelnden Pollenkörner verantwortlich ist. Aus je einer Pollenmutterzelle entstehen durch meiotische Teilung vier haploide, einkernige Mikrosporen. Diese sind von einer Callosewand umgeben und zu einer Tetrade zusammengefaßt. Nach Auflösung der Tetrade und einer ausgeprägten Interphase durchläuft die Mikrospore die Pollen-Mitose I, die eine große, das Pollenkorn fast vollständig ausfüllende vegetative Zelle, die Pollenschlauchzelle, und eine kleine generative Zelle, die Antheridiumzelle, hervorbringt. In der entstandenen Struktur, dem Pollenkorn, liegt die generative Zelle 'endocytisiert' im Cytoplasma der vegetativen Zelle. In einigen Pflanzen z.B. in Mais und *Brassica* erfolgt vor der Anthesis eine zweite mitotische Teilung, bei der die generative Zelle in zwei Spermazellen geteilt wird und trizellulärer Pollen entsteht. In den meisten Pflanzen mit bizellulärem Pollen findet diese Mitose erst während des Pollenschlauchwachstums im Stylus statt (MASCARENHAS, 1990; STRASSBURGER 1991).

Die Überführung des Pollens in einen metabolisch inaktiven Zustand erfolgt durch die Dehydrierung des Pollenkorns. Bei dem Verlassen der Anthere liegt der Wassergehalt von Pollen

zwischen 6 und 60% (KNÖFEL und SEMBDNER, 1995), bei Maispollen bei 57% (KERHOAS *et al.*, 1987). In dieser Form ist der Pollen relativ tolerant gegenüber Umwelteinflüssen während seiner Übertragung auf ein geeignetes Stigma (LIN und DICKINSON, 1984). Moleküle, die zum Schutz der Zellintegrität anstelle des Wassers im Pollen eingelagert werden, sind bisher nicht identifiziert worden. Sucroseeinlagerungen dienen scheinbar als Schutz vor übermäßiger Austrocknung des Pollens, die zum Verlust der Vitalität führen würde (HOEKSTRA *et al.*, 1989).

1.2. Pollinierung

Die Pollinierung beginnt bei Angiospermen mit dem Auftreffen des Pollens auf der Narbe einer weiblichen Blüte und endet mit der Entlassung der Spermazellen aus der Pollenschlauchzelle in den Embryosack. Grundlegende Voraussetzungen für diese Prozesse, die letztlich eine erfolgreiche Befruchtung und Zygotenbildung gewährleisten, sind Erkennung und Signalübertragung zwischen dem männlichen Gametophyten (Pollenkorn, später Pollenschlauchzelle) und dem weiblichen Sporophyten (Stigma, Stylus und Fruchtknoten). In diesem Zusammenhang sind die Prozesse beim *in vitro* und *in vivo* Pollenschlauchwachstum sowie die *in vivo* Abläufe bei der Zell-Zell-Erkennung von großem Interesse. Sie erinnern an die Wechselwirkungen zwischen Pflanzen und Pathogenen (LORD, 2000, siehe 1.4) und an Vorgänge des Nervenzellwachstums im tierischen System (SANDERS und LORD, 1989). Das auf die Spitzenregion beschränkte, polare Wachstum des Pollenschlauchs gilt als schnellstes Wachstum im gesamten Pflanzenreich. Beim Mais erreicht der Pollenschlauch Wachstumsgeschwindigkeiten von 1 cm pro Stunde (MASCARENHAS, 1993).

Adhäsion des Pollenkorns und Rehydrierung

Der erste Schritt der Pollinierung ist die Adhäsion des dehydrierten und metabolisch ruhenden Pollenkorns an ein kompatibles Stigma und seine Rehydrierung. In *Arabidopsis thaliana* sind an der Adhäsion lipophile Moleküle in der Exine beteiligt, deren Verlust das Ausbleiben der Rehydrierung zur Folge hat (ZINKL *et al.*, 1999). Im unmittelbaren Zusammenhang mit der Rehydrierung stehen bei dieser Pflanze die im Pollenkitt vorkommenden Wachse, Lipide und Oleosine (MAYFIELD *et al.*, 2001).

Bei *Brassica* erfolgt die Rehydrierung des Pollens auf dem trockenen Akzeptorstigma zweiphasig über Mikrokanäle zwischen Stigma und Pollen (SARKER *et al.*, 1988). Nach einer Initiationsphase folgt die zweite Rehydrierungsphase, bei der die Intine in die spätere Keimpore gezogen wird und sich als Fuß nach außen stülpt. Durch diese Fußstruktur, die im engen Kontakt mit dem Stigma steht, erfolgt die Auskeimung des Pollenschlauchs (ELLEMAN *et al.*, 1992).

Keimung und Pollenschlauchwachstum

Im Anschluss an die erfolgreiche Rehydrierung des Pollens durch kontrollierte Wasseraufnahme über distinkte Wasserniveaus (BUITINK *et al.*, 1996; GILISSEN, 1977; ZUBERI und DICKINSON, 1985) erfolgt die Aktivierung von eingelagerten RNAs, Proteinen und anderen bioaktiven Molekülen, die zur Keimung und zum Auswachsen des Pollenschlauchs führt. Bei trockenen Stigmata penetriert der Pollenschlauch direkt und wächst durch die extrazelluläre Matrix (ECM) des Stigmas in den Transmissionsweg (*transmission tract*) des Stylus. Bei feuchten Stigmata wird er, vor der Penetration durch chemotropische Signale, zum zentralen Bereich des Pistills geleitet und wächst erst hier in die ECM ein (LORD, 2003). Das Eindringen in den Transmissionsweg scheint durch eine Vielzahl von im Pollenschlauch - exprimierten Proteinen erleichtert zu werden. Hierzu zählen u.a. Cutinasen (HISCOCK *et al.*, 1994), Polygalacturonasen (DEARNAKEY und DAGGARD, 2001), Pectinesterasen (MU *et al.*, 1994), Glucanasen (KOTAKE *et al.*, 2000; DOBLIN *et al.*, 2001) und Endoxylanasen (BIH *et al.*, 1999). Diese Enzyme modifizieren die in die ECM von Stigma und Stylus sekretierten bioaktiven Moleküle wie Zucker, Polysaccharide, glycosylierte Proteine und Lipide (KNOX, 1984).

Strukturanalysen von LENNON und LORD (2000) zeigten, dass die extrazellulären Matrizen des Pollenschlauchs und des Pistills bei ihrem Zusammentreffen zu einer Einheit verschmelzen. In Lilien konnte in diesem Kontext das 9 kD-große *stigma/stylar cystein-rich adhesin* (SCA) identifiziert werden (PARK *et al.*, 2000; MOLLET *et al.*, 2000). Zusätzliche chemotropische Funktionen des SCA zeigen Parallelen zur Leitung von wachsenden Neuronen im tierischen System. Hier erfolgt das Wachstum über einen chemotaktischen Leitweg aus Matrixmolekülen (Laminin) und kleinen Peptiden (Netrin, HEDGECOCK und NORRIS, 1997; SONG und POO, 2001).

Mit dem Eintritt des Pollenschlauchs in den Stylus wird das Cytoplasma vollständig aus dem Pollenkorn in den Pollenschlauch überführt und sukzessive mit der wachsenden Pollenschlauchzelle nachgezogen. Durch die regelmäßige Bildung von Zwischenwänden aus Callose, sogenannten *callose-plugs*, werden ältere, cytoplasma-entleerte Zellbereiche von der Spitzenregion des Pollenschlauchs abgetrennt (LORD *et al.*, 1996; LORD, 2000).

Aufgrund des polaren Charakters der Pollenschlauchzelle mit ausgeprägtem Spitzenwachstum (TAYLOR und HEPLER, 1997) und der regelmäßigen Einlagerung von *callose-plugs* ist das Mitführen der *male germ unit* (MGU), bestehend aus dem vegetativen Nucleus und der endocytierten generativen Zelle¹ bzw. den beiden aus ihr hervorgegangenen Spermazellen²,

¹ bei bizellulärem Pollen

² bei trizellulärem Pollen

elementar. Der Transport der *MGU* wird durch Myosine in Verbindung mit F-Actin (LORD *et al.*, 1996), möglicherweise auch durch Mikrotubuli und den Motorproteinen Kinesin und Dynein, gewährleistet (ASTROM *et al.*, 1995; CAI *et al.*, 1996; JOOS *et al.*, 1994).

Cytoplasmaströmung und Cytoskelett

Innerhalb des Cytoplasmas fällt während des Pollenschlauchwachstums eine charakteristische, an eine umgekehrte Fontäne erinnernde Strömung auf, die sich bis kurz vor die Pollenschlauchspitze erstreckt. In der unmittelbaren Spitzenregion läßt sich lichtmikroskopisch kein Cytoplasma identifizieren. In diesem Bereich, der sogenannten klaren Zone (*clear zone*), erfolgt das Spitzenwachstum durch Verschmelzen von Golgi-Vesikeln mit dem Pollenschlauchapex und Exocytose von Strukturmolekülen. Die Vesikelfusionsraten sind für die Geschwindigkeit des Pollenschlauchwachstums verantwortlich, während der Turgor des Pollenschlauchs nur eine untergeordnete Rolle zu spielen scheint (BENKERT *et al.*, 1997).

Eine hohe Calciumkonzentration am Apex der Spitzenregion ist desweiteren für die Exocytoseaktivität und/oder die Anheftung der Golgi-Vesikel an die Plasmamembran unentbehrlich (ROY *et al.*, 1999; LANCELLE *et al.*, 1997). Möglicherweise wird die Verschmelzung von Vesikeln mit der Membran auch durch eine calciumabhängige Kinase unterstützt (YANG, 1998).

In Tieren werden das Actincytoskelett, die Axonleitung, Prozesse des Zellzyklus, die Interaktion zwischen Zellen und die Zellpolarität u.a. durch Rop GTPasen reguliert. In Pflanzenpollen sind Rop GTPasen für die Akkumulation des Calciums am Schlauchapex mitverantwortlich (GU *et al.*, 2003). Das Genprodukt eines der elf in *Arabidopsis* identifizierten *Rop*-Gene, ROP1, ist streng auf den Apexbereich beschränkt und an der Regulation des Pollenschlauchwachstums beteiligt. ROP1 reguliert über die Calciumkonzentration indirekt das oszillierende Auftreten von Actin-Filamenten (FU *et al.*, 2001; LI *et al.*, 1999). In der Elongationsphase ist die Calciumkonzentration hoch und die Actinstrukturen sind reduziert. In der Phase langsamen Wachstums sind die Verhältnisse umgekehrt (GU *et al.*, 2003).

Adhäsion und Fortleitung des wachsenden Pollenschlauchs

Der Aufbau der Pollenschlauchwand und der Pollenschlauchspitze hat wesentlichen Einfluss auf die Leitung und Adhäsion des Pollenschlauchs in der ECM des Stylus. Die Pollenschlauchwand ist zweilagig, selten dreilagig. Einer inneren, festen Callosoescheide (1,3- β -Glucan) ist eine fibrilläre Schicht aus Pectin, Hemicellulose und Cellulose aufgelagert. Die fibrilläre Schicht scheint eine Ausstülpung des pectinreichen Teils der Intine zu sein, die im Bereich der Pollenschlauchspitze callosefrei ist (HESLOP-HARRISON, 1987).

Pectinester beschränken sich auf die wachsende Spitzenregion und sind in weiter distal liegenden Bereichen des Pollenschlauchs nicht zu finden, wohingegen sie in unveresterter Form die älteren festen Schlauchzellbereiche bedecken (LENNON und LORD, 2000; LI *et al.*, 1997). Nach FRANKLIN-TONG (1999) werden Pectine im Golgi-Apparat polymerisiert, verestert und durch die Vesikel am Apex des wachsenden Pollenschlauchs als Baumaterial sekretiert. Nach ihrer Entesterung werden sie calciumabhängig zu Pectinpolymeren verknüpft. Möglicherweise erfolgt die Adhäsion des Pollenschlauchs im Transmissionsweg durch eine Quervernetzung von Pectinpolymeren der Pollenschlauchwand und der Stylus-ECM durch SCA-Proteine (MOLLET *et al.*, 2000).

Die Stylusmatrix hat neben leitenden Aufgaben auch Aufgaben als Nährstofflieferant für den schnell wachsenden Pollenschlauch (BOSCH *et al.*, 2000). So wird das chemotropisch auf den Tabak-Pollenschlauch wirkende Protein TTS (*transmitting tract specific glycoprotein*) auch als Quelle für Strukturmoleküle verwendet. Die aus den TTS-Proteinen durch Deglycosylierung freiwerdenden Zucker werden in die Pollenschlauchwand integriert (CHEUNG *et al.*, 1995; WU *et al.*, 2001; CLARKE *et al.*, 2000).

Calcium wurde lange Zeit für den chemotropischen Faktor der Pollinierung und der Pollenschlauchleitung gehalten. Außer in *Antirrhinum* sind bisher jedoch keine Calciumgradienten in Stylen nachgewiesen worden. Hinweise auf eine durch Pollinierung induzierte Calciumsekretion in der gesamten ECM des Stylus gibt es nicht. In der Stylus-ECM von Petunie wird an Pectinester gebundenes Calcium durch die pollenschlauchvermittelte Degradation der Ester freigesetzt und wird vom Pollenschlauch durch Kanäle am Apex aufgenommen (LENARTOWSKA *et al.*, 2001). Auch wenn Calcium nicht grundsätzlich auf die Pollenschlauchleitung wirkt, so hat es doch Einfluss auf dessen Wachstumsgeschwindigkeit und über calciumabhängige Rezeptorkinasen auf die Reorientierung der wachsenden Schlauchspitze (PIERSON *et al.*, 1996; MALHÓ und TREWAVAS, 1996; FRANKLIN-TONG, 1999). Funktionen als *second messenger* hat Calcium auch in *Brassica oleracea* und zwar während des Auskeimens des Pollenschlauchs (ELLEMANN und DICKINSON, 1999).

Derzeit wird angenommen, dass die Fortleitung des wachsenden Pollenschlauchs im Pistill bis hin zum Ovar verschiedenen *Wegweisern* folgt. Hier übernehmen chemotropische Substanzen der Synergiden, möglicherweise Calcium (CHAUBAL und REGER, 1992), die Leitung des Pollenschlauchs bis hin zur Entlassung der beiden Spermazellen in den Embryosack (HIGASHIYAMA *et al.*, 2001, 1998). Die Erkennung der chemotropischen *Wegweiser*, z.B. Liganden in der Stylusmatrix durch Rezeptorkinasen in der Pollenschlauchwand, wird derzeit intensiv untersucht.

Neben Proteinkinasen des LRR-Typs³, wie z.B. die PEX-Glycoproteine in den Pollenschlauchwänden in Mais und Tomate (STRATFORD *et al.*, 2001), sind Kinasen des S-Domain-Typs identifiziert worden, die bei der Selbstinkompatibilität (SI) in *Brassica* eine zentrale Rolle spielen (vgl. 1.4). In diesem Zusammenhang ist der SI-Faktor SCR⁴ aus der Pollen-ECM isoliert worden. Hierbei handelt es sich, wie auch beim Stylus-ECM-Protein SCA, um ein cysteinreiches Protein mit Homologien zu Proteinen der Pathogenabwehr (LORD, 2003). Cysteinreiche Sekretionsproteine sind mehrfach als Liganden für Rezeptorkinasen ins Gespräch gebracht worden. Im tierischen System konnte gezeigt werden, dass cysteinreiche Proteine neben Chemotaxis auch Adhäsion vermitteln und antimikrobiell wirken. So ist z.B. Allurin ein spermiumchemotaktisches Peptid in *Xenopus*, das ebenfalls Einfluss auf die Adhäsion des Spermiums an das Ei hat (LI *et al.* 2001; OLSON *et al.*, 2001).

1.3. Flavonole und die Fertilität von Pollen

Bei der Pollenkeimung in Angiospermen haben Flavonole, eine Klasse der Flavonoide, eine wesentliche Bedeutung (MO *et al.*, 1992; YLSTRA *et al.*, 1994). Flavonole sind sporophytischen Ursprungs und werden nach ihrer Synthese im Tapetum, z.T. in sehr großen Mengen, ins Cytoplasma des sich entwickelnden Gametophyten aufgenommen (WIERMANN und GUBATZ, 1992; VOGT und TAYLOR, 1995). Die Identifizierung von flavonoldefizienten selbststerilen Mutanten in Mais und Petunie lieferte Erkenntnisse hinsichtlich der Notwendigkeit der Flavonole für die männliche Fertilität bei Pflanzen. In der *white pollen*-Mutante aus Mais (*whp*, COE *et al.*, 1981) führt der Flavonolmangel durch den Ausfall beider Chalconsynthase-Gene des Anthocyanbiosynthesewegs, *C2* und *Whp* (WIENAND *et al.*, 1986; FRANKEN *et al.*, 1991), zur männlichen Sterilität. Diese Sterilität äußert sich in einem eingeschränkten Pollenschlauchwachstum (MODENA, 1982; POLLAK *et al.*, 1995), bei dem die Pollenschläuche im Narbenfaden vor dem Erreichen der weiblichen Samenanlage platzen (HANSEN und TAYLOR, 1982). Der auftretende Defekt ist biochemisch durch Flavonolzugabe kompensierbar, so dass ein funktionsfähiger Pollenschlauch ausgebildet wird, der zur Befruchtung in der Lage ist. Eine Befruchtung kann ebenfalls durch Verkürzung der Narbenfäden vor der Pollinierung herbeigeführt werden (MO *et al.*, 1992; VOGT *et al.*, 1994). Transgene Petunien mit supprimiertem Chalconsynthase-Gen synthetisieren ebenfalls keine Flavonole und sind männlich steril. Die Fertilität ihres Pollens ist jedoch, anders als bei der *whp*-Mutante, durch das Auskeimen des flavonoldefizienten Pollens auf einem flavonolhaltigen *Wildtyp*-Stigma rekonstituierbar (TAYLOR und JORGENSEN, 1992; VOGT *et al.*, 1994). Aufgrund der Wiederherstellbarkeit der Fertilität durch Zuführung von Flavonolen spricht man von konditioneller männlicher

³ *Leucin-Rich-Repeat*

⁴ *S-Locus cystein-rich protein*

Fertilität⁵ (CMF, TAYLOR und JORGENSEN, 1992; POLLAK *et al.*, 1995). Sehr wahrscheinlich handelt es sich bei Flavonolen um Liganden eines rezeptorvermittelten Signalübertragungswegs (TAYLOR und HEPLER, 1997)

1.4. Analogien zwischen Prozessen der Pollinierung und der Interaktion von Pathogen und Wirt

Obwohl es sich bei der Pollinierung und der Pathogenabwehr um Prozesse mit unterschiedlichen Zielen handelt, gibt es eine Reihe von Parallelen zwischen beiden Mechanismen. Die auf den ersten Blick auffälligsten Parallelen zwischen der Interaktion von Pollen und Stigma auf der einen und Pathogen und Wirtszelle auf der anderen Seite sind morphologischer Natur. Hier die Penetration der Papillarzelle des Akzeptorstigmas durch den auskeimenden Pollenschlauch und Wachstum im weiblichen Stylusgewebe, dort die Infektion epidermaler Zellen (DICKINSON, 1995) z.B. durch den Typ-III-Sekretionsapparat (GALAN und COLLMER, 1999) oder durch eindringende Pilzhyphen mit anschließendem intrazellulären Wachstum.

Auch auf molekularer Ebene gibt es beträchtliche Ähnlichkeiten. Mechanismen der Signalweiterleitung gewährleisten in beiden Systemen die Erkennung des jeweiligen *Eindringlings* und leiten entsprechende Reaktionen ein.

Bei der Pollinierung (1.2) dient die Signalübertragung der Kommunikation zwischen männlichem Gametophyten und weiblichem Sporophyten und führt u.a. zur Erkennung von Eigen- und Fremdpollen oder kompatiblen und inkompatiblen Pollen, ermöglicht die Zell-Zell-Erkennung oder reguliert das Pollenschlauchwachstum im weiblichen Stylus.

In der Pathogenabwehr werden durch die spezifische Erkennung eines Pathogens verschiedene Signaltransduktionswege aktiviert, um eine effektive Abwehr des Krankheitserregers einzuleiten und eventuell die Resistenz gegenüber dem Pathogen zu vermitteln.

Überaus deutlich werden diese Analogien bei einer Gegenüberstellung des Liganden-Rezeptor-Modells der pflanzlichen Pathogenabwehr und der sporophytischen Selbstinkompatibilität in *Brassica*.

Die Pathogenabwehr in Pflanzen

Pflanzen haben in Ermangelung eines zirkulierenden Immunsystems, dass in der Lage ist, schnell und effizient eindringende Erreger zu erkennen und unschädlich zu machen, individuelle Mechanismen zur Erkennung und Abwehr von Pathogenen entwickelt. Die Erkennung eines Pathogens beruht auf der spezifischen Interaktion zwischen einem vom Pathogen ex-

⁵ *conditional male fertility*

primierten Liganden, dem sogenannten *Elicitor*, und einem korrespondierenden pflanzeigenen Rezeptor. Die nach der Erkennung vermittelten ersten Schritte der Abwehrreaktion sind Ionenflüsse (insbesondere von Calcium) und Veränderungen des Phosphorylierungszustands von Proteinen der betroffenen Zellen. Die Bildung von Salicylsäure, Stickoxiden und toxischen Sauerstoffprodukten führen u.a. zur systemischen Ausbreitung der Pathogenabwehr, zur hypersensitiven Antwort und letztlich zum lokalen Zelltod.

Aufgrund der Expression von Ligand und Rezeptor durch zwei komplementäre Gene, einem Avirulenzgen *avr* und einem Resistenzgen *R*, spricht man von einer *Gen-durch-Gen* vermittelten Resistenz (KEEN, 1990; DANGL, 1994; VAN DER BIEZEN und JONES, 1998; HOLT III. *et al.*, 2000). Die Erkennung von Avirulenzsignalen, die intrazellulär oder extrazellulär im Wirtsorganismus auftreten, wird durch *R*-Rezeptoren mit LRR-Domäne⁶ vermittelt. Die im Bereich der LRR-Domäne des *R*-Proteins stattfindende Interaktion mit einem *Elicitor* ist spezifisch. Neben *R*-Proteinen mit extrazellulärer LRR-Rezeptordomäne sind cytoplasmatische, eng mit der Plasmamembran assoziierte LRR-Rezeptoren bekannt, die zusätzlich über eine Domäne mit Nukleotidbindestelle (NB) verfügen (HOLT III *et al.*, 2000).

Ein solches *R*-Protein ist PRF⁷ (SALMERON *et al.*, 1994), das zusammen mit LePTO (MARTIN *et al.*, 1993) die Resistenz in Tomate gegenüber *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* vermittelt (Abb 1-1). Im nicht induzierten Zustand bildet das LRR-NBS-LZ⁶-Protein PRF einen wenig stabilen Komplex mit der membranständigen Serin/Threonin-Proteinkinase LePTO (MARTIN *et al.* (2003). Die Interaktion von LePTO mit dem Avirulenzsignal AvrPto, das über den Typ-III-Sekretionsweg (GALAN und COLLMER, 1999) von *Pseudomonas* eingebracht wird, führt nach Meinung von RATHJEN *et al.* (1999) zur Aktivierung von LePTO und infolgedessen zu einer Stabilisierung des Rezeptorkomplexes. MARTIN *et al.* (2003) nehmen in ihrem *affinity enhancement*-Modell an, dass die Stabilisierung des Rezeptorkomplexes zu dessen Mengenzunahme führt. Diese bewirkt die AvrPto-abhängige Progression der Basalresistenz hin zur spezifischen Resistenzantwort. Ein stromabwärtsgelegenes Element von LePTO ist die Serin/Threonin-Proteinkinase LePTI1 (*PTO INTERACTOR 1*, ZHOU *et al.*, 1995), die LePTO als Phosphorylierungssubstrat dient. LePTI1 überträgt das Phosphorylierungssignal auf ein bisher unbekanntes Substrat weiter (SESSA *et al.*, 2000; BOGDANOVA und MARTIN, 2000).

⁶ LRR: *leucin-rich-repeat* NB: *nucleotid binding site* LZ: *leucin-zipper*

⁷ *Pto resistance and fenthion sensitivity*

führt, erfolgt über eine Signalkaskade an der drei SI-Faktoren beteiligt sind. Gemeinsam bilden die beiden weiblichen und der männliche SI-Faktor eine Inkompatibilitätsgruppe, den sogenannten S-Haplotyp, der in einem der insgesamt etwa 80 S-Loci codiert wird (BRUGIÈRE *et al.*, 2000).

Die beiden weiblichen SI-Faktoren sind das zellwandassoziierte S-Locus Glycoprotein (SLG) und die in der Zellwand der Papillarzelle lokalisierte S-Rezeptor Kinase (SRK). Das Glycoprotein SLG wird ausschließlich im Stigma exprimiert und in großer Menge in dessen ECM sekretiert. Die Aminosäuresequenz des SLG-Proteins weist innerhalb des S-Haplotypen eine über 90%-ige Homologie zur S-Domäne der SRK auf. Die Rezeptorkinase besitzt neben der extrazellulären S-Domäne mit charakteristischen 10-12 Cysteinresten, eine Transmembrandomäne und eine cytoplasmatische Domäne mit Serin/Threonin-Kinaseaktivität (NASRALLAH und NASRALLAH, 1993).

Der männliche SI-Faktor S-Locus cystein-rich protein (SCR) ist ein 6 kD-großes, cysteinreiches Protein, das dem Pollen während seiner Reifung aus dem Tapetum aufgelagert wird. Alle bisher identifizierten SCRs haben ein hochkonserviertes Sekretionssignalpeptid und sind, abgesehen von einem Glycin- und acht Cysteinresten⁸, in den unterschiedlichen Inkompatibilitätsgruppen wenig konserviert.

Die Initiation der SI-Antwort beginnt mit der Diffusion der SCR-Proteine aus dem Pollenkitt in die Zellwand der Stigma-Papillarzellen und der Bindung an die extrazelluläre S-Domäne eines SRK-Homo-Multimers. Jede Rezeptorkinase dieses Multimers ist im inaktiven Zustand im Bereich der Kinasedomäne mit zwei Thioredoxin-H-ähnlichen Proteinen (THL1 und THL2) assoziiert, die die Autophosphorylierung der SRK verhindern (GIRANTON *et al.*, 2000; MAZZURCO *et al.*, 2001; CABRILLAC *et al.*, 2001). Mit der Bindung eines SCR-Proteins an die extrazelluläre S-Domäne einer SRK des selben Haplotyps dissoziieren die THL-Proteine und die reaktivierte Rezeptorkinase initiiert über ihre Autophosphorylierung eine Phosphorylierungskaskade. Im Verlauf dieser Kaskade wird ein intrazelluläres Akzeptorprotein phosphoryliert. Ein mögliches SRK-Substrat ist die stigmaspezifisch exprimierte E3 Ubiquitinligase ARC1⁹ (GU *et al.*, 1998), die die Degradation von Stigmaproteinen veranlassen kann (STONE *et al.*, 2003). Sollten hier von Stigmaproteinen betroffen sein, die die Pollinierung unterstützen, könnte dies zur Ablehnung des inkompatiblen Pollens führen (HISCOCK und MCINNIS, 2003). Neben einer gestörten Adhäsion des Pollenkorns, die die Pollenkeimung und die Penetration des Stigmas blockiert (NASRALLAH *et al.*, 1994), wird im Zusammenhang mit der SI die Unterbindung der Pollen-Rehydrierung diskutiert (IKEDA *et al.*, 1997).

⁸ Konsensus: X₂₋₁₀CX_{5/7}GXCX₅₋₈CX₈₋₁₅CXCX₅₋₁₁CX_{0/1}CX₀₋₆CX₀₋₆

⁹ arm-repeat-containing 1

Genkartierungen zeigen, dass in nahezu allen bisher untersuchten S-Loci das *SCR*-Gen des männlichen SI-Faktors zwischen den beiden zugehörigen *SLG*- und *SRK*-Genen der weiblichen SI-Faktoren lokalisiert ist (BRUGIÈRE *et al.*, 2000). Diese enge Nachbarschaft der drei Komponenten eines S-Haplotyps zeigt deutliche Parallelen zum Histokompatibilitätskomplex in *Mammalia* (NASRALLAH *et al.*, 1994) und zu der genetischen Organisation bei der Pathogenabwehr in ein komplementäres Genpaar aus Avirulenz- und Resistenzgenen (siehe oben).

1.5. Genexpression während der Pollenentwicklung und Pollinierung

Es wird davon ausgegangen, dass im Mais insgesamt etwa 20.000 Gene an der Pollenentwicklung beteiligt sind (MASCARENHAS, 1990; TWELL, 1994). Davon gelten etwa 6% als ausschließlich pollenexprimiert (SARI-GORLA *et al.*, 1986).

Die Genexpression in sich entwickelnden Pollen ist in zwei Phasen unterteilt. In der ersten Phase, nach Meiose und Auflösung der Tetrade, werden in der haploiden Mikrospore rRNAs, tRNAs sowie mRNAs *früher Gene* exprimiert, die für Proteine mit Funktionen während der Mikrosporendifferenzierung und Entwicklung codieren. Mit dem Einsetzen der Pollen-Mitose I beginnt die Transkription der *späten Gene* mit Funktionen bei der Keimung und dem Pollenschlauchwachstum (MASCARENHAS, 1990).

Im reifenden Pollenkorn kommt die Translation wegen der, mit zunehmender Dehydrierung des Pollenkorns steigenden, intrazellulären Kaliumkonzentration zum Erliegen (BASHE und MASCARENHAS, 1984). Die Einstellung der Translation hängt möglicherweise mit einer gestörten Ausbildung eines funktionsfähigen Initiationskomplexes und der Stabilisierung von RNA-Sekundärstrukturen bei steigenden Salzkonzentrationen zusammen (TWELL, 1994).

Die zum Zeitpunkt der Reife in Pollen eingelagerten, großen Mengen an Proteinen und RNAs sind für den schnellen Keimprozess und das Schlauchwachstum essentiell (MASCARENHAS, 1990; TWELL, 1994). Studien mit Inhibitoren der RNA- bzw. Proteinsynthese haben gezeigt, dass die Keimung und das frühe Pollenschlauchwachstum in den meisten Spezies von der Translation und nicht von der Transkription abhängen (MASCARENHAS, 1993). Vermutlich erfolgt die Translation eingelagerter mRNAs an Polysomen, die nach der Rehydrierung aus den gespeicherten rRNAs gebildet werden. Nach MASCARENHAS und MERMELSTEIN (1981) werden 50% der neu synthetisierten Proteine im Pollen von mRNAs translatiert, die zum Zeitpunkt der Anthesis bereits eingelagert waren.

Der Gehalt an Gesamt-RNAs in einem Maispollenkorn beträgt 350-700 pg, von denen 2,5% mRNAs sind (MASCARENHAS *et al.*, 1984). Von diesen mRNAs treten etwa 85% häufig (bis zu 1.700 Kopien) oder sehr häufig (bis 32.000 Kopien) im Pollenkorn auf. 15% der mRNAs werden von 17.000 seltenen Sequenzen (mit bis zu 200 Kopien je Pollenkorn) repräsentiert.

Wegen der höchst unterschiedlichen Umweltbedingungen während der Pollinierung ist die Genexpression und ihre Regulationsmechanismen während der Pollenkeimung und des Schlauchwachstums sehr komplex. Daher ist die Zahl der bis heute identifizierten *keimungsabhängig exprimierten* Gene gering. Isolierte Sequenzen aus cDNA-Bibliotheken keimender Pollen repräsentieren meist Gene, die schon während der Pollenreifung aktiv transkribiert und nicht erst durch die Keimung oder das Pollenschlauchwachstum induziert werden (TAYLOR und HEPLER, 1997). Einige pollenspezifisch exprimierte Gene und die Funktion ihrer Produkte sind im Folgenden dargestellt.

Frühe Pollengene und ihre Produkte

Als Produkte früher Gene wurden u.a. Actin- und Hitzeschockproteine isoliert, sowie solche Genprodukte, die der Aufrechterhaltung des normalen Zellmetabolismus dienen: Alkoholdehydrogenasen, β -Galactosidasen, Glucosidasen, Transaminasen u.a. (MASCARENHAS, 1990).

Späte Pollengene und ihre Produkte

Als Produkte später Gene wurden überwiegend Proteine identifiziert, die am Zellwandmetabolismus oder an Aufbau und Regulation des Cytoskeletts beteiligt sind. Dazu gehören:

- Pollen Extensin-ähnliche Proteine (PEX) aus Mais und Tomate mit N-terminalem LRR und C-terminaler Extensindomäne. Diesen, in der Calloeschicht von Pollenschläuchen lokalisierten Proteinen, werden Funktionen bei der Interaktion von Pollen und Pistill zugeschrieben (RUBINSTEIN *et al.*, 1995; STRATFORD *et al.*, 2001).
- Die putative Pectinmethylesterase ZmC5, deren Aufgabe die Demethylierung von Pectinen bei der Pectindegradation durch Polygalacturonasen und Pectatlyasen im Verlauf des Pollenschlauchwachstums ist (WAKELEY *et al.*, 1998).
- Das Produkt, des in der vegetativen Zelle des Pollens transkribierten *ntp303*-Gens aus *Nicotiana tabacum* (WETERINGS *et al.*, 1992)
- Eine pectindegradierende Polygalacturonase die *differentiell lokalisiert* ist: im reifen Pollen ist sie im Cytoplasma lokalisiert, nach der Keimung in der Zellwand (ALLEN und LONSDALE, 1993).
- Zwei Actinbindeproteine ZmABP1 und ZmABP2 sind Actinpolymerisierungsfaktoren (ADF, LOPEZ, *et al.*, 1996).
- Eine calciumabhängige, calmodulinunabhängige Proteinkinase (CDPK) mit möglicher regulatorischer Funktion beim Aufbau des Cytoskeletts (ESTRUCH *et al.*, 1994).

Darüber hinaus wurden pollenspezifisch exprimierte Kinasen des LRR- und S-Domain-Typs identifiziert:

- Die Serin/Theronin-Rezeptorproteinkinase PRK1 aus *Petunia inflata* mit einer *Leucin-reichen-Wiederholung* in der extrazellulären Domäne hat mögliche Funktionen bei der Signalweiterleitung während der Pollenentwicklung oder des Pollenschlauchwachstums (MU *et al.*, 1994; LEE *et al.*, 1996).
- Die LRR-Rezeptorkinasen LePRK1, LePRK2 (MUSCHIETTI *et al.*, 1998) und LePRK3 aus Tomate sowie die PRK1-homologe Kinase aus Mais ZmPRK1 (KIM *et al.*, 2002). Vergleiche hierzu auch 4.3.
- Das Produkt des späten Pollengens *lat52* zeigt Homologien zu Kunitz Trypsin-Inhibitoren und hat Einfluss bei der Rehydrierung des Pollens (MUSCHIETTI *et al.*, 1994).

Einige Pollenproteine sind als *keimungsabhängig translatiert* identifiziert worden und existieren im reifen, metabolisch ruhenden Pollen noch nicht:

- Phytasen aus Pollen von Lilie und Petunie (LIN *et al.*, 1987)
- Ein 65 kD-Protein aus Tabak konnte erst nach dem Einsetzen der Pollenkeimung nachgewiesen werden. Das Tabakprotein wird offensichtlich von prä-synthetisierten mRNAs translatiert (CAPKOVA *et al.*, 1988).

1.6. Promotoren von pollenspezifisch exprimierten Genen

Mechanismen der gewebespezifischen Genexpression in Pollen von monocotyledonen und dicotyledonen Pflanzen sind bisher wenig bekannt. Gründe hierfür sind der im Vergleich zu prokaryotischen Promotoren relativ komplexe Aufbau eukaryotischer Promotoren sowie methodische Schwierigkeiten für eine erfolgreiche transiente Pollen-Transformation.

Untersuchungen von pollenspezifisch exprimierten Genen aus Monokotyledonen wie Mais und Dicotyledonen wie Tomate, Tabak und *Brassica* (HAMILTON *et al.*, 1998; KYOZUKA *et al.*, 1994; STRATFORD *et al.*, 2001; BATE und TWELL, 1998; ROGERS *et al.*, 2001; DZELZKALNS *et al.*, 1993) haben gezeigt, dass die wesentlichen *cis*-aktiven Sequenzbereiche ihrer Promotoren in einem Bereich von -500 bp bis etwa +300 bp des jeweiligen Transkriptionsstarts zu finden sind. Dieser Bereich kann funktionell in eine 5' Region, die die Expressionsstärke z.B. durch *Enhancer*-Motive wie das 6 bp große quantitative *Element Q* (HAMILTON *et al.*, 1998) bestimmt, und eine für die Gewebespezifität verantwortlich 3' Region, die etwa etwa bei Basenpaar -100 beginnt, unterteilt werden (HAMILTON *et al.*, 1998; BATE und TWELL, 1998; ROGERS *et al.*, 2001; DZELZKALNS *et al.*, 1993). Die Sequenzen der entsprechenden *Enhancer*- und Spezifitäts-Elemente variieren stark, so dass allgemeingültige Konsensus-Sequenzen einzelner Motive nicht abgeleitet werden können.

1.7. Zielsetzung

Bisher ist nur eine geringe Zahl von Genen, die an der Pollenkeimung und dem Pollenschlauchwachstum beteiligt oder für die Pollenfertilität verantwortlich sind, bekannt. Für die Identifizierung solcher Gene bietet sich vor allem ein Vergleich der Genexpression zwischen fertilem und sterilem Pollen an. Bereits etablierte Subtraktionsmethoden zur Identifizierung von differentiell exprimierten Genen und geeignete *in vitro* Systeme der Pollenkeimung sind in Kombination mit männlich sterilen Mutanten vielversprechende Werkzeuge, um das Wissen in den elementaren biologischen Prozess der Pollinierung zu vertiefen.

In der ökonomisch bedeutenden Kulturpflanze Mais konnten dagegen bislang nur wenige pollenspezifisch exprimierte Gene identifiziert werden (1.5). Für keines dieser Gene konnte bisher ein kausaler Zusammenhang zur Pollenfertilität gefunden werden. Ein vielversprechendes Untersuchungsobjekt zur Identifizierung von relevanten Genen der Pollenentwicklung und -keimung bietet die *white pollen*-Mutante des Mais (*whp*; 1.3). So könnte ein Vergleich der Transkripte in keimendem Pollen des fertilen *Wildtyps* und der männlich sterilen *whp*-Mutante die Möglichkeit eröffnen, einerseits generell pollenspezifisch exprimierte Gene zu identifizieren und andererseits deren Rolle bei der flanolabhängigen Pollenfertilität zu untersuchen. Dabei bietet Mais, gerade auch aufgrund seiner getrenntgeschlechtlichen Blüten, seines großen Habitus und der hervorragenden Eignung zur manuellen und kontrollierten Pollinierung, deutliche Vorteile gegenüber anderen Modellpflanzen, wie z.B. *Arabidopsis*.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, mit Hilfe der molekularen subtraktiven Hybridisierung Gene des Mais zu identifizieren, die während der Pollenentwicklung, -keimung oder dem Pollenschlauchwachstum und/oder differentiell in *Wildtyp* und *whp*-Pflanzen exprimiert werden. Im weiteren Verlauf der Arbeit können solche Gene molekularbiologisch auf Transkriptions-, Translations- und Funktionsebene analysiert werden. Ihre Bedeutung für die Pollinierung soll einerseits durch vertiefende Studien an *Wildtyp*- und *whp*-Pflanzen und andererseits mit Hilfe von transgenen Ansätzen, z.B. durch Ausschalten der Gene im PTGS¹⁰-Ansatz, untersucht werden.

¹⁰ *post-transcriptional gene silencing*

2. Materialien und Methoden

2.1. Materialien

2.1.1. Chemikalien, Radiochemikalien, Enzyme und Kits

Alle eingesetzten Chemikalien wurden mit dem Reinheitsgrad *zur Analyse (p.A.)* von den Firmen Amersham Biosciences (Freiburg), AppliChem (Darmstadt), Applied Biosystems (Darmstadt), Biomol (Hamburg), Biozym (Oldenburg), Duchefa (Haarlem, NL), Fluka (Neu-Ulm), Invitrogen (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), Qiagen (Hilden), Roche Diagnostics (Mannheim), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg), Sigma Aldrich (München) und Stratagene (Heidelberg) bezogen.

Die radioaktive Markierung von Nucleinsäuren erfolgte mit α -[³²P]-dCTP (3.000Ci/mmol), die von Proteinen durch Phosphorylierung mit γ -[³²P]-ATP (3.000Ci/mmol) der Firma Amersham Biosciences (Freiburg).

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Enzyme stammten von den Firmen Amersham Biosciences (Freiburg), Invitrogen (Karlsruhe), MBI Fermentas (St. Leon-Roth) und Roche Diagnostics (Mannheim).

In dieser Arbeit verwendete molekularbiologische *Kits* lieferten die Firmen Amersham Biosciences (Freiburg), BD Biosciences (Heidelberg), Invitex (Berlin), Macherey-Nagel (Düren), Qiagen (Hilden) und Stratagene (Heidelberg).

2.1.2. Medien und Reagenzien

Sämtliche Lösungen wurden mit Wasser angesetzt, das über eine Aufbereitungsanlage *Millipore Milli-Q Plus* (Millipore, Billerica, USA) bis zu einer Qualität von *aqua bidest* aufgereinigt wurde. In der Regel wurden alle Lösungen durch ein 20-minütiges Erhitzen auf 125°C bei $2 \cdot 10^5$ Pa sterilisiert. Alle nachfolgend nicht erwähnten Standardrezepte wurden nach SAMBROOK *et al.* (1989) durchgeführt.

2.1.3. Größenstandards

Zur Größenbestimmung von DNA-Fragmenten wurden die *SmartLadder* (Eurogentec, Seraing, Belgien), die *1 kb DNA Ladder* (Invitrogen, Karlsruhe) und der *DNA Molecular Weight Marker II* (Roche Diagnostics, Mannheim) verwendet. Ferner kamen bei Hybridisierungen mit dem DIG-System der Firma Roche Diagnostics (Mannheim) die digoxigeninmarkierten DNA Standards *DNA Molecular Weight Marker II* und *VII* zum Einsatz.

Die Größenbestimmung von RNAs erfolgte mit der *0.16-1.77 kb RNA Ladder* (Invitrogen, Karlsruhe) und der *RNA Ladder, High Range* (MBI Fermentas, St. Leon-Roth).

Das Molekulargewicht von Proteinen wurde mit dem *SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Standard* (Invitrogen, Karlsruhe), dem *Prestained Protein Marker, Broad Range (6-175 kDa)* und dem *Protein Marker, Broad Range (2-212 kDa)* der Firma New England Biolabs (Frankfurt am Main) bestimmt.

2.1.4. Primer

In der Arbeit eingesetzte Primer wurden von den Firmen Invitrogen (Karlsruhe), Operon (Köln) und Sigma-Ark (Steinheim) im 10 und 50 nmol-Maßstab synthetisiert und nach Herstellerangaben in *LiChrosolv®*-Wasser zu 100 µM und 10 µM gelöst. Die Stocklösungen wurden bei –20°C gelagert. Eine Übersicht der eingesetzten Primer ist Tab. 2-1 zu entnehmen.

Primer	Primersequenz
D1	CGGTATCGATAAGCTTGA
D2	P-TCAAGCTTATCGATACCGACA
D3	Biotin-CGGTATCGATAAGCTTGA
PRMMH52	CGGAAGCCAACGCTGCATTTTCGC
PRMMH53	TGTGATTTCTCATCGCTGCG
PRMMH55	GGAGTCGCATATGGGATGCTTTTCATGCTG
PRMMH59	GTGAGGCAATGCGTCGATCC
PRMMH62	ATGGCCGACTCCCTAACCT
PRMMH65	TAGGGAGGTCGACATGGGATGCTTTTCATGCTGC
PRMMH66	GGAGTCAGGATCCCTTCACTGCAGATTTTCGTCCC
PRMMH67	TAGGGAGGGTACCATGGGATGCTTTTCATGCTGC
PRMMH68	GGAGTCAAGCTTCTTCACTGCAGATTTTCGTCCC
PRMMH70	GTGGTACTAGCAAGCATGATAA
PRMMH75	ACAAAAAGGGCTTCCTGTGC
PRMMH85	CCGCGAGGCATCTGAAATCG
PRMMH89	CCCTTTACCCTAGCTATATAGATGC
PRMMH100	GCATCTAGAGGCCGACTCCCTAACCTTC
PRMMH101	TAACTGCAGGACAAACGACAAGTTCGGG
PRMMH102	GGCTCTAGAGTTGCCGTTTCGGTCCG
PRMMH103	TGTCTGCAGCAAAACAATCTCAGATGGC
T1	CTCTTGCTTGAATTCGGACTA
T2	P-TAGTCCGAATCAAGCAAGAGCACA
T3-17-mer	ATTAACCCTCACTAAAG

Tab. 2-1: Verwendete Primer

2.1.5. Deponierte *ZmPti1*-Nukleinsäuresequenzen

Die in dieser Arbeit bestimmten Nukleinsäuresequenzen und die aus ihnen abgeleiteten Aminosäuresequenzen der isolierten *ZmPti1*-cDNAs und des *ZmPti1*-Gens sind in GeneBank hinterlegt:

Nukleinsäuresequenz des	GeneBank accession number
<i>ZmPti1</i> -cDNA Klon cSHD56 3a	AY554281
<i>ZmPti1</i> -cDNA Klon cSHD56 3a	AY554282
genomischer <i>ZmPti1</i> -Klon g24	AY554283

Tab. 2-2: Deponierte Nukleinsäuresequenzen in *GeneBank*

2.1.6. Vektoren und Bakterienstämme

Die folgenden *E. coli* Bakterienstämme wurden eingesetzt: *BM25.8* (BD Biosciences, Freiburg), *DH5 α* (QIAGEN, Hilden), *Rosetta(DE3)* (Novagen, Merck Biosciences, Schwalbach), *TOP 10F'* (Invitrogen, Karlsruhe), *XL1-Blue MRA (P2)* und *XL1-Blue MRF* (Stratagene, Heidelberg). Die Anzucht aller Bakterien erfolgte, soweit nicht anders angegeben, nach Herstellerangaben.

Als Plasmid-Vektoren fanden *pBluescript KS* (Stratagene, Heidelberg), *pCR[®]2.1-TOPO* (Invitrogen, Karlsruhe) sowie der *pTriplEx2[™]* (BD Biosciences, Freiburg) Verwendung. Eingesetzte Phagen waren der λ *Fix[®]II* (Stratagene, Heidelberg) und der λ *TriplEx2[™]* (BD Biosciences, Freiburg).

Als Expressionvektoren wurden der *pET-30a* (Novagen/Merck Biosciences, Schwalbach), sowie zwei von Gregory B. Martin¹² zur Verfügung gestellte Expressionvektoren, auf Basis des *pGEX-KG* (GUAN und DIXON, 1991) und des *pMAL-c2* (New England Biolabs, Frankfurt am Main) verwendet.

¹² Boyce Thompson Institute for Plant Research and Department of Plant Pathology, Cornell University, Ithaca, New York 14853, USA

2.1.7. Pflanzenmaterial

Das Pflanzenmaterial wurde aus Saatgut von *Zea mays* L. kultiviert und stammte aus den in Tab. 2-3 aufgelisteten Maislinien oder -pflanzen. Pflanzen wurden, soweit nicht anders angegeben, im Gewächshaus unter kontrollierten Bedingungen angezogen. Die Kultivierung erfolgte bei 16 Stunden Helligkeit (24°C) und 8 Stunden Dunkelheit (16°C), einer Lichtstärke von 24.000-25.000 Lux und einer Luftfeuchtigkeit von 55-95%. Die Anzuchtbedingungen und Ernte bestimmter Gewebe sind in 2.2.2 wiedergegeben.

AC-Nummer / GH-Nummern / Linie	Herkunft / Genotyp / Kreuzung
A188	GREEN und PHILIPS (1975)
AC 3484 Colored / Uncolored	AC 2520⊗ Chile SWS (97 CH-724-0008-0001): <i>C₂C₂/whp/in</i>
AC 3491 Colored / Uncolored	AC 2570⊗ Chile SWS (97 CH-724-0008-0004): <i>C₂C₂/whp/in</i>
AC 3492 Colored / Uncolored	AC 2570⊗ Chile SWS (97 CH-724-0008-0005): <i>C₂C₂/whp/in</i>
AC 3505 Colored / Uncolored	AC 2570⊗ Chile SWS (97 CH-724-0008-0006): <i>C₂C₂/whp/in</i>
AC 3507, 3553, 3710 Colored / Uncolored	Selbstung der AC 3484, 3491, 3492, 3505 → F1 Colored: heterozygot <i>C₂C₂/whp/in</i> bzw. <i>C₂C₂/whp/in</i> → F1 Uncolored: homozygot <i>c₂/whp/in</i>
AC 3719	A188 x GH2985: GH 3097-3101
AC 3720	GH2991a x GH2991b: GH 3102-3110
AC 3721	A188 x GH2991a: GH 3116-3118
AC 3725	2991a x 2991b: GH 3111-3115
AC 3729	A188 x GH2989: GH 3142-3143
AC 3730	A188 x GH2995b: GH 3119-3121
AC 3733	A188 x GH2990a: GH 3122-3124
AC 3734	A188 x GH2986: GH 3144-3149
AC 3738	GH 2991a x A188: GH 3125-3129
AC 3740	GH2995b x A188: GH 3130
AC 3741	GH2990a x A188: GH 3131-3135
AC 3759	A188 x GH2994: GH 3164
AC 3760	GH2996 x A188: GH 3165-3171
AC 3767	GH2989 x A188: GH 3150-3159
AC 3768	GH2994 x A188: GH 3160-3161
AC 3770	A188 x GH 2996: GH 3161-3163
AC 3777	GH3010 x A188: GH 3172-3176
AC 3788	A188 x GH3010: GH 3177-3179
GH 2984 - 2997, 3010, 3011, 3028, 3052-3054	A188 x H99 Hybrid: stabil transformiert PTGS-Konstrukt pUbi:5'- <i>ZmPti1</i> -3':C2Intron:3'- <i>ZmPti1</i> -5':nos und p35S:pat
H99	D'HALLUIN <i>et al.</i> (1992)
LineC	Color converted W22-Linie (WIENAND <i>et al.</i> 1986)

Tab. 2-3: Aufstellung der für die Gewinnung von Pflanzenmaterial verwendeten Maispflanzen

[AC Nummer] Accession Nummer, [GH Nummer] Gewächshausnummer, *Linien* sind kursiv dargestellt.

2.2. Methoden

2.2.1. Molekularbiologische Standardmethoden

Alle in dieser Arbeit nicht näher erläuterten molekularbiologischen Standardmethoden der DNA-, RNA- und Proteinanalyse wurden nach SAMBROOK *et al.* (1989) durchgeführt. Bei der Verwendung von *Kits* wurde in der Regel nach Herstellerangaben vorgegangen, abweichende Vorgehensweisen sind dokumentiert.

2.2.2. Ernte von Maisgeweben

2.2.2.1. *in vitro* Keimung von Maispollen

Zur Pollenernte wurde alter Pollen am Vorabend durch Abstreifen der männlichen Blüte entfernt und frischer, reifer Pollen am Folgetag zwischen 11 und 12 h durch Ausschütteln der Blüte gesammelt und unmittelbar weiterverarbeitet. Die *in vitro* Keimung von reifem Pollen in Flüssigmedium und auf Halbfestmedium erfolgte mit dem berichtigten Pollenkeimmedium 1xPGM (10% (w/v) Sucrose, 0,5‰ H₃BO₃, 10 mM CaCl₂, 0,05 mM KH₂PO₄, 6% (w/v) PEG 4000; SCHREIBER und DRESSELHAUS, 2003). Anfangs wurde bei der *in vitro* Keimung in Flüssigmedium eine um den Faktor 10 zu hohe Borsäurekonzentration verwendet, die zum relativ schnellen Platzen sich entwickelnder Pollenschläuche führte.

in vitro Keimung in Flüssigmedium

Zur *in vitro* Keimung von reifen Pollen in Flüssigkultur wurde 30-50 mg Pollen in 35 mm Petrischalen mit 1-2 ml 1xPGM versetzt und die Keimung mikroskopisch verfolgt. Pollen mit Keimraten über 70% wurden in ein Reaktionsgefäß überführt, sedimentiert und nach Abnehmen des Überstandes in Flüssigstickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -70°C. *In vitro* gekeimter Pollen wurde für RNA-Präparationen (2.2.4.1) und zur Gewinnung von Gesamtproteinextrakten (2.2.5.6) eingesetzt.

in vitro Keimung in Flüssigmedium mit zugesetzten Seideproteinen

Zur *in vitro* Keimung von reifen Pollen in Anwesenheit von Gesamtproteinen aus Seide wurden je 35 mm Petrischale 30 mg Pollen in 2 ml 1xPGM inkubiert, dem 20 µg/ml Seideproteine zugesetzt waren. Nach Entfernen des Keimmediums inklusive eines Großteils der Seideproteine erfolgte die weitere Aufarbeitung wie oben beschrieben.

in vitro Keimung auf Halbfestmedium

Für die *in vitro* Keimung von reifen Pollen auf Halbfestmedium wurde autoklavierter, auf etwa 70°C abgekühlter, 0,6%iger (w/v) Agar 1:1 mit doppelt konzentriertem sterilfiltriertem Pollenkeimmedium (2xPGM) versetzt. Das Medium wurde in 35 mm Petrischalen circa 2 mm hoch gegossen. Nach Erstarren und Abtrocknen der Mediumoberfläche konnte bis zu 40 mg frisch geernteter Pollen feinverteilt aufgebracht werden. Die Keimung der Pollenkörner wurde mikroskopisch beobachtet und dokumentiert. Auf Halbfestmedium keimender Pollen wurde für die transiente Transformation (2.2.12.2.1) eingesetzt.

2.2.2.2. Rollenkultur zur Keimung von Maiskörnern

Zur Gewinnung von Pflanzenmaterial 7-14 Tage alter Maispflanzen (Sproß, junge Blätter, junge Wurzeln, ausgekeimte Körner) wurden Rollenkulturen angelegt. Hierzu wurde Handtuchpapier zu einer lockeren Rolle gewickelt, in ein hohes Weckglas gestellt und mit destilliertem Wasser komplett durchfeuchtet und anschließend autoklaviert. Oberflächensterilisierte Maiskörner wurden zur Keimung in die einzelnen Windungen gelegt und im verschlossenen Weckglas in der Phytokammer bis zur Keimung inkubiert. Nach dem Auskeimen der Maiskörner konnte ein zweites, zuvor sterilisiertes Weckglas, als Deckel aufgesetzt werden. Die Keimlinge wurden bis zu einer Größe von etwa 15 cm angezogen und geerntet.

2.2.3. Analyse von DNA

2.2.3.1. Präparation von genomischer DNA

Zur Präparation genomischer DNA aus Maisgeweben nach DELLAPORTA *et al.* (1983) wurde circa 3 g in Flüssigstickstoff schockgefrorenes oder bei -70°C gelagertes Gewebe tiefkalt gemörsert. Nach Zugabe von 10 ml Extraktionspuffer (100 mM Tris, pH 8.0, 50 mM EDTA, 500 mM NaCl) wurde das Gewebe bei 65°C im Wasserbad bis zum vollständigen Auftauen inkubiert und in Nalgene-SS34-Zentrifugenröhrchen überführt. Im Mörser verbliebene Gewebsreste wurden mit 5 ml Extraktionspuffer herausgespült. Anschließend wurde 1 ml 20% (w/v) SDS zugegeben, kräftig geschüttelt und bis zur Fertigstellung aller Proben auf Eis inkubiert. Nach 10 minütigem Schütteln im Wasserbad bei 65°C wurden 5 ml 5 M Kaliumacetat zugegeben, kurz durchmischt und 20 min auf Eis inkubiert. Abschließend wurden die Proben für 20 min bei 4°C und $20.000\times g$ geklärt und der Überstand durch *Miracloth* (Calbiochem, Darmstadt) gefiltert. Zur Fällung der Nukleinsäuren wurden 10 ml Isopropanol zugegeben, 30 min auf Eis inkubiert und anschließend 20 min bei 4°C und $5.400\times g$ zentrifugiert. Das resultierende Pellet wurde vorsichtig mit 500 μl TE-Puffer 50:10 in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt und unter leichtem Schütteln über Nacht gelöst. Am Folgetag wurden die RNAs bei 37°C in einem 30-minütigen RNase-Verdau (Endkonzentration 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) zersetzt und die DNA-Lösung einmal mit Phenol:Chloroform (1:1) extrahiert. Nach 5-minütiger Zentrifugation bei $>10.000\times g$ wurde mit 500 μl Chloroform extrahiert und erneut zentrifugiert. Anschließend erfolgte die DNA-Fällung durch Zugabe von 50 μl 3 M Natrium-Acetat pH 5.1 und 500 μl Isopropanol. Nach 30-minütiger Inkubation auf Eis wurde für 10 min bei 4°C , $>15.000\times g$ zentrifugiert. Abschließend wurde das resultierende Pellet mit 800 μl 70%igem Ethanol gewaschen, erneut zentrifugiert und über Nacht in 250 μl TE-Puffer 10:1 resuspendiert. Nach photometrischer Konzentrationsbestimmung und Kontrolle der DNA-Qualität im Agarosegel wurden genomische DNAs für *Southern* Analysen (2.2.3.5) eingesetzt.

2.2.3.2. Amplifikation von DNA-Fragmenten (PCR)

Die Amplifikation von DNA-Fragmenten erfolgte mit dem *Advantage*[®] 2 PCR Enzyme System (BD Biosciences, Heidelberg) oder der *Taq-Polymerase* der Firma MBI Fermentas (St. Leon-Roth) in einem Thermocycler *Biometra Uno II* (Whatman-Biometra, Göttingen). In der Regel wurden *touch down* Polymerase-Kettenreaktionen (PCR) durchgeführt. Hierbei wurde in den ersten 12-18 Zyklen die *Annealing*-Temperatur sukzessive von 60°C - 68°C auf 56°C - 62°C gesenkt um maximale Spezifität bei der Amplifikation zu erhalten. In 16-10 zusätzlichen Zyklen wurde die *Annealing*-Temperatur bei 56°C - 62°C gehalten.

2.2.3.3. Markierung von DNA-Fragmenten

Die in dieser Arbeit eingesetzten radioaktiv oder Digoxigenin-markierten Sonden wurden von der isolierten *ZmPti1*-cDNA (3.2.1.) durch *PCR*-Amplifikation mit *ZmPti1*-spezifischen Primern¹³ und/oder Restriktionen erhalten. Eine Übersicht dieser Sonden-Fragmente, ihrer Lage und Homologie in Bezug auf die *ZmPti1*-cDNA ist Abb. 2-1 zu entnehmen.

2.2.3.3.1. Markierung von DNA-Fragmenten mit Digoxigenin

Die Markierung von DNA-Fragmenten mit Digoxigenin erfolgte nach dem *DIG Application Manual for Filter Hybridizations* (Roche Diagnostics, Mannheim) als *PCR Labeling* mit spezifischen Primern oder als direkte Markierung von DNA-Fragmenten durch *random primed labeling*.

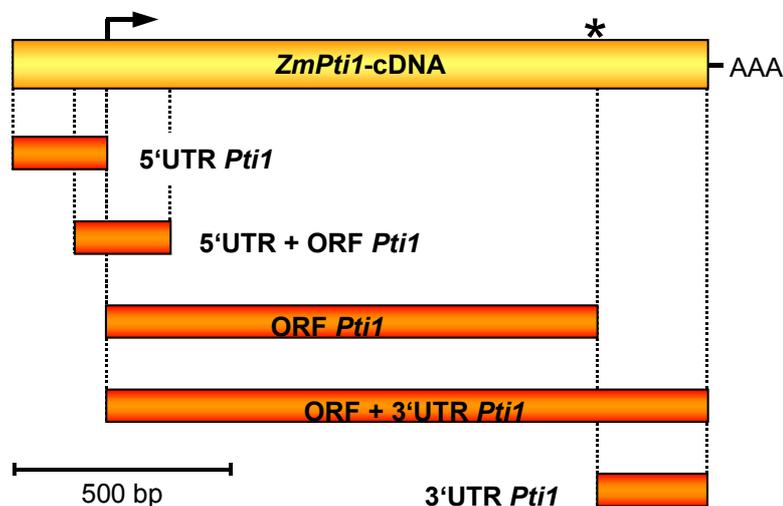


Abb. 2-1: Schema der *ZmPti1*-cDNA und der davon abgeleiteten Hybridisierungssonden

Homologe Anordnung der 1,6 kb langen *ZmPti1*-cDNA und der aus ihr abgeleiteten Sondenfragmente. Für die durchgeführten Hybridisierungen wurden folgende Sonden synthetisiert und eingesetzt:

[5' UTR *Pti1*] PCR-Amplifikation vom *ZmPti1*-cDNA-Klon cSHD56_3 mit den Primern *LD 5' Insert* und *PRMMH62*; [5'UTR+ORF *Pti1*] Insertionsfragment des Subtraktionsklons D56; [ORF *Pti1*] PCR-Amplifikation vom *ZmPti1*-cDNA-Klon cSHD56_3 mit den Primern *PRMMH55* und *PRMMH56*; [ORF +3'UTR *Pti1*] PCR-Amplifikation vom *ZmPti1*-cDNA-Klon cSHD56_3 mit den Primern *PRMMH55* und *PRMMH52*; [3'UTR *Pti1*] PCR-Amplifikation vom *ZmPti1*-cDNA-Klon cSHD56_3 mit den Primern *PRMMH53* und *PRMMH52*. Translationsstart (→) und -stop (*) des *ZmPti1*.

¹³ eine Aufstellung aller verwendeten Primer ist dem Anhang zu entnehmen

2.2.3.3.2. Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten

Die radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten erfolgte mit α -[^{32}P]-dCTP. Hierzu wurden mit *Prime It[®] II* (Stratagene, Heidelberg) 25-50 ng DNA mit 50 μCi α -[^{32}P]-dCTP (3.000 Ci/mmol) in einem 50 μl -Reaktionsansatz 3 h bei 37°C nach Herstellerangaben markiert. Nicht eingebaute Nukleotide wurden im Anschluss mit *MicroSpin[™] Columns S-300 HR* (Amersham Biosciences, Freiburg) abgetrennt. Radioaktiv markierte, denaturierte DNA-Fragmente fanden bei *Northern* Analysen (2.2.4.3), genomischen *Southern* Analysen (2.2.3.5) und beim *Screening* der genomischen Bibliothek (2.2.9.1) Verwendung.

2.2.3.4. *Southern Blot* Transfer und Hybridisierung mit spezifischen digoxigeninmarkierten DNA-Sonden

Die Übertragung elektrophoretisch aufgetrennter DNA-Fragmente erfolgte über Nacht per Kapillarblot auf positiv geladene Nylonmembranen mit 0,4 M NaOH (SOUTHERN, 1975; SAMBROOK *et al.*, 1989). Nach dem Spülen der Membranen mit 2xSSC wurden sie zur Fixierung der DNA-Fragmente beidseitig mit 1.200 $\mu\text{J}/\text{cm}^2$ UV-Licht bestrahlt.

Zum Nachweis spezifischer DNA-Fragmente wurden die Membranen zunächst 3 h prähybridisiert (5xSSC, 2% (w/v) *Roche Blocking Reagent*, 0,1% (v/v) Na-Lauroylsarkosin, 0,2% (w/v) SDS, Hefe-RNA) und dann über Nacht bei 65°-68°C gegen frisch denaturierte digoxigeninmarkierte Sondenfragmente (2.2.3.3.1) in einer Konzentration von 20-25 ng/ je ml Prähybridisierungslösung hybridisiert. Bei der Verwendung von formamidhaltigen (50% (v/v)) Prähybridisierungs- und Hybridisierungslösungen wurde bei 42°C hybridisiert.

Die hybridisierten Membranen wurden zweimal 5 min bei RT mit 2xSSC, 0,1% (w/v) SDS und zweimal 20 min bei 65°C mit 0,2xSSC, 0,1% (w/v) SDS unter Schütteln gewaschen. Nach Äquilibration in DIG1 (150 mM NaCl, 100 mM Maleinsäure, pH 7.5) erfolgte eine Inkubation für 30 min in DIG2 (150 mM NaCl, 100 mM Maleinsäure, pH 7.5, 1% (w/v) *Roche Blocking Reagent*). Nach Zugabe von Anti-Digoxigenin-Fab-Fragmenten (Roche Diagnostics, Mannheim) in einer Konzentration von 1:5.000 bis 1:10.000 wurden für weitere 30 min unter Schütteln inkubiert. Im Anschluss wurden die Membranen zweimal für 15 min gewaschen (150 mM NaCl, 100 mM Maleinsäure pH 7.5, 0,3% (w/v) Tween[®] 20) und 5 min in DIG3 (100 mM NaCl, 100 mM Tris-HCl, pH 9.5) äquilibriert. Die Detektion der spezifisch gebundenen Anti-Digoxigenin-Fab-Fragmente erfolgte per Chemilumineszenz nach Aufbringen der Detektionslösung (CSPD 1:100 in DIG3). Vor der Exposition mit *Hyperfilm MP* (Amersham Biosciences, Freiburg) wurden die eingeschweißten Membranen 15 min bei 37°C präinkubiert.

2.2.3.5. Genomische *Southern Blot* Analyse und Hybridisierung mit spezifischen DNA-Sonden

Zur *Southern* Analyse genomischer Pflanzen-DNA (2.2.3.1) wurden 15 µg DNA bei 37°C für 4-6 h mit 30 Einheiten der entsprechenden Restriktionsendonukleasen in Gesamtreaktionsansätzen von 40-50 µl verdaut. Die elektrophoretische Auftrennung der Restriktionsansätze erfolgte über Nacht in 0,8%igen Agarose-Gelen bei 20-24 V.

Zur Spaltung der hochmolekularen DNAs wurde das getrimmte Agarosegel 5 min in 250 mM HCl unter leichtem Schütteln inkubiert. Anschließend wurde zweimal 15 min in Denaturierungspuffer (0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl) und zweimal 15-minütiger in Neutralisierungspuffer (1,5 M NaCl, 0,5 M Tris-HCl, pH 7.2, 1 mM EDTA) geschüttelt. Der Transfer der DNAs erfolgte über Nacht per Kapillarblot (SOUTHERN, 1975) mit 20xSSC auf eine *Hybond NX* Nylonmembran (Amersham Biosciences, Freiburg). Die Membran wurde kurz in 2xSSC gespült und zur Fixierung der DNAs beidseitig mit 1.200 µJ/cm² UV-Licht bestrahlt. Im Anschluss wurde die Membran für 3 h bei 42°C mit einer formamidhaltigen Prähybridisierungslösung (50% (v/v) Formamid, 5xSSC, 2% (w/v) *Roche Blocking Reagent*, 0,1% (v/v) Na-Lauroylsarkosin, 0,2% (w/v) SDS, Hefe-RNA) blockiert. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht nach Zugabe von 20-25 ng/ml frisch denaturiertem digoxigeninmarkierten Sondenfragmenten (2.2.3.3.1). Gebrauchte formamidhaltige Hybridisierungslösungen wurden vor der Wiederverwendung 10 min bei 70°C im Wasserbad denaturiert.

Vor der Detektion spezifischer DNA-Fragmente wurde die Membran zweimal 10 min bei RT mit 2xSSC, 0,1% (w/v) SDS, einmal 10 min bei 65°C mit 0,5xSSC, 0,1% (w/v) SDS und ebenfalls einmal 10 min bei 65°C mit 0,1xSSC, 0,1% (w/v) SDS schüttelnd gewaschen.

Zur Detektion von digoxigeninmarkierten, spezifisch gebundenen Sonden wurde die Membran unter leichtem Schütteln bei RT für 5 min in DIG1 (150 mM NaCl, 100 mM Maleinsäure, pH 7.5), 30 min in DIG2 (150 mM NaCl, 100 mM Maleinsäure, pH 7.5, 1% (w/v) *Roche Blocking Reagent*) und 30 min in DIG2 mit zugesetztem Anti-Digoxigenin-Fab-Fragment (Verdünnung 1:10.000; Roche Diagnostics, Mannheim) inkubiert.

Zum Entfernen unspezifisch anhaftender Anti-Digoxigenin-Fab-Fragmente wurde dreimal 15 min in DIG1 mit 0,3% (v/v) Tween[®] 20 bei RT gewaschen. Nach Äquilibrierung der Membran für 5 min in DIG3 (100 mM NaCl, 100 mM Tris-HCl, pH 9.5) wurden je nach Größe der Membran 1,2 bis 1,8 ml Detektionslösung (CSPD 1:100 in DIG3) aufgebracht und eingeschweißt. Die Membran wurde 15 min bei 37°C präinkubiert und auf *Hyperfilm MP* (Amersham Biosciences) exponiert.

2.2.4. Analyse von RNA

2.2.4.1. RNA-Extraktion

Die Isolierung von Gesamt-RNA erfolgte aus tiefkalt gemörserten oder mit der Schwingmühle tiefkalt aufgeschlossenen Maisgeweben. Soweit nicht anders angegeben fanden alle Extraktionsschritte auf Eis und im 15 ml-Falcon statt. 1xExtraktionspuffer (200 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 5 mM EDTA, 1% (w/v) SDS) wurde ohne SDS als zweifach konzentrierte Stocklösung angesetzt, autoklaviert und bei Bedarf mit sterilfiltriertem 20% (w/v) SDS frisch angesetzt.

2 ml aufgeschlossenes Gewebepulver wurde tiefkalt mit 4 ml 1xExtraktionspuffer und 4 ml Phenol (pH 4.0, Wasser-gesättigt) versetzt und homogenisiert. Danach wurden 1,5 ml Chloroform zugegeben, gründlich durchmischt, bis zur Fertigstellung aller Proben auf Eis inkubiert und anschließend 30 min im über-Kopf-Schüttler bei 4°C inkubiert. Nach 5-minütiger Zentrifugation (4°C, 5.400xg) wurde der Überstand mit je 2 ml Phenol und Chloroform versetzt, gemischt, für 30 min im über-Kopf-Schüttler bei 4°C inkubiert und zur Phasentrennung zentrifugiert. Im Bedarfsfall wurde der Phenol:Chloroform-Schritt solange wiederholt bis die Trübung des Überstandes merklich nachließ bzw. die Interphase deutlich geringer ausfiel. Im Anschluss an eine Zentrifugation (5 min, 4°C, 5.400xg) wurde der Überstand mit 3 ml Chloroform extrahiert, im über-Kopf-Schüttler inkubiert, zentrifugiert und der klare Überstand in ein 30 ml Corex-Zentrifugenröhrchen überführt. Die Fällung der Nukleinsäuren erfolgte nach Zugabe von 0,1 Volumen 3 M Natriumacetat und 2,5 Volumen Ethanol für 30 min auf Eis. Im Anschluss an die Pelletierung für 25 min bei 4°C, 12.000xg wurde das Pellet in 800 µl Wasser aufgenommen und die RNA-Lösung in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Durch Zugabe von 800 µl 8 M LiCl wurden die RNAs über Nacht bei 4°C gefällt. Am Folgetag wurde das Pellet nach 30-minütiger Zentrifugation bei 4°C, >15.000xg durch Überschichten mit 500 µl 70%igem Ethanol gewaschen, erneut für 10 min abzentrifugiert und die RNAs nach Verwerfen des Überstandes 20 min über Kopf getrocknet. Die RNAs wurden in 50-200 µl Wasser aufgenommen. Nach der photometrischen Konzentrationsbestimmung wurden die RNAs bei -70°C gelagert und standen für *Northern* Analysen (2.2.4.2, 2.2.4.3) oder cDNA-Synthesen (2.2.6) zur Verfügung.

2.2.4.2. RNA-Agarosegel-Elektrophorese

Zur Vorbereitung der RNAs wurden gleiche Mengen in einem Gesamtvolumen von 50 µl aufgenommen und nach Zusatz von 5 µl 1 M NaCl und 100 µl Ethanol über Nacht bei -20°C gefällt. Nach 30-minütiger Zentrifugation bei 4°C , 13.000 xg wurde das Pellet mit 70%igem Ethanol überschichtet und erneut 10 min zentrifugiert. Die Pellets wurden 20 min bei RT getrocknet, in 25 µl RNA-Probenpuffer (40% (v/v) deionisiertes Formamid, 14% (v/v) Formaldehyd, 1xMOPS, pH 7.2, 10% (v/v) Glycerol, 0,8‰ Bromphenolblau) resuspendiert und nach 3-minütiger Inkubation bei 60°C neben einen RNA-Standard über Tag in einem Formaldehyd-Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt.

Formaldehyd-Agarosegele unterschiedlicher Konzentration wurden (1x MOPS [40 mM 4-Morpholinopropansulfonsäure, 10 mM Natrium-Acetat, 1 mM EDTA, pH 7.2], 6% (v/v) Formaldehyd, 100 ng/ml Ethidiumbromid) nach SAMBROOK *et al.* (1989) hergestellt.

2.2.4.3. Northern Blot Transfer und Hybridisierung mit spezifischen DNA-Sonden

Die Identifizierung spezifischer RNA-Transkripte erfolgte nach elektrophoretischer Auftrennung (2.2.4.2) und Kapillartransfer über Nacht mit 10xSSC auf eine *Hybond N+* Nylonmembran (Amersham Biosciences, Freiburg). Durch beidseitige Bestrahlung der Membran mit $1.200 \mu\text{J}/\text{cm}^2$ UV-Licht wurden die RNAs auf der Membran fixiert. Nach Abtrennung der RNA-Standards wurde dieser durch Färbung mit 0,05% (w/v) Methyleneblau, 0,3 M Natrium-Acetat, pH 5.0 und Differenzierung mit destilliertem Wasser visualisiert.

Die Prähybridisierung erfolgte für 3 h in Dextransulfatpuffer (10% (w/v) Dextransulfat, 1 M NaCl, 1% (w/v) SDS, 70 µg/ml denaturierte Fischsperma-DNA) bei 65°C bis 68°C . Nach Zugabe der radioaktiv markierten, spezifischen Sonde (2.2.3.3.2) wurde über Nacht bei hybridisiert.

Alle Waschschritte erfolgten bei der Hybridisierungstemperatur. Nach Entfernen der Hybridisierungslösung mit 1xSSC wurde die Membran 10 min mit vorgewärmtem 1xSSC gewaschen. Im Anschluss wurde zweimal für je 7 min mit vorgewärmtem 1xSSC, 1% (w/v) SDS im Wasserbad geschüttelt. Nach dem Spülen mit 1xSSC wurde die Membran eingeschweißt und bei -70°C mit *Hyperfilm MP* (Amersham Biosciences, Freiburg) exponiert.

Zur erneuten Beprobung von Membranen wurden gebundene Sondenfragmente durch zweimaliges Waschen mit kochender 0,1%iger (w/v) SDS-Lösung für je 20 min entfernt. Die feuchte Membran wurde eingeschweißt und bis zum Abklingen der Reststrahlung bei -20° gelagert.

2.2.4.4. PCR Ansatz zum Nachweis spezifischer mRNAs

Der PCR-basierte Nachweis von *ZmPti1*-Transkripten mit dem Primerpaar *PRMMH59/52* in cDNAs aus Eizellen, Zentralzellen, Synergiden, Spermazellen, Nucellus- und anderen Geweben der Linie *A188* wurde von Dr. Stefan Scholten¹⁴ durchgeführt.

Zellen und Gewebe wurden wie von KRANZ *et al.* (1991) beschrieben isoliert. Zur Isolierung von Nucellusgewebe wurde die Basalregion der Samenanlage ohne Embryosack aufgetrennt. Nach Trennung des äußeren und inneren Integuments konnte Nucellusgewebe mit Teilen des inneren Integuments entlassen werden. Gewebe und Einzelzellen wurden mit 650 mosm Mannitol gewaschen und anschließend in Flüssigstickstoff schockgefroren

Zur cDNA-Synthese wurde mRNA aus jeweils 25 Synergiden, Eizellen und Zentralzellen, vier *Clustern* von etwa 15 Antipoden, 400 Spermazellen und fünf zuvor in Flüssigstickstoff aufgeschlossenen Nucellusgewebstücken mit den *oligo dT₍₂₅₎ Magnetic Beads* (Dynal, Hamburg) isoliert. Zur Lyse wurden die Zell- oder Gewebssuspensionen mit 2-fach konzentriertem Lysis/Binde-Puffer versetzt (200 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1 M LiCl, 20 mM EDTA, pH 8.0, 10 mM DTT, 2% LiDS), so dass mit destilliertem Wasser die Suspension auf eine einfach konzentrierte Lysis/Bindepuffer-Lösung verdünnt werden konnte. Die Endvolumen lagen zwischen 20 und 40 µl. Zur Isolierung von polyA⁺-RNAs wurden 15 µl *oligo dT₍₂₅₎ Magnetic Beads* mit 1xLysis/Binde-Puffer gewaschen und zum Zell- oder Gewebslysat gegeben. Nach Durchmischung für 15 min und zweimaligem Waschen mit je 50 µl Waschpuffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM LiCl, 1 mM EDTA) wurde zweimal mit 50 µl Erststrangsynthese-Puffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.3, 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂) äquilibriert und die Magnetpartikel mit gebundener mRNA in 3 µl Wasser resuspendiert. Die cDNA-Erststrangsynthese erfolgte mit dem *SMART™-System* von BD Biosciences (Heidelberg) nach Herstellerangaben. Für jeden Zell- bzw. Gewebstyp wurde die optimale Zyklenzahl der *long-distance PCR (LDPCR)* für die Synthese von cDNAs eines Größenbereiches von 0.5 bis 3 kb empirisch ermittelt. Die individuellen Bedingungen der *LDPCR* führten zu cDNA-Konzentrationen von etwa 20 ng/µl.

Zur PCR-basierten Genexpressionsanalyse wurden als *template* jeweils 20 ng der zell- bzw. gewebsspezifischen cDNA-Populationen bzw. 500 ng genomische DNA eingesetzt. Die Amplifikation mit den *ZmPti1*-3'UTR-spezifischen Primern *PRMMH59* und *PRMMH52* erfolgte mit 35 Zyklen (94°C, 1 min; 65°C, 30 sec, 72°C, 45 sec). Zur Analyse wurde die Hälfte jedes PCR-Ansatzes elektrophoretisch aufgetrennt (3.3.1.2.).

¹⁴ Biozentrum Klein Flottbek und Botanischer Garten, Universität Hamburg

2.2.5. Analyse von Proteinen

2.2.5.1. Überexpression rekombinanter Proteine

Die Überexpression rekombinanter Proteine erfolgte mit den Expressionsvektoren *pET-30a* (Novagen/Merck Biosciences, 2002^a), *pGEX-KG* (GUAN und DIXON, 1991) und *pMAL-c2* (New England Biolabs, Frankfurt am Main) nach Transformation (2.2.11) in den *E. coli* Stamm *Rosetta(DE3)* (Novagen/Merck Biosciences, Schwalbach).

Die Vektoren zur Expression der Tomate Serin/Threonin-Kinasen LePTO als Maltose-Binde-Protein-Fusion (→ MBP-LePTO in *pMAL-c2*, LOH und MARTIN, 1995) und LePTI1(K96N) als Glutathion-S-Transferase-Fusion (→ GST-LePTI1(K96N) in *pGEX-KG*, ZHOU *et al.*, 1995) wurden freundlicherweise von Gregory B. Martin¹⁵ zur Verfügung gestellt.

Zur Expression des Mais-PTI1 (*ZmPTI1*) als His-Tag-Fusionsprotein (→ *ZmPTI1-6His*) wurde der offene Leserahmen (ORF) des isolierten *ZmPti1*-cDNA-Klons *cSHD56_3* (3.2.1.) mit dem Primerpaar *PRMMH56/64* amplifiziert (2.2.3.2). Das korrespondierende Amplifikat wurde mittels der primerinternen *NdeI*- und *NotI*-Restriktionsschnittstellen in einen entsprechend linearisierten *pET-30a*-Vektor integriert (→ *pET-30:Pti1*).

Zur Expression eines Mais-PTI1 mit einem Aminosäuretausch von Lysin¹⁰⁰ nach Asparagin¹⁰⁰ (→ *ZmPTI1(K100N)-6His*) wurde mit dem Primerpaar *PRMMH55/84* ein modifizierter 5' Bereich des *ZmPti1*-ORFs amplifiziert. Der Austausch des unmutierten 5' ORF mit dem Lysin¹⁰⁰ im *pET-30:Pti1* gegen das mutierte Teilstück mit dem Asparagin¹⁰⁰ erfolgte über die Restriktionsschnittstellen *NdeI* und *HindIII* (→ *pET-30:Pti1(K100N)*).

Die ordnungsgemäße Subklonierung wurde durch Sequenzierung (2.2.13) überprüft.

Die Proteinexpression mit transformierten *Rosetta(DE3)*-Zellen erfolgte in LB-Medium mit Antibiotika in folgenden Endkonzentrationen: 30 µg/ml Kanamycin, 34 µg/ml Chloramphenicol bei *pET-30*-Vektoren; 100 µg/ml Ampicillin, 34 µg/ml Chloramphenicol bei *pMAL-c2*- und *pGEX-KG*-Vektoren.

Eine Vorkultur aus 3 ml Medium wurde nach Impfung mit einer Einzelkolonie über Nacht bei 37°C und ~160 rpm angezogen. 50 ml LB-Medium, inklusive der entsprechenden Antibiotika, wurde mit Zellen aus 1 ml der Vorkultur angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0.6 bei 28°C und 180 rpm im 500 ml Erlenmeyer-Kolben angezogen. Die Induktion der Expression des rekombinanten Proteins erfolgte durch die Zugabe von IPTG bis zu einer Endkonzentration von 1 mM bei *pET-30*-Vektoren und 0.2 mM bei *pMAL-c2*- und *pGEX-KG*-Vektoren. Die Zel-

¹⁵ Boyce Thompson Institute for Plant Research and Department of Plant Pathology, Cornell University, Ithaca, New York 14853, USA

len wurden in der Regel nach 3 h durch Abzentrifugieren geerntet, mit $\frac{1}{4}$ Kultur-Volumen 20 mM Tris-HCl pH 8.0 gewaschen und erneut zentrifugiert. Die Zellen wurden vor der Weiterverarbeitung bei -70°C eingefroren und bis zu einem Monat gelagert.

Die Aufreinigung der rekombinanten Proteine erfolgte denaturierend oder nativ entsprechend ihres Affinitätstags mit Ni-NTA-Matrizen (His-Tag-Fusionsproteine), *Amylose-Resin* (MBP-Fusionsproteine) oder GST-Binde-Matrix (GST-Fusionsproteine).

2.2.5.2. Denaturierende Affinitätsaufreinigung rekombinanter His-Fusionsproteine

Die denaturierende Proteinaufreinigung der rekombinanten His-Tag-Fusionsproteine ZmPTI1-6His und ZmPTI1(K100N)-6His aus den *Rosetta(DE3)*-Zellen erfolgte mit QIAGEN *Ni-NTA Agarose*. Zellen aus 2-3 ml Kultur (2.2.5.1) wurden entsprechend dem Herstellerprotokoll 19 des *The QIAexpressionist* (2002) im *Batch*-Verfahren mit den für eine 1 ml Kultur angegebenen Volumina aufgearbeitet.

Für größere Kulturvolumina von 50 ml erfolgte die *Batch*-Aufarbeitung nach einem angepassten Protokoll. Die Lyse des $\sim 0,5$ g Zellpellets erfolgte nach Auftauen auf Eis durch kräftiges *Vortexen* bis zur Transluzion der Kultur in 2,5 ml Puffer B (100 mM NaH_2PO_4 , 10 mM Tris-HCl, 8 M Harnstoff, 10 mM β -Mercaptoethanol, pH 8.0). Nach Abtrennung unlöslicher Bestandteile durch 20-minütige Zentrifugation bei 4°C und $16.000\times g$ wurde der Überstand in ein 15 ml-Falcon überführt, mit 150 μl QIAGEN *Ni-NTA Agarose* (Hilden) versetzt und 1,5 h bei RT gerollt. Die Matrix wurde durch 1-minütiges Zentrifugieren bei 4°C und $3.500\times g$ abgetrennt und viermal mit je 2 ml Puffer C (100 mM NaH_2PO_4 , 10 mM Tris-HCl, 8 M Harnstoff, pH 6.3) durch einfaches Durchmischen gewaschen. An die Affinitätsmatrix gebundene rekombinante His-Fusionsproteine wurden 3-4 mal mit je 100 μl Puffer C + 100 mM EDTA eluiert. Je 1 μl der Eluate wurde testweise in der SDS-PAGE aufgetrennt.

2.2.5.3. Native Affinitätsaufreinigung rekombinanter His-Fusionsproteine

Für den Einsatz im Kinase-Assays (2.2.5.11) wurden die His-Tag-Fusionsproteine ZmPTI1-6His und ZmPTI1(K100N)-6His nativ mit QIAGEN *Magnetic Ni-NTA Agarose Beads* (2.2.5.3.1) aus *Rosetta(DE3)*-Zellen aufgereinigt.

Für den Einsatz als Substrat im *in-gel* Assay (2.2.5.11.3) wurden große Mengen rekombinantes ZmPTI1(K100N)-6His mit QIAGEN *Ni-NTA Agarose* (2.2.5.3.3) nativ aus *Rosetta(DE3)*-Zellen aufgereinigt.

2.2.5.3.1. Native Affinitätsaufreinigung mit Ni-NTA Magnetic Agarose Beads

Zur nativen Proteinaufreinigung überexprimierter His-Tag-Fusionsproteine wurden *Rosetta (DE3)*-Zellen aus 3 ml Expressionskultur auf Eis aufgetaut, in 200 µl His-Lysispuffer+Tween[®] (50 mM NaH₂PO₄ pH 8.0, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol, 10 mM β-Mercaptoethanol, 1 mM PMSF, 0,05% (v/v) Tween[®] 20) aufgenommen, mit 1 mg/ml Lysozym versetzt und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde mit einem Branson *Sonifier 250* mit eingetauchter *Mikrotip* für 10 sec bei 20-30 Watt Ausgangsleistung¹⁶ auf Eis sonifiziert. Das Proteinlysate wurde durch 30-minütige Zentrifugation (4°C, >15.000xg) geklärt und nach der Zugabe von 10 µl *Ni-NTA Magnetic Beads* 1 h bei 4°C im über-Kopf-Schüttler inkubiert. Nach Abtrennung der Magnetpartikel wurde das Gesamtproteinlysate abgenommen und die Matrix dreimal mit je 200 µl His-Waschpuffer+Tween[®] (50 mM NaH₂PO₄ pH 8.0, 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol, 10 mM β-Mercaptoethanol, 1 mM PMSF, 0,05% (v/v) Tween[®] 20) gewaschen. Nach Entfernen des Waschpuffers wurden die Magnetpartikel mit den rekombinanten Proteinen für Phosphorylierungsassays (2.2.5.11.1) oder Interaktions-Kinase-Assays (2.2.5.11.2) eingesetzt.

2.2.5.3.2. Native Affinitätsaufreinigung mit Ni-NTA Agarose (Minipräp)

Zur nativen Aufreinigung der in *in-gel* Kinase Assays (2.2.5.11.3) eingesetzten rekombinanten ZmPTI1-6His und ZmPTI1(K100N)-6His wurde eine Minipräp-Proteinaufreinigung mit QIAGEN *Ni-NTA Agarose* durchgeführt. Das *Batch*-Verfahren erfolgte in Anlehnung an das Protokoll 14 aus dem Herstellerprotokoll *The QIAexpressionist* (2002).

Rosetta(DE3)-Zellen aus 3 ml Kultur (2.2.5.1) wurden auf Eis aufgetaut und in 100 µl His-Lysis-Puffer (50 mM NaH₂PO₄ pH 8.0, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol, 10 mM β-Mercaptoethanol, 1 mM PMSF) resuspendiert und nach Versetzen mit 1 mg/ml Lysozym 30 min auf Eis inkubiert. Nach Überführen des Lysisansatzes wurde für 10 sec bei 20-30 Watt Ausgangsleistung mit dem Branson *Sonifier 250* auf Eis sonifiziert. Das Proteinlysate wurde durch 30-minütige Zentrifugation (4°C, >15.000xg) geklärt und nach Zugabe von 10 µl *Ni-NTA Agarose* 1 h bei 4°C im über-Kopf-Schüttler inkubiert. Die Matrix wurde pelletiert (1 min, 4°C, 1.000xg) und nach Entfernen des Überstandes dreimal mit je 100 µl Waschpuffer (50 mM NaH₂PO₄ pH 8.0, 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol, 10 mM β-Mercaptoethanol, 1 mM PMSF) gewaschen. Abschließend wurde an der *Ni-NTA Agarose* gebundenes rekombinantes Protein dreimal mit 10 µl Elutionspuffer (50 mM NaH₂PO₄ pH 8.0, 300 mM NaCl, 250 mM Imidazol) eluiert. Nach der BRADFORD-Proteinmengenbestimmung stand das rekombinante Protein als Kontrolle im *in-gel* Assay (2.2.5.11.3) zur Verfügung.

¹⁶ Geräteeinstellung Time:Hold, Duty Cycle: Constant, Output: 6

2.2.5.3.3. Native Affinitätsaufreinigung mit Ni-NTA Agarose (Maxipräparation)

Für den Einsatz als Substrat im *in-gel* Kinase Assay (2.2.5.11.3) wurden große Mengen des rekombinanten ZmPTI1(K100N)-6His nativ mit *QIAGEN Ni-NTA Agarose* aufgereinigt. Das durchgeführte *Batch*-Verfahren erfolgte in Anlehnung an das Protokoll 9 des *QIAGEN The QIAexpressionist* (2002).

Rosetta(DE3)-Zellen einer 200 ml Kultur (2.2.5.1) wurden auf Eis aufgetaut, in 4 ml His-Lysis-Puffer (50 mM NaH₂PO₄ pH 8.0, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol, 10 mM β-Mercaptoethanol, 1 mM PMSF) resuspendiert und nach Versetzen mit 1 mg/ml Lysozym sowie 25 U/ml Benzonase[®] Nuclease¹⁷ (Novagen/Merck Biosciences) 30 min auf Eis inkubiert. Nach Überführung des Lysisansatzes in ein 15 ml-Falcon wurde auf Eis viermal für je 10 sec bei 20-30 Watt Ausgangsleistung mit dem Branson *Sonifier 250* mit *Mikrotip* sonifiziert. Zwischen den einzelnen Sonifikationsschritten wurde für mindestens 3 min auf Eis gekühlt. Zum geklärten Proteinlysate (30 min, 4°C, >15.000xg) wurden 100 µl *Ni-NTA Agarose* gegeben und 1 h bei 4°C im über-Kopf-Schüttler inkubiert. Nach Zentrifugation (1 min, 4°C, 1.000xg) wurde der Überstand abgenommen und die Matrix dreimal mit je 2 ml Waschpuffer (50 mM NaH₂PO₄ pH 8.0, 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol, 10 mM β-Mercaptoethanol, 1 mM PMSF) gewaschen. Abschließend wurde das gebundene ZmPTI1(K100N)-6His dreimal mit je 100 µl Elutionspuffer (50 mM NaH₂PO₄ pH 8.0, 300 mM NaCl, 250 mM Imidazol) von der *Ni-NTA Agarose* eluiert. Nach der BRADFORD-Proteinmengenbestimmung stand das ZmPTI1(K100N)-6His als Substrat für die co-Polymerisation im *in-gel* Assay (2.2.5.11.3) zur Verfügung.

2.2.5.4. Native Proteinaufreinigung rekombinanter MBP-Fusionsproteine

Rekombinantes LePTO wurde als MBP-Fusionsprotein (→ MBP-LePTO, LOH und MARTIN, 1995) aus *Rosetta(DE3)*-Zellen von 1,3 ml Kultur (2.2.5.1) nach NEW ENGLAND BIOLABS (2001), MAIN *et al.* (1988) und JIA *et al.* (1997) mit *Amylose Resin* (New England Biolabs, Frankfurt am Main) wie folgt aufgereinigt:

Nach Auftauen auf Eis wurden die Zellen in 200 µl Column-Buffer (20 mM Tris-HCl pH 7.4, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10 mM β-Mercaptoethanol, 1 mM PMSF) aufgenommen, 1 mg/ml Lysozym zugegeben und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde auf Eis mit einem Branson *Sonifier 250* mit eingetauchter *Mikrotip* für 10 sec bei 20-30 Watt Ausgangsleistung sonifiziert. 40 µl *Amylose Resin* wurden pelletiert (1 min, 4°C, 1.000xg), zweimal mit 200 µl Column-Buffer gewaschen und in 20 µl Column-Buffer resuspendiert. Das geklärte Proteinlysate (30 min, 4°C, >15.000xg) wurde zu der gewaschenen *Amylose Resin* gegeben

¹⁷ zum Verdau der Nukleinsäuren

und 1 h bei 4°C im über-Kopf-Schüttler inkubiert. Anschließend wurde die Matrix pelletiert (1 min, 4°C, 1.000xg) und dreimal mit je 200 µl Column-Buffer gewaschen. Nach Entfernen des Waschpuffers standen die immobilisierten rekombinanten Proteine für den Standard-Phosphorylierungsassays (2.2.5.11.1) oder Interaktions-Kinase-Assays (2.2.5.11.2) zur Verfügung.

2.2.5.5. Native Proteinaufreinigung rekombinanter GST-Fusionsproteine

Rekombinantes LePT1(K96N) wurde als GST-Fusionsprotein (→ GST-LePT11(K96N), ZHOU *et al.*, 1995) aus *Rosetta(DE3)*-Zellen von 2,0 ml Kultur (2.2.5.1) nach NOVAGEN (2002^b), CHANG *et al.* (1992) und JIA *et al.* (1997) mit *GST-Bind-Resin* (Novagen/Merck Biosciences, Schwalbach) aufgearbeitet. Im wesentlichen verlief die Aufreinigung analog zur Affinitätsaufreinigung von MBP-Fusionsproteinen (2.2.5.4) mit folgenden Modifikationen:

Als Lysis- und Waschpuffer wurde der *GST-Bind/Wash-Buffer* (4,3 mM Na₂HPO₄, pH 7.3, 1,47 mM KH₂PO₄, 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM β-Mercaptoethanol, 1 mM PMSF) verwendet. Als Affinitätsmatrix wurden 40 µl *GST-Bind-Resin* 1 min bei 4°C, 1.000xg pelletiert, einmal mit 100 µl *GST-Bind/Wash-Buffer* gewaschen und anschließend in 20 µl *GST-Bind/Wash-Buffer* aufgenommen.

2.2.5.6. Gesamtproteinextrakte aus Pflanzengewebe

Zur Extraktion von Gesamtproteinen wurden bei -70°C gelagerte Maisgewebe von entwickelnden männlichen Blüten, Seide, adulten Blättern sowie 7 Tage alten Keimlinge aus Rollenkulturen (2.2.2.2) verwendet. Alle Gewebe wurden für 2 min tiefkalt in 2 ml Reaktionsgefäßen in einer *Labor-Schwingmühle 30mm* (Retsch, Haan) mit einer Frequenz von 30/s aufgeschlossen und nach Versetzen mit etwa 1 Volumen Gesamtprotein-Extraktionspuffer (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 100 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% (v/v) Triton[®]X100, 10 mM Mercaptoethanol, 2 mM PMSF) auf Eis aufgetaut und homogenisiert. Nach einstündiger Inkubation bei 4°C im über-Kopf-Schüttler wurden die Proteinextrakte geklärt (10 min, 4°C, 10.000xg) und die Überstände in vorgekühlte Reaktionsgefäße überführt. Die Proteinkonzentrationen wurden nach BRADFORD (1976) mit dem *Bio-Rad Protein Assay* (Bio-Rad Laboratories, München) bestimmt. Als Referenzprotein diente Rinderserumalbumin (BSA, MBI Fermentas, St. Leon-Rot).

Die Gesamtproteinextraktion aus reifem Pollen erfolgte analog, außer, dass dieser mit 2-3 Volumen Gesamtprotein-Extraktionspuffer mit 2,5 U/ml Benzonase[®] Nuclease (Novagen/Merck Biosciences) versetzt wurde.

Zur Extraktion von Gesamtproteinen, die in Kinase Assays (2.2.5.11) eingesetzt wurden, wurde der Gesamtprotein-Extraktionspuffer mit 60 mM β -Glycerophosphat, 1 mM Na-ortho-Vanadat und 5 mM NaF sowie 20 μ l/ml Proteinase Inhibitor Cocktail (#P8849, Sigma Aldrich, München) ergänzt.

Zum Einsatz der Gesamtproteine in *in-gel* Assays (2.2.5.11.3) wurde an Stelle des Gesamtprotein-Extraktionspuffers der *in-gel* Lysispuffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 137 mM NaCl, 1 mM $MgCl_2$, 1 mM Na-ortho-Vanadat, 100 μ M NaF, 1% (v/v) Nonidet P-40, 10 mM β -Glycerophosphat, 1% (v/v) Glycerol, 1 mM PMSF, 1 mM AEBSF) verwendet.

2.2.5.6.1. Gesamtproteinextrakte aus *in vitro* gekeimtem Pollen

In vitro auf 1xPGM-Halbfestmedium gekeimter Pollen (2.2.2.1) wurde nach Überführung von der Agarplatte in ein vorgekühltes 2 ml Reaktionsgefäß mit $\frac{1}{2}$ Volumen 2-fach konzentriertem Gesamtprotein-Extraktionspuffer versetzt und mit einem Dispergierwerkzeug aufgeschlossen. Nach Zentrifugation (30 min, 4°C, 10.000xg) wurde der Überstand mit *Centri-con 10* Aufkonzentrationssäulen (Amicon, Beverly, USA) eingengt, um die Proteinkonzentration zu erhöhen.

2.2.5.7. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Proteine und Proteinextrakte wurden vor der elektrophoretischen Größenaufftrennung mit SDS-Ladepuffer versetzt (Endkonzentration in der Proteinprobe 12 mM Tris-HCl pH 7.5, 5% (v/v) Glycerol, 0,4% (w/v) SDS, 2,8 mM β -Mercaptoethanol, 0,02% (w/v) Bromphenolblau) und 5 min bei 85°C inkubiert.

Die Auftrennung von Proteingemischen erfolgte mit dem *NuPAGE® Gel System* der Firma Invitrogen (Karlsruhe) in einer *XCell SureLock™* Minigel-Kammer mit 10%- und 12%igen *NuPAGE® Bis-Tris Gelen* und 1xMOPS Laufpuffer nach Herstellerangaben.

In Kinase-Assays (2.2.5.11) wurden rekombinante Proteine und Proteinextrakte nach LAEMMLI (1970) in 10-12%igen (w/v) Polyacrylamidgelen mit 0,1% (w/v) SDS aufgetrennt. Die Acrylamidkonzentration im Sammelgel betrug 5%. Die Elektrophorese erfolgte in einer *Mini-PROTEAN® 3 Elektrophoresis Cell* der Firma Bio-Rad Laboratories (München) für 2-3 h bei 15-25 mA je Gel.

Das Molekulargewicht der aufgetrennten Proteine wurde aus parallel aufgetrennten Proteinstandards (2.1.3) hergeleitet.

2.2.5.8. Synthese eines polyklonalen Antikörpers

Die Synthese eines polyklonalen, gegen ZmPTI1 gerichteten Antikörper wurde in zwei Kaninchen (#5221, #5222) von der Firma Biogenes (Berlin) durchgeführt. Für die Immunisierung wurde rekombinantes ZmPTI1-6His überexprimiert (2.2.5.1) und denaturierend aufgereinigt (2.2.5.2). Beide Kaninchen wurden am 1., 7., 14. und 28. Tag insgesamt je ~700 mg ZmPTI1-6His injiziert. Die erste Probeblutung erfolgte am 28. Tag, die erste Blutung am 35. Tag. Um die Sensitivität des Antiserums zu erhöhen, wurde jedem Tier insgesamt weitere 300 mg rekombinantes Protein am 70., 84. und 98. Tag injiziert. Am 112. Tag erfolgte die Ausblutung und Antiserumgewinnung.

Die beiden Präimmunsereen und Antiseren gegen ZmPTI1 wurden hinsichtlich ihrer immunogenen Aktivität getestet (2.2.5.8.1) und aliquotiert bei 4°C und -20°C gelagert.

2.2.5.8.1. Test des polyklonalen Antikörpers

Die erhaltenen Antiseren der Tiere #5221 und #5222 wurden hinsichtlich ihrer immunogenen Aktivität gegen das *ZmPti1*-Protein getestet. Beide Antiseren wurden in Konzentrationen von 1:250, 1:500, 1:1.000, 1:2.500 und 1:5.000 zum Nachweis von ZmPTI1 in *Western* Detektionen eingesetzt. Je Antiserumkonzentration wurden nebeneinander 100 ng rekombinantes ZmPTI1-6His (2.2.5.1) und 40 µg Pollen-Gesamtproteinextrakt (2.2.5.6) elektrophoretisch aufgetrennt (2.2.5.7). Nach *Western Blot* der aufgetrennten Proteine auf eine *ECL*-Nitrocellulose-Membran (2.2.5.9) wurde die Membran in Streifen geschnitten. In der anschließenden *Western* Detektion (2.2.5.10) wurde rekombinantes und natives ZmPTI1 mit den unterschiedlichen Antiserumkonzentrationen nachgewiesen und so die immunogene Aktivität der Antiseren bestimmt. Zur Bestimmung der immunogenen Hintergrundaktivität der Präimmunsereen wurden diese in einer Konzentrationen von 1:500 eingesetzt.

Aufgrund der höheren immunogenen Aktivität des Antiserums des Tieres #5222 (3.3.3.2.), wurde dieses zum Nachweis von endogenem ZmPTI1 als primärer Antikörper in Konzentrationen von 1:250 bis 1:500 eingesetzt.

2.2.5.9. *Western Blot* von SDS-Gelen

Der Transfer elektrophoretisch aufgetrennter Proteine und Proteingemische (2.2.5.7) erfolgte *semi dry* mit der *Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell* Elektroblotapparatur (Bio-Rad Laboratories, München) auf *ECL*-Nitrocellulose-Membran (Amersham Biosciences, Freiburg).

Ungefärbte Proteingele sowie drei Stücken *Whatman*-Papier gleicher Größe wurden vor dem Transfer 30 min in Kathoden-Puffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM Glycin, 0,1% (w/v) SDS) inkubiert. Zur Übertragung mit Coomassie gefärbter Proteine (SAMBROOK *et al.*, 1989) wurde die SDS Konzentration des Kathoden-Puffers auf 0,5% (w/v) erhöht. Die *ECL*-Nitro-

cellulose-Membran wurde mit drei Stücken *Whatman*-Papier gleicher Größe für 30 min in Anoden-Puffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM Glycin, 30% (v/v) Methanol) äquilibriert. In der Blottingapparatur wurden die in Anodenpuffer inkubierten *Whatman*-Papiere und die Membran deckungsgleich und blasenfrei auf die Anode gelegt. Im Anschluss wurde das Protein-Gel ebenfalls blasenfrei umgekehrt aufgelegt und mit drei, in Kathoden-Puffer inkubierten, *Whatman*-Papieren abgedeckt. Nach Aufsaugen überschüssigen Puffers erfolgte der Transfer für 2-2,5 h mit 0,65 mA/cm² Gel. Die *ECL*-Membran wurde mit destilliertem Wasser gespült und zwischen *Whatman*-Papier lichtgeschützt bei 4°C aufbewahrt oder nach Kontrolle der quantitativen Überführung der Proteine durch Ponceau-Färbung (SAMBROOK *et al.*, 1989) für die *Western* Detektion (2.2.5.10) verwendet.

2.2.5.10. *Western* Detektion

Der *Western* Nachweis von spezifischen Proteinen erfolgte in Anlehnung an das *Western Blot Protocol* des *His-Tag Monoclonal Antibody* (NOVAGEN, 2001). Alle Inkubationsschritte der *ECL*-Membran erfolgten mit der Proteinseite nach oben bei RT auf einem Orbital-Schüttler in sauberen 145 mm-Petrischalen. Die *ECL* -Membran wurde zweimal für je 10 min in 1xTBS (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 7,5 mM NaCl) äquilibriert. Nach der anschließenden einstündigen Blockierung der Membran in 15 ml Blockinglösung (5% Glücksklee Magermilchpulver in 1xTBS) wurde zweimal für je 10 min mit 1xTBSTT (20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 500 mM NaCl, 0,05% (v/v) Tween[®]20, 0,2% (v/v) Triton[®] X100) gewaschen und für 10 min in 1xTBS inkubiert. Es folgte eine einstündige Inkubation der Membran in 15 ml einer 1:1.000 Verdünnung des monoklonalen His-Tag-Antikörpers der Firma Novagen/Merck Biosciences (Schwalbach) oder einer 1:250 bis 1:400 Verdünnung des ZmPTI1-Antiserums des Kaninchens #5222 (2.2.5.8) in Blockinglösung. Nach zweimaligem Waschen für 10 min in 1xTBSTT und 10-minütiger Inkubation in 1xTBS wurde für 1 h in 15 ml einer 1:5.000 Verdünnung des HRP-konjugierten, monoklonalen Anti-Kaninchen IgG (#A1949, Sigma-Aldrich, München) in Blockinglösung inkubiert. Anschließend wurde fünfmal 10 min mit 1xTBSTT gewaschen. Zur Detektion der spezifisch gebundenen Kaninchenantikörper wurde die Membran mit 100-200 µl frischer Detektionslösung des *ECL*-Immunodetektionssystems (Amersham Biosciences, Freiburg) überschichtet, eingeschweißt und umgehend mit *Hyperfilm MP* (Amersham Biosciences, Freiburg) exponiert.

Zur Wiederverwendung von *ECL*-Nitrocellulose-Membranen wurden gebundene Antikörper durch 5-minütiges Inkubieren in 0,2 M NaOH entfernt. Nach Spülen mit Wasser und 10-minütigem Äquilibrieren in 1xTBS wurde die Membran bei 4°C aufbewahrt oder für weitere *Western* Detektionen eingesetzt.

2.2.5.11. Kinase Assays

In Kinase Assays wurden nativ affinitätsaufgereinigte rekombinante Proteine (2.2.5.3.1, 2.2.5.4 und 2.2.5.5) und nativ extrahierte Gesamtproteine aus Maisgeweben (2.2.5.6) unter nativen Bedingungen in Gegenwart von radioaktivmarkiertem γ -[³²P]-ATP inkubiert, um die Auto- bzw. *trans*-Phosphorylierungsaktivitäten zu bestimmen.

2.2.5.11.1. Standard-Phosphorylierungsassay

Für den Standard-Phosphorylierungsassay wurde mit *Ni-NTA Magnetic Agarose Beads* nativ aufgereinigtes ZmPTI1-6His und ZmPTI1(K100N)-6His (2.2.5.3.1), mit *Amylose Resin* nativ aufgereinigtes LePTO (2.2.5.4) sowie mit *GST-Bind-Resin* nativ aufgereinigtes LePTI1(K96N) (2.2.5.5) eingesetzt. Alle verwendeten Gesamtproteinextrakte aus Maisgeweben wurden ebenfalls nativ aufgearbeitet (2.2.5.6). Der Standard-Phosphorylierungsassay erfolgte modifiziert nach CHANG *et al.* (1992) und JIA *et al.* (1997):

Die jeweiligen Matrizen mit immobilisierten rekombinanten Proteinen wurden durch kurzes Waschen mit 1xKinasepuffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.0, 10 mM β -Mercaptoethanol, 10 mM MnCl₂) äquilibriert. Zum Entfernen der Überstände wurden die *Amylose*- und *GST-Bind-Resin* für 1 min bei 4°C und 1.000xg pelletiert. Die *Ni-NTA Magnetic Agarose Beads* wurde mittels eines Magneten abgetrennt. Standard-Phosphorylierungsassays wurden im 50 μ l-Ansatz durchgeführt:

- a) direkt auf matrixgebundenen rekombinanten Proteinen,
- b) direkt auf matrixgebundenen rekombinanten Proteinen in Gegenwart von 40 μ g Gesamtprotein verschiedener Maisgewebe oder
- c) direkt auf Kombinationen verschiedener matrixgebundener rekombinanter Proteine.

Als Negativkontrollen wurden Gesamtproteinextrakte mit frischer unbeladener Affinitätsmatrix inkubiert, um Hintergrundphosphorylierungsaktivitäten in unterschiedlichen Maisgeweben zu identifizieren.

Der Reaktionsansatz für den Kinaseassay setzte sich zusammen aus 50 mM Tris-HCl pH 7.0, 10 mM β -Mercaptoethanol, 10 mM MnCl₂, 20 μ M ATP und 10 μ Ci γ -[³²P]-ATP. Während der 20- bis 30-minütigen Inkubation bei 25°C wurden die Proben im Thermomixer leicht geschüttelt (1000 rpm) und alle 5 min *aufgeschnippt*. Nach Zentrifugation (1 min, RT, 1.000xg) wurde der Überstand entfernt und die Matrizen zweimal mit je 100 μ l 1xTBS Isolierungspuffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.3, 300 mM NaCl, 10 mM β -Mercaptoethanol, 0,1% (v/v) Tween[®] 20) gewaschen. Die Elution der matrixgebundenen Proteine erfolgte durch die Zugabe von 20 μ l 2xSDS-Ladepuffer und 5-minütiger Inkubation bei 85°C. Nach kurzer Zentrifugation (>15.000xg) wurden die Proben auf ein 10%iges SDS-Polyacrylamid-Gel geladen und elektrophoretisch aufgetrennt (2.2.5.7). Beim Gellauf wurde darauf geachtet, dass nicht

eingebautes γ -[32 P]-ATP mit der Lauffront aus dem Gel lief. SDS-Polyacrylamid-Gele wurden nach dem Gellauf zweimal für 10 min in 1xLAEMMLI Laufpuffer (25 mM Tris-HCl, 19,2 mM Glycin, 0,1% (w/v) SDS) bei RT gewaschen, anschließend getrocknet (2.2.5.11.4) oder eingeschweißt und bei RT mit *Hyperfilm MP* (Amersham Biosciences, Freiburg) exponiert.

2.2.5.11.2. Interaktions-Kinase-Assay

Für den Interaktions-Kinase-Assay wurde natives an *Ni-NTA Magnetic Agarose Beads* immobilisiertes ZmPTI1(K100N)-6His (2.2.5.3.1) mit je 40 μ g Gesamtprotein verschiedener Maisgewebe präinkubiert. Dabei sollten putative ZmPTI1-Phosphorylierungspartner aus dem Gesamtproteinextrakt spezifisch mit dem immobilisierten ZmPTI1(K100N)-6His interagieren und durch anschließendes Waschen nicht entfernt werden.

Ni-NTA Magnetic Agarose Beads mit gebundenem ZmPTI1(K100N)-6His (2.2.5.3.1) wurden durch Waschen mit 100 μ l Interaktionspuffer (50 mM NaH_2PO_4 , pH 8.0, 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol, 10 mM β -Mercaptoethanol, 1 mM PMSF, 0,05% (v/v) Tween[®] 20) äquilibriert. Nach Entfernen des Überstandes wurden die Magnetpartikel in 100 μ l Interaktionspuffer aufgenommen und mit 40 μ g Gesamtprotein versetzt. Nach einstündiger Inkubation bei 4°C im über-Kopf-Schüttler wurde der Überstand entfernt und einmal mit 100 μ l Interaktionspuffer gewaschen. Die Affinitätsmatrix, an die das rekombinante ZmPTI1(K100N)-6His mit putativen Interaktionspartnern gebunden war, wurde mit dem Reaktionsansatz (50 mM Tris-HCl pH 7.0, 10 mM β -Mercaptoethanol, 10 mM MnCl_2 , 20 μ M ATP und 10 μ Ci γ -[32 P]-ATP) versetzt und wie für den Standard-Phosphorylierungsassay (2.2.5.11.1) beschrieben behandelt.

2.2.5.11.3. *in-gel* Assay

Für den *in-gel* Assay nach WOOTEN (2002) wurde je 40 μ g Gesamtprotein aus verschiedenen Maisgeweben eingesetzt, die nativ mit dem *in-gel*-Lysispuffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 137 mM NaCl, 1 mM MgCl_2 , 1 mM Na-ortho-Vanadat, 100 μ M NaF, 1% (v/v) NP-40, 10 mM β -Glycerophosphat, 1% (v/v) Glycerol, 1 mM PMSF, 1 mM AEBSF) präpariert wurden (2.2.5.6). Als Substrat wurde rekombinantes ZmPTI1(K100N)-6His eingesetzt, das in einer Maxipräparation nativ aufgereinigt wurde (2.2.5.3.2). Als Kontrollen standen mit *Ni-NTA Agarose Beads* aufgereinigtes ZmPTI1-6His und ZmPTI1(K100N)-6His zur Verfügung (2.2.5.3.2). Gesamtproteinextrakte sowie die rekombinanten Kontrollproteine wurden frisch hergestellt. Das Substrat wurde am Vortag nativ aufgereinigt und bei 4°C gelagert (2.2.5.3.3).

Tag 1

In einer *Mini-PROTEAN® 3 Elektrophoresis Cell* der Firma Bio-Rad Laboratories (München) wurden zwei 1 mm dicke, 12%ige SDS-Polyacrylamid-Gele gegossen: eines ohne Substrat (Gel A), eines mit co-polymerisierten Substrat (Gel B: 300 µg/ml ZmPTI1(K100N)-6His).

<u>12% Trenngel (5 ml)</u>	Gel A	Gel B
Wasser	2,36 ml	2,36 - x ml
1,5 mg Substrat (ZmPTI1(K100N)-6His)	./.	x ml
1,5 M Tris-HCl, pH 8.8	1,30 ml	1,30 ml
30% Acryl-BisAcrylamid-Mix	2,00 ml	2,00 ml
50% Glycerol	100 µl	100 µl
20% SDS	25 µl	25 µl
10% APS	170 µl	170 µl
TEMED	2,5 µl	2,5 µl

Die Trenngele wurde nach Überschichten mit Wasser zum Polymerisieren für 1-1.5 h bei 37°C inkubiert, das Wasser im Anschluss entfernt und das Gel mehrfach mit LAEMMLI-Laufpuffer (25 mM Tris-HCl, 19,2 mM Glycin, 0,1% (w/v) SDS) gespült. Anschließend wurden die beiden 5%igen Sammelgele mit je zehn Taschen gegossen:

<u>5% Sammelgel</u>	für zwei Gele
Wasser	2,16 ml
0,5 M Tris-HCl, pH 6.8	950 µl
30% Acryl-BisAcrylamid-Mix	635 µl
20% SDS	18,8 µl
10% APS	43,8 µl
TEMED	3 µl

Nach dem Auspolymerisieren der Sammelgele wurden die Kämme vorsichtig entfernt und die Gele in die Elektrophoresekammer überführt. *Obere* und *untere* Kammer wurden mit LAEMMLI-Laufpuffer befüllt, die Geltaschen mit Laufpuffer gespült und, um die Unversehrtheit der Taschen zu kontrollieren, mit je 1 µl 2xSDS-Ladepuffer (125 mM Tris-HCl, pH 6.8, 4% (w/v) SDS, 10% β-Mercaptoethanol, 20% Glycerol, 0,05% (w/v) Bromphenolblau) beladen.

Beide Gele wurden mit identische Mengen an Kontrollproteinen und Gesamtproteinextrakten beladen. Die geelektrophoretische Auftrennung der Proben und eines gefärbten Proteingrößenstandards erfolgte für etwa 3 h bei 12,5 mA je Gel bis zum Austritt der Bromphenolblau-Lauffront (2.2.5.7).

Nach dem Gellauf wurden die Sammelgele abgetrennt und jedes Gel in einen individuell gekennzeichneten Behälter überführt. Das Entfernen des SDS aus beiden Gelen erfolgte unter leichtem Schwenken durch fünfmaliges Waschen für 12 min mit je 50 ml *SDS-Removal Solution I* (20% (v/v) Isopropanol, 50 mM Tris-HCl, pH 8.0) auf einem Orbital-Schüttler. Im Anschluss wurde dreimal für je 20 min mit je 50 ml *SDS-Removal Solution II* (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM DTT) geschwenkt. Zur Denaturierung der Proteine wurden die Gele jeweils in 50 ml Denaturierungspuffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 20 mM DTT, 6 M Guanidinhydrochlorid) wie folgt inkubiert: einmal für 30 min sehr leicht schwenkend, einmal für 30 min leicht schwenkend und nach erneutem Pufferwechsel für 1 h leicht schwenkend. Zur Renaturierung der Proteine wurden die Gele viermal für 10 min bei RT in je 50 ml Renaturierungspuffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 5 mM DTT, 0,04% Tween[®]20, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂) leicht schwenkend inkubiert. Die Renaturierung wurde bei 4°C ohne Schwenken mit je 50 ml Renaturierungspuffer für 3 h und ein zweites Mal für mindestens 12 h fortgesetzt.

Tag 2

Nach zweimaligem Waschen der Gele mit je 50 ml *SDS-Removal Solution II* für 10 min bei RT unter leichtem Schwenken, wurden die Gele in 25 ml *kaltem Kinase Assay Puffer* (25 mM Hepes, pH 7.4, 20 mM MgCl₂, 1 mM MnCl₂, 5 mM NAF, 100 µM Na-ortho-Vanadat, 2,5 µg/ml p-Nitrophenylphosphat, 1 mM DTT) leicht schwenkend äquilibriert.

Je Gel wurden 25 ml *heißer Kinase Assay Puffer* (25 mM Hepes, pH 7.4, 20 mM MgCl₂, 1 mM MnCl₂, 5 mM NAF, 100 µM Na-ortho-Vanadat, 2,5 µg/ml p-Nitrophenylphosphat, 1 mM DTT, 50 µM ATP, 120 µCi γ -[³²P]-ATP) für 10 min bei 30°C vorgewärmt. Die äquilibrierten Gele wurden in den *heißen Kinase Assay Puffer* überführt und für 2 h bei 30°C unter leichter Bewegung inkubiert. Nach Entfernen des *heißen Kinase Puffers* wurden die Gele bei RT unter leichtem Schütteln mit Gel-Waschlösung (5% Trichloressigsäure, 1% Natriumpyrophosphat) gründlich gewaschen: viermal 10 min, zweimal 20 min und übers Wochenende mit Wechsel der Waschlösung alle 8 bis 16 h. Im Anschluss an das Waschen der Gele wurden diese getrocknet (2.2.5.11.4) und bei RT mit *Hyperfilm MP* (Amersham Biosciences, Freiburg) exponiert.

2.2.5.11.4. Trocknung von SDS-Polyacrylamid-Gelen

Um die Schärfe und Intensität der Phosphorylierungssignale zu erhöhen, wurden SDS-Polyacrylamid-Gele aus Kinase-Assays im *Gel Drying System 583* (Bio-Rad Laboratories, München) getrocknet. Hierfür wurden die Gele blasenfrei auf ein gut durchfeuchtetes *Whatman*-Papier gelegt und mit Frischhaltefolie faltenfrei abgedeckt. Nach Anlegen eines Vakuums wurde 2.5 h bei langsam ansteigender Deckeltemperatur (max. 60°C) getrocknet und anschließend bei RT mit *Hyperfilm MP* (Amersham Biosciences, Freiburg) exponiert.

2.2.6. SMART™ cDNA-Synthese

Die Synthese von cDNAs aus Gesamt-RNAs erfolgte mit dem *SMART™ PCR cDNA Synthesis Kit* (BD Biosciences, Freiburg) nach Herstellerangaben (*User Manual* PT3041-1).

Das Design der verwendeten *SMART*¹⁸-Primer erlaubt die präferenzielle Anreicherung von Erststrang-cDNAs mit vollständigem 5' Ende und unterbindet die Erststrangsynthese von poly A⁻-RNAs, sowie die spätere Amplifikation unvollständig revers transkribierter cDNAs und kontaminierender genomischer DNAs.

Für die cDNA-Synthese wurde je 1 µg Gesamt-RNA (2.2.4.1) aus 10 min in Flüssigmedium gekeimtem Pollen (2.2.2.1) und ungekeimtem Pollen des *Wildtyps* (*wt*) und der *white pollen* Mutante (*whp*) eingesetzt. Die Erststrangssynthese erfolgte entsprechend den Angaben in den Abschnitten *VA* und *VIIA* des *User Manuals*. Die Zweitstrangsynthese und Amplifikation der cDNAs durch *long distance PCR* (*LDPCR*) erfolgte mit 20 Zyklen (95°C 15 sec, 65°C 30 sec, 68°C 6 min) nach einem 1-minütigen Denaturierungsschritt bei 95°C im *Biometra Uno II Thermocycler* (Whatman-Biometra, Göttingen). Die synthetisierten cDNA-Populationen wurden für die Subtraktive Hybridisierung nach BUCHANAN-WOLLASTON und AINSWORTH (2.2.7.1), zur Herstellung einer cDNA-Bibliothek mit dem *SMART™ cDNA Library Construction Kit* (2.2.8) und in der suppressiven Subtraktiven Hybridisierung mit dem *PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit* (2.2.7.2) der Firma BD Biosciences (Freiburg) verwendet.

2.2.7. Subtraktive Hybridisierungen

Zur Identifizierung differentiell exprimierter Gene im Pollen der sterilen *white-pollen* Mutante und dem fertilen *Wildtyp* wurden cDNA-Populationen (2.2.6) aus 10 min *in vitro* gekeimtem Pollen der *whp*-Mutante und des *Wildtyps* miteinander verglichen. Der Vergleich erfolgte nach einer von BUCHANAN-WOLLASTON und AINSWORTH 1997 beschriebenen Methode (2.2.7.1) und mit dem *PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit* (2.2.7.2) der Firma BD Biosciences (Freiburg). Grundsätzlich findet in beiden Methoden die Hybridisierung zweier cDNA-Populationen, dem *tester* und dem *driver*, statt. Die Hybridisierung wird dazu genutzt, cDNA-Sequenzen die in beiden Populationen vorhanden sind abzureichern und gleichzeitig, die überwiegend oder ausschließlich in einer Population (*tester*) vorhandenen cDNA-Sequenzen anzureichern.

¹⁸ *SMART™: Switch Mechanism At 5' end of RNA Transcript*

2.2.7.1. Subtraktive Hybridisierung nach BUCHANAN-WOLLASTON und AINSWORTH

Die subtraktive Hybridisierung nach BUCHANAN-WOLLASTON und AINSWORTH (1997) wurde wie von LORBIECKE und SAUTER (2002) beschrieben durchgeführt. Wie in Abschnitt 2.2.6 beschrieben, wurden aus Gesamt-RNAs 10 min *in vitro* gekeimter Pollen des *Wildtyps* und der *white pollen* Mutante die *tester*- und *driver*-cDNA-Populationen synthetisiert. Nach der Restriktion der *tester*- und *driver*-cDNAs mit den Restriktionsendonukleasen *RsaI* und *AluI* erfolgte die Ligation der korrespondierenden Adaptoren. Nicht ligierte Adaptorkomponenten wurden elektrophoretisch über ein Agarosegel abgetrennt. Im Anschluss an die Elution der *tester*- und *driver*-cDNAs erfolgte deren Amplifikation mit adaptorspezifischen Primern.

Für die erste Hybridisierung wurden 0,5 µg *tester*- und 5 µg *driver*-cDNA gemeinsam denaturiert, für 20 h bei 65°C inkubiert und anschließend die biotinylierten *driver-tester*-cDNA-Hybride sowie die *driver*-cDNAs über *Streptavidin-Magnetic Beads* (Dynal, Hamburg) aus dem Ansatz entfernt. Nach Zugabe von 2,5 µg frisch denaturierter *driver*-cDNA wurde für 2 h hybridisiert und *driver-tester*-cDNA-Hybride und überschüssige *driver*-cDNAs entfernt. Die resultierenden, subtrahierten *tester*-cDNAs aus dem Überstand wurden spezifisch amplifiziert und für die nächsten beiden Hybridisierungsrounden aus langer und kurzer Hybridisierung mit neuen *driver*-cDNAs eingesetzt.

Die nach drei Runden langer und kurzer Hybridisierungen angereicherten *tester*-cDNAs wurden spezifisch amplifiziert, mit *EcoRI* restringiert und nach Aufreinigung in einen entsprechend linearisierten *pBluescript KS* (Stratagene, Heidelberg) subkloniert. Nach Transformation der Plasmide in den *E.coli*-Stamm *DH5a* (QIAGEN, Hilden) wurden erhaltenen Subtraktionsklone in *Dot-Blot* Hybridisierungen (2.2.7.1.1) analysiert.

2.2.7.1.1. Dot-Blot Hybridisierung

Um zu überprüfen, ob die Subtraktionsklone aus 2.2.7.1 cDNA-Fragmente enthalten, die differentiell exprimierte Gene repräsentieren, wurden ihre cDNA-Insertionen in *Dot-Blots* aufgespendet und gegen Sonden aus *driver*- und *tester*-cDNA-Populationen hybridisiert.

Zur späteren Hybridisierung gegen zwei Sonden, einer *tester*- und einer *driver*-spezifischen, wurden zwei identische *Dot Blots* hergestellt: Hierzu wurden die cDNA-Insertionen zufällig ausgewählter Subtraktionsklone mit den *MCS*¹⁹-spezifischen Primern *EI* und *EII*²⁰ per PCR amplifiziert (Denaturierung 94°C 4 min, 30 Zyklen: 94°C 45 sec, 55°C 45 sec, 72°C 1 min).

¹⁹ *Multiple Cloning Site*

²⁰ Primer *EI*: 5'-CCCCCGGGCTGCAGGAATTC-3' *EII*: 5'-TATCGATAAGCTTGATATCG-3'

Von allen, für die *PCR* Amplifikation gewählten, Subtraktionsklonen wurden über-Nacht-Kulturen im Reaktionsgefäß und Ausstriche auf LB-amp¹⁰⁰-Platten angefertigt.

Zur Herstellung der beiden identisch beladenen *Dot-Blots* wurden die amplifizierten cDNA-Insertionen mit einer *Dot-Blot*-Apparatur auf eine *Hybond N+* Nylonmembran (Amersham Biosciences, Freiburg) aufgespendet. Die in Wasser äquilibrierten Membranen wurden blasenfrees auf ebenfalls in Wasser äquilibrierte *Whatman*-Papiere in die *Dot Blot* Apparaturen gelegt. Die Apparaturen wurden geschlossen und jeweils 90 µl einer 1:10 Verdünnung des *PCR*-Ansatzes wurde per Vakuum auf die Membranen aufgebracht. Die beiden Membranen wurden mit dem DNA-Seite nach oben 5 min auf zwei Lagen *Whatman*-Papier denaturiert (0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl), 5 min neutralisiert (1,5 M NaCl, 0,5 M Tris-HCl, pH 7.0) und 10 min auf 2xSSC inkubiert. Zur Fixierung der cDNA-Fragmente wurden die Membranen beidseitig mit 1.200 µJ/cm² UV-Licht bestrahlt.

Für die differentielle Hybridisierung der beiden Membranen wurden je 3 µg *tester*- und *driver*-cDNA zur Abtrennung der Adaptoren mit 10 U *EcoRI* verdaut und über eine *MicroSpin™ Column S-300 HR* (Amersham Biosciences, Freiburg) aufgereinigt. Für die radioaktive Markierung mit je 50 µCi α-[³²P]-dCTP (2.2.3.3.2) wurden je 30 ng der adaptorfreien *tester*- und *driver*-cDNAs eingesetzt. Nach Denaturierung der Sondenfragmente wurde den prähybridisierten Membranen jeweils gleiche Mengen spezifischer Aktivität (12·10⁷ cpm) einer der beiden Sonden zugesetzt und über Nacht bei 68°C hybridisiert. Das Waschen und die Detektion beider Membranen erfolgte nach dem *Northern* Protokoll (2.2.4.3).

Aufgespendete cDNA-Insertionen von Subtraktionsklonen, die im Autoradiogramm mit der *tester*- ein stärkeres Signal als mit der *driver*-Sonde zeigten, wurden in *Northern* Analysen (2.2.4.3) als Sonde gegen Gesamt-RNAs aus reifem und *in vitro* keimendem Pollen des *Wildtyps* und der *whp*-Mutante eingesetzt.

2.2.7.2. Suppressive subtraktive Hybridisierung (SSH)

In der suppressiven subtraktiven Hybridisierung (SSH) mit dem *PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit* (BD Biosciences, Freiburg) wurde in einer ersten Hybridisierung von *tester*- und *driver*-cDNA-Populationen die Häufigkeit der auftretenden cDNAs normalisiert. Die Methode gewährleistet, dass nach einer zweiten Hybridisierung nur solche *tester*-cDNAs exponentiell amplifiziert und angereichert werden können, die in der ersten Hybridisierung einzelsträngig blieben. Das sind vor allem *tester*-cDNAs, die differentiell exprimierte Gene repräsentieren und sehr selten vorkommen.

Für die SSH wurden *tester*- und *driver*-cDNA-Populationen wie in 2.2.6 beschrieben aus Gesamt-RNAs von 10 min *in vitro* gekeimtem Pollen des *Wildtyps* und der *white pollen* Mutante synthetisiert. Diese wurden entsprechend dem *SMART™ PCR cDNA Synthesis Kit User Ma-*

nual Abschnitt VII B und VIII (BD BIOSCIENCES, 2000) in einer *LDPCR* mit 21 Amplifikationszyklen amplifiziert, in einer *Column Chromatography* gereinigt, mit *RsaI* verdaut und abschließend aufgereinigt.

Das weitere Vorgehen erfolgte nach dem Benutzerhandbuch für das *PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit* (BD BIOSCIENCES, 2001^o). Nach der Ligation unterschiedlicher *tester*-Adaptoren *1* und *2R* an je eine Hälfte der *tester*-cDNA-Population (Abschnitt IV F) wurden die beiden *tester*-cDNA-Populationen (*tester-1* und *tester-2R*) jeweils mit einem Überschuss an *driver*-cDNAs (Verhältnis ~1:30) versetzt und zur Normalisierung von seltenen und häufigen cDNA-Sequenzen 10 h bei 68°C inkubiert (IV G). Im Anschluss wurden beide Hybridisierungsansätze vereinigt, mit zusätzlicher frisch denaturierter *driver*-cDNA versetzt und über Nacht bei 68°C hybridisiert (IV H). Bei der anschließenden *PCR* (27 Zyklen: 94°C 30 sec, 66°C 30 sec, 72°C 1,5 min) erfolgte bei allen doppelsträngigen *tester-tester*-cDNAs das Auffüllen der Primerbindestellen im Bereich der Adaptoren *1* und *2R*. Methodisch wird so gewährleistet, dass nur die *tester*-cDNAs amplifiziert werden, die an beiden Enden unterschiedliche *tester*-Adaptoren haben (IV I). Die resultierenden cDNAs wurden abschließend mit *nested* Primern erneut amplifiziert (12 Zyklen: 94°C 30 sec, 66°C 30 sec, 72°C 1,5 min) und nach Ligation mit dem *TOPO TA Cloning Kit* in elektrokompetente Zellen *TOP 10F'* (Invitrogen, Karlsruhe) transformiert. Die Analyse der Klone erfolgte entsprechend dem *PCR-Select Differential Screening Kit* (BD Biosciences, Freiburg) wie in 2.2.7.2.1 erläutert.

2.2.7.2.1. Differentielle Durchmusterung der Subtraktionsklone der suppressiven subtraktiven Hybridisierung

Die Analyse der Klone aus der suppressiven subtraktiven Hybridisierung (SSH, 2.2.7.2) erfolgte in Anlehnung an das Protokoll des *PCR-Select Differential Screening Kit* (BD BIOSCIENCES, 2001^a).

Die *PCR*-Amplifikation der cDNA-Insertion von Subtraktionsklonen (94°C, 3 min, 23 Zyklen: 94°C 30 sec, 68°C 3 min) erfolgte aus 1 µl Bakterienkultur mit den *nested Primern 1* und *2R* (Abschnitt VII A). Für die differentielle Hybridisierung mit vier unterschiedlichen Sonden wurden identische *Dot-Blots* durch Aufspenden von je 40 µl einer 1:22 Verdünnung der *PCR*-Ansätze wie in 2.2.7.1.1 beschrieben angefertigt und gegen gleiche spezifische Aktivitäten ($4,5 \cdot 10^7$ cpm) radioaktiv markierter Sonden (2.2.3.3.2) hybridisiert. Die Synthese der als Sonden eingesetzten cDNAs sind Abschnitt V des Benutzerhandbuchs zu entnehmen. Die Prähybridisierung und Hybridisierung sowie das Waschen und die Autoradiografie erfolgte entsprechend dem *Northern* Protokoll (2.2.4.3).

Subtraktionsklone, die mit den eingesetzten *tester*-Sonden stärkere Autoradiographiesignale zeigten als mit den *driver*-Sonden, wurden für die *Northern* Analysen (2.2.4.3) ausgewählt, um die differentielle Expression auf RNA-Ebene zu bestätigen.

2.2.8. Erstellung und Analyse einer cDNA-Bibliothek –

SMART™ cDNA Library Construction

Aus der cDNA-Population 10 min *in vitro* gekeimter *Wildtyp* Pollen wurde mit dem *SMART™ cDNA Library Construction Kit* (BD Biosciences, Freiburg) eine cDNA-Bibliothek im λ *TriplEx2™* Vektor nach Herstellerangaben erstellt.

50 μ l der mit *LDPCR* amplifizierte cDNA-Population (2.2.6) wurden entsprechend dem *SMART™ cDNA Library Construction Kit User Manual* (BD BIOSCIENCES, 2001^b) mit Proteinase K verdaut (Abschnitt V C), mit der Endonuklease *SfiI* restringiert und über *CHROMA SPIN-400* Säulen größenfraktioniert (V D). Vier cDNA-Fractionen des Größenbereichs 600-800 bp wurden vereinigt, gefällt und in 7 μ l Wasser aufgenommen (V E). 0,5 μ l der aufgenommenen cDNAs wurden in den *SfiI*-geschnittenen λ *TriplEx2™* Vektor subkloniert (VI A), mit dem *Gigapack® III Gold Packaging Extract* (Stratagene, Heidelberg) nach Herstellerangaben verpackt und die Anzahl lebensfähiger Phagenpartikel bestimmt ($6 \cdot 10^6$ pfu).

Nach Amplifikation der resultierenden cDNA-Bibliothek (VII E) wurde deren Titer bestimmt ($5,24 \cdot 10^8$ pfu) und die Durchmusterung mit spezifischen Sonden, wie in Abschnitt 2.2.8.1 beschrieben, durchgeführt. Zur langfristigen Lagerung der cDNA-Bibliothek wurden Phagen-Dauerkulturen hergestellt (2.2.10).

2.2.8.1. Durchmusterung der cDNA-Bibliothek mit spezifischen Sonden

Um die cDNA-Bibliothek aus *in vitro* gekeimten *Wildtyp*-Pollen (2.2.8) zu durchmustern, wurden Zellen des *E.coli* Stammes *XL1-Blue MRF* (Stratagene, Heidelberg) mit λ *TriplEx2™* Phagenpartikeln infiziert und ausplattiert: *XL1-Blue MRF* Zellen wurden frisch angezogen, geerntet und in 10 mM $MgSO_4$ resuspendiert ($OD_{600}=0.8$). 600 μ l dieser Zellen wurden mit 55.000 pfu λ *TriplEx2™* gemischt, für 15 min bei 37°C präinkubiert und in verflüssigtem 0,6% NZY-TopAgar (45°C) auf vortemperierte 135 mm LB-Platten ausplattiert. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C wurden die durchlysierten Platten für 4 h bei 4°C durchgekühlt und Doppel-Filterabdrücke mit *Hybond N* Nylonmembranen (Amersham Biosciences, Freiburg) angefertigt. Die Filter wurden mit der Phagenseite nach oben getrocknet, auf *Whatman*-Papier 5 min denaturiert (0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl), 5 min neutralisiert (1,5 M NaCl, 0,5 M Tris-HCl, pH 7.0), für 10 min auf 2xSSC äquilibriert und zum Fixieren der Phagen-DNA beidseitig mit 1.200 μ J/cm² UV-Licht bestrahlt.

Zur Identifizierung von Phagenpartikeln mit Sonden-homologen cDNA-Insertionen wurden die Doppel-Filterabdrücke bei 68°C prähybridisiert, mit digoxigeninmarkierten Sonden (2.2.3.3.1) hybridisiert, gewaschen und detektiert (2.2.3.4). Aus den Plattenbereichen, die in den Chemiluminogrammen beider Filterabdrücke ein Signal gaben, wurden die Phagen ausgestochen und in SM-Puffer überführt. Durch wiederholtes Durchmustern konnten Pha-

genklone aus den Phagen-Populationen vereinzelt werden, die die gewünschte cDNA-Insertion trugen. Die Überführung der cDNA-Insertionen isolierter Phagenklone in *E.coli* wird in Abschnitt 2.2.8.2 erläutert.

2.2.8.2. Konversion von isolierten λ *TriplEx2*TM-Phagen in Plasmide

Die Überführung der cDNA-Insertion eines vereinzelt, rekombinanten λ *TriplEx2*TM-Phagen in *E.coli* Zellen des Stammes *BM25.8* als Plasmid wurde nach dem Protokoll des *SMART*TM *cDNA Library Construction Kit* (BD BIOSCIENCES, 2001^b) durchgeführt. Die Konversion erfolgt über *Cre* Rekombinase vermittelte spezifische Rekombination an *loxP*-Stellen nach Phageninfektion einer *BM25.8*-Zelle. Beim Entlassen der Phagen-DNA in die *E.coli*-Zellen entsteht durch Zirkularisierung das Plasmid *pTriplEx2*TM, das die inserierte cDNA trägt und sequenziert werden kann (2.2.13).

2.2.9. Analyse einer genomischen Bibliothek

Zur Herleitung der genomischen Sequenz des *ZmPti1*-Gens wurde eine genomische Bibliothek λ *Fix*^{®II} (Stratagene, Heidelberg) der Maislinie *LineC* durchmustert.

2.2.9.1. Durchmusterung einer genomischen Bank mit spezifischen Sonden

Die Durchmusterung der genomischen *LineC* Bibliothek erfolgte mit insgesamt 1 Million Phagenpartikeln mit einer radioaktiv markierten Sonde (2.2.3.3.2). Für den λ *Fix*^{®II} Phagen wurde als Wirt der *E.coli*-Stamm *XL1-Blue MRA (P2)* (Stratagene, Heidelberg) eingesetzt. Die Infektion des Wirtes mit rekombinanten Phagen erfolgte wie in Abschnitt 2.2.8.1 angegeben. Zur Durchmusterung der genomischen Bibliothek wurden in der ersten Runde Einzelfilterabzüge mit *Hybond ECL* Nitrocellulosemembranen (Amersham Biosciences, Freiburg) angefertigt, die wie in Abschnitt 2.2.8.1 beschrieben für die Prähybridisierung vorbereitet wurden. Die Prähybridisierung und Hybridisierung mit radioaktiv markierten Sonden (2.2.3.3.2) erfolgte bei 68°C entsprechend dem *Northern* Protokoll (2.2.4.3). Aus den Plattenbereichen, die im Autoradiogramm ein Signal gaben, wurden die Phagen ausgestochen und in SM-Puffer überführt. Vor der weiteren nicht-radioaktiven Durchmusterung dieser Phagenpopulationen wurde ein *PCR*-basierter Vortest (2.2.9.2) durchgeführt, in dem aus 18 Phagenpopulationen zwei identifiziert wurden, die die gewünschte Insertion enthielten. Diese wurden wie in Abschnitt (2.2.8.1) beschrieben vereinzelt und analysiert (2.2.9.3).

2.2.9.2. Vortest isolierter Phagen-Populationen durch PCR

Vor dem Vereinzeln von Phagenklonen durch wiederholte Durchmusterung mit spezifischen Sonden (2.2.9.1) wurden Phagenpopulation aus der ersten *Screening*-Runde mittels PCR analysiert. Dabei wurden die Phagenpopulationen identifiziert, die rekombinante Phagen mit der gewünschten DNA-Insertion beinhalteten.

In dem *touch-down* PCR-Ansatz wurden rekombinante Phagenpopulationen mit unterschiedlichen *ZmPti1*-cDNA-spezifischen Primern auf die Insertion korrespondierender *ZmPti1*-Genbereiche hin geprüft. In einem 50 µl Standard-PCR Ansatz wurden je 5 µl der 500 µl-Phagenstocks (isolierter Agar-Plattenbereich in SM-Puffer) als *template* eingesetzt. Zum Aufschluss der Phagen wurde für 10 min bei 95°C inkubiert und nach Zugabe von 2,5 U *Taq*-Polymerase (MBI Fermentas, St. Leon-Roth) mit *Annealing*-Temperaturen von 60°-55°C amplifiziert (2.2.3.2). Nach Analyse der PCR-Amplifikate in ethidiumbromidgefärbten Agarosegel konnten die Phagenpopulationen identifiziert werden, die zur Vereinzelnung des *ZmPti1*-Phagenklons in weiteren *Screening*-Runden eingesetzt wurden (2.2.9.1).

2.2.9.3. Isolierung von Phagen-DNA

Phagen-DNA wurde aus Phagenklonen mit den Methoden nach LEE und CLARK (1997), SU *et al.*, (1998) und HARRY (2002) sowie nach Herstellerangaben mit dem *QIAGEN Lambda Kit* (Qiagen, Hilden) und *Nucleobond AX* (Macherey und Nagel, Düren) präpariert. Häufig auftretende Probleme, wie geringe DNA-Ausbeute oder schlechte Restringierbarkeit der erhaltenen Phagen-DNA, konnten von keiner Methode befriedigend gelöst werden. Aus amplifizierten, PEG-gefällten Phagen konnte nach Aufreinigung im Cäsiumchloridgradienten hochwertige Phagen-DNA isoliert werden (SAMBROOK *et al.*, 1989).

2.2.9.4. Southern Analyse von Phagen-DNA

Die *Southern* Analyse der restringierten Phagen-DNA aus isolierten genomischen λ *Fix*^{®II} Phagen (2.2.9.3) erfolgte mit digoxigeninmarkierten Sonden-Fragmenten (2.2.3.3.1). Hierzu wurde 1 µg Phagen-DNA mit je 10 Einheiten unterschiedlicher Endonukleasen für 5 h bei 37°C vollständig verdaut und in einem 0,8%igen Agarosegel aufgetrennt. Die Durchführung des Kapillarblots der aufgetrennten DNA-Fragmente und deren Detektion sind in 2.2.3.4 erläutert.

2.2.9.5. *inverse PCR* zur Amplifikation unbekannter DNA-Bereiche

Für die Durchführung der in Abb. 2-2 schematisch dargestellten *iPCR*-Methode (HARTL und OCHMANN, 1996) wurden 15 ng Phagen-DNA im 20 µl Ansatz über Nacht bei 37°C mit 10 U einer Endonuklease verdaut. Nach Inaktivierung der Endonuklease (20 min, 80°C) und Phenol:Chloroform-Extraktion wurde die restringierte Phagen-DNA in einem 150 µl Ligationsansatz mit 10 U T4-Ligase über Nacht bei 4°C religiert. Nach Inaktivierung der Ligase (15 min, 75°C) wurde 1 µl des Ligationsansatzes in einem 40 µl Ansatz mit 0,8 U des *Advantage*[®] 2 *Polymerase Mixes* (BD Biosciences, Freiburg) per *touch down PCR* mit *Annealing*-Temperaturen von 64°C bis 56°C amplifiziert (2.2.3.2). Für die erfolgreiche Anwendung dieser Methode ist es essentiell, dass die verwendete Endonuklease (hier *Pst*I) nicht zwischen den beiden Primerbindestellen (hier *PRMMH75/62*) schneidet.

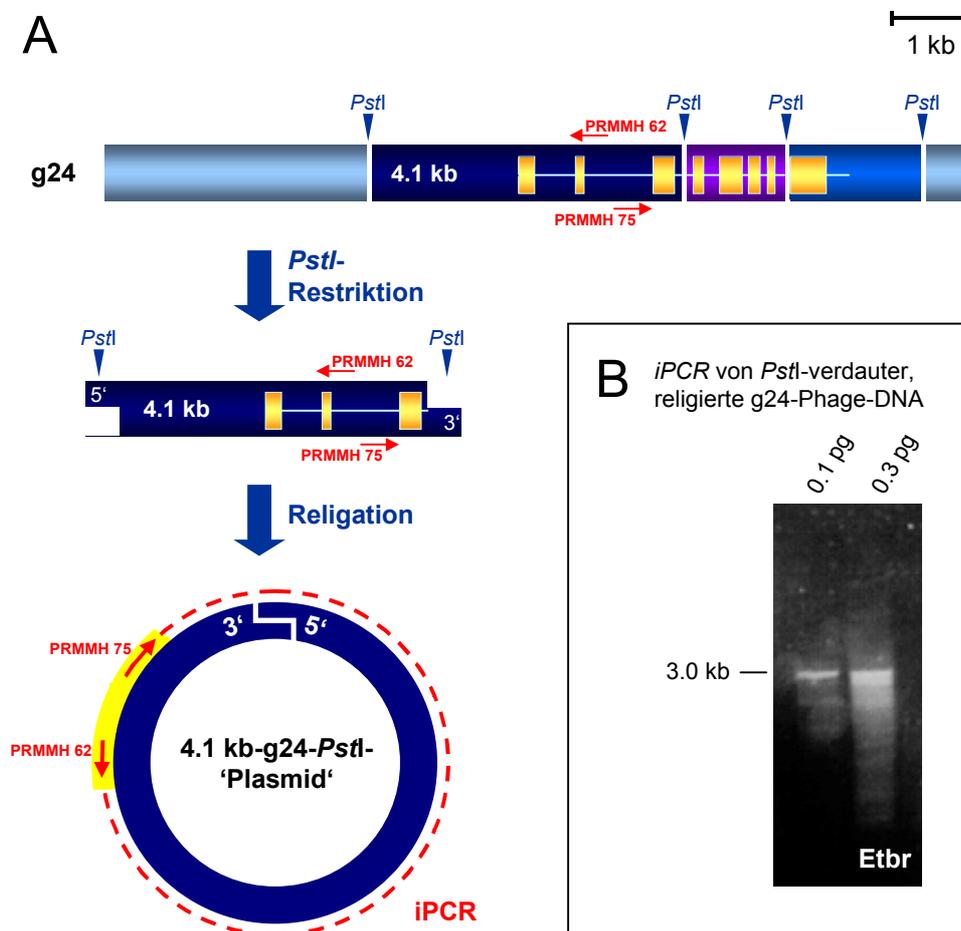


Abb. 2-2: Inverse PCR zur Amplifikation der *ZmPti1*-Promotor- und 5'UTR-Region

A Darstellung der *Pst*I-Restriktionsfragmente des Phagenklons g24 mit Bereichen des *ZmPti1*-Gens (vgl. Abschnitt 3.2.3.1, Abb. 3-7). Zur besseren Übersicht ist die später ermittelte Exon/Intron Struktur (Abb. 3-8) des *ZmPti1*-Gens eingezeichnet. Die beiden für die *iPCR* verwendeten Primer *PRMMH75* (Ende Intron 2) und *PRMMH62* (Anfang Exon 2) sind angegeben. 15 ng *Pst*I-restringierte Phagen-DNA des Klons g24 wurde nach Verdünnung ligiert. Von den z.T. mit sich selbst ligierten, zirkulären *Pst*I-Fragmenten [4,1kb *Pst*I-'Plasmid'] können DNA-Bereiche jenseits des bekannten Bereichs (gelb) per *PCR* amplifiziert werden.

B Ethidiumbromid-gefärbtes Agarosegel mit *iPCR*-Fragmenten einer erwarteten Länge von etwa 3,0 kb. Als Template für die *iPCR* wurden 0,1 und 0,3 pg der *Pst*I-verdauten und anschließend religierten DNA des Phagenklons g24 eingesetzt.

2.2.10. Herstellung von Dauerkulturen

Zur langfristigen Aufbewahrung von lebensfähigen Bakterien und infektiösen Phagen wurden Dauerkulturen hergestellt, die bei -70°C gelagert wurden.

Gefrierkulturen von Phagen

500 μl des SM-Puffer-Stocks einzelner Phagen oder Phagenpopulationen wurden mit 35 μl DMSO versetzt, gemischt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

Gefrierkulturen von Bakterien

Über Nacht bei 37°C angezogene Bakterienkulturen wurden mit 1 Volumen *2xFreeze Mix* (0,2 M KNaH_2PO_4 , pH 7.0, 1% (w/v) Hefeextrakt, 10% (v/v) DMSO, 10% (v/v) Glycerin) versetzt, gründlich gemischt und in flüssigem Stickstoff tiefgefroren.

2.2.11. Herstellung kompetenter Zellen und Transformation

Kompetente *E.coli*-Zellen wurden nach INOUE *et al.* (1990) hergestellt: 250 ml SOB-Medium (2% (w/v) Bactotryptone, 0,5% (w/v) Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl_2 , 10 mM MgSO_4) wurden in einem 2 l-Erlenmeyerkolben mit 1 ml einer Bakterien-Röhrchenkultur angeimpft und über Nacht bei 18°C und 200-220 rpm bis zu einer maximalen OD_{600} von 0.6 angezogen. Die Zellen wurden vor der Ernte 10 min schüttelnd auf Eis inkubiert, für 10 min bei 4°C und $2.500\times g$ in einem vorgekühlten Zentrifugenbecher abzentrifugiert und das Pellet in 80 ml eiskaltem TB-Puffer (10 mM Pipes, 15 mM CaCl_2 , 250 mM KCl, 55 mM MnCl_2 - alle Komponenten bis auf MnCl_2 mit KOH auf pH 6.7 einstellen, dann erst MnCl_2 zugeben und sterilfiltrieren, bei 4°C lagern) resuspendiert. Abschließend wurde für 10 min im Eisbad inkubiert, abzentrifugiert, das Pellet in 20 ml eiskaltem TB-Puffer resuspendiert und unter Rotieren auf Eis 7% (v/v) DMSO zugegeben. Die kompetenten Zellen wurden zu 250 μl aliquotiert, in Flüssigstickstoff schockgefroren und bei -70°C gelagert.

Für die Transformation kompetenter Zellen wurden 20 μl -Ligationsansätze 10 min bei 70°C inkubiert, mit 50 μl TCM-Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 50 mM CaCl_2 , 10 mM MgCl_2) versetzt, durchmischt und für 30 min auf Eis mit je 100 μl kompetenten Zellen inkubiert. Nach 1-minütigem Hitzeschock bei 42°C im Wasserbad und Abkühlen auf Eis wurde 250 μl LB-Medium zugegeben, 1 h bei 37°C und 180 rpm präinkubiert und der Ansatz auf entsprechende Selektionsplatten ausgespatelt.

2.2.12. Biolistische Transformationen

Bei der biolistischen Transformation nach SANFORD (1990) wurden Goldpartikel, die mit Plasmid-DNA beladen waren, auf Maisgewebe geschossen. Neben der Analyse der transienten Expression von Genkonstrukten in verschiedenen Geweben konnten stabil transformierte Pflanzen aus dem Beschuss embryogener Kalluskulturen regeneriert werden (BRETTSCHEIDER *et al.*, 1997; BECKER *et al.*, 1994).

2.2.12.1. Herstellung stabil transformierter Maispflanzen

Zur Funktionsanalyse des *ZmPti1*-Gens wurden Maispflanzen erzeugt, deren endogenes *ZmPti1*-Gen funktionell über einen *post-transcriptional-gene-silencing* Ansatz (PTGS) ausgeschaltet werden sollte. Hierzu wurden embryogene Kalluskulturen mit dem beschriebenen PTGS-Konstrukt (3.3.4.3.1.) biolistisch stabil transformiert und transgene Maispflanzen regeneriert (SANFORD, 1990; BRETTSCHEIDER *et al.*, 1997; BECKER *et al.*, 1994). Außerdem wurden die Promotor-Reportergen-Konstrukte aus der transienten Analyse der *ZmPti1*-Promotoraktivität und -Gewebspezifität (3.3.2.2., 2.2.12.2) zur stabilen Transformation eingesetzt. Die Herstellung stabil transformierter Maispflanzen wurde freundlicherweise von Dr. Reinhold Brettschneider, Katja Müller und Dagmar Stang²¹ durchgeführt. Unreife, circa 12 Tage alte, Maisembryonen der Hybridlinie *A188 x H99* mit einer Größe von 1,0-1,5 mm wurden steril isoliert und für 4 bis 12 Tage mit der Skutellumseite nach oben auf N6-Medium (D'HALLUIN *et al.*, 1992) kultiviert, das mit 1 mg/l 2,4-Dichlorophenoxyessigsäure (2,4-D) und 0,6% (w/v) Phytigel angepaßt war. Vier Stunden vor der biolistischen Transformation und 20 bis 24 Stunden danach erfolgte die Inkubation der Embryonen auf MSC-Medium (ZHONG *et al.*, 1992), dessen osmotischer Wert mit Sucrose auf 670 mOsm/kg erhöht wurde. Der Beschuss der Embryonen wurde mit der *PDS 1000/He gun* der Firma Bio-Rad Laboratories (München) mit 0,4-0,8 µm großen Goldpartikeln (Heraeus, Karlsruhe) durchgeführt und erfolgte nach Herstellerangaben, modifiziert nach BECKER *et al.* (1994):

Parameter des Partikelbeschusses

Abstände zwischen den einzelnen Komponenten

Berstscheibe und <i>Macrocarrier</i>	25 mm
<i>Macrocarrier</i> und Stopnetz	8 mm
Stopnetz und Zielgewebe	55 mm
Gasdruck	1.350 psi
Vakuum	28 inch Hg
Größe der Goldpartikel Ø	0,4 - 0,8 µm
Goldmenge je Schuß	~ 50 µg

²¹ Biozentrum Klein Flottbek und Botanischer Garten, Universität Hamburg

Vor der Fällung der Plasmid-DNA auf das Gold wurden 100 mg Goldpartikel dreimal in je 2 ml Ethanol durch *vortexen* gewaschen und jeweils für 10 sec bei 10.000xg abzentrifugiert. Die Waschschrte wurden zweimal mit je 2 ml Wasser wiederholt. Das Gold wurde in 2 ml Wasser im Schallwasserbad gut resuspendiert, zu je 2,5 mg (ausreichend für 48 Schuß) aliquotiert und stand so für die Fällung der Plasmid-DNA zur Verfügung bzw. konnte bei -20°C gelagert werden.

2,5 µg Plasmid-DNA der eingangs erwähnten Genkonstrukte wurden mit 2,5 µg Plasmid-DNA des Selektionskonstrukts p35S:pat gemischt und zu einem 2,5 mg-Gold-Aliquot gegeben. Nach Durchmischen wurden in den Deckel des Reaktionsgefäßes 50 µl 2,5 M CaCl₂ und 20 µl 0,1 M Spermidin vorgelegt. Durch Schließen des Deckels und sofortigem *Vortexen* für 2 min wurden die Plasmid-DNAs auf die Goldpartikel gefällt. Nach 10-sekündiger Zentrifugation bei 10.000xg wurde das Pellet mit 250 µl Ethanol gewaschen und schließlich in 240 µl Ethanol aufgenommen. Nach gründlichem *Vortexen* wurde im Schallwasserbad für 1-2 sec resuspendiert. Je Schuss wurden 5 µl der DNA-beladenen Goldpartikel-Suspension auf einen *Macrocarrier* aufgebracht und der Beschuss des Zielgewebes durchgeführt.

Zur Selektion transformierter Pflanzen wurden die Embryonen nach der 20-24-stündigen Behandlung auf osmotisch angepaßtem MSC-Medium (s.o.) für zwei Wochen zur Kallusbildung auf N6-Medium mit 1 mg/l 2,4-D kultiviert. Im Anschluss erfolgte für weitere zwei Wochen die Selektion erfolgreich transformierter Kalli auf N6-Medium (ohne Casaminohydrolysat) mit 5 mg/l Phosphinotrycin (PPT). Nach weiteren zwei Wochen Inkubation auf MS-Medium mit 1 mg/ml 2,4-D und 1 mg/l PPT wurden die embryogenen Kalli für die Regeneration auf MS-Medium mit 1 mg/l PPT überführt und bei 24°C mit 16 h Licht kultiviert. Keimlinge wurden in Magenta-Boxen mit halbfestem 0,4% (w/v) Agarose MS-Medium mit 1 mg/l PPT überführt. Nach der Ausbildung von Wurzeln wurden Keimlinge von 6-8 cm Größe in Anzuchterde überführt und im Gewächshaus unter einem Glasdeckel (zur Reduktion des Wasserverlustes durch Transpiration) kultiviert. Regenerate von 20-40 cm Größe wurden zur Bestätigung der Selektion zweimal in vier Tagen mit einer *Basta*-Lösung (250 mg/l PPT, 0,1% (v/v) Tween[®] 20) gesprüht. Pflanzen, die nach der Behandlung keine Nekrosen bildeten, wurden großgezogen und in *Southern* Analysen (2.2.3.5) weiter analysiert.

2.2.12.2. Transiente Transformation von Maisgeweben

Durch die transiente Transformation von Geweben mit Promotor-Reporter-Gen-Konstrukten (3.3.2.2.) wurden die korrespondierenden Promotoren und Promotorbereiche auf ihre Gewebsspezifität und Aktivität hin untersucht.

2.2.12.2.1. Transiente Transformation von *in vitro* keimendem Maispollen

Zur transienten biologischen Transformation von *in vitro* keimendem Maispollen wurde Pollen der Linie A188 gleichmäßig auf 1xPGM Keimplatten ausgebracht (2.2.2.1) und unmittelbar zum Beschuss eingesetzt. Es wurden sechs Paralleltransformationen je Promotor-Reporter-Gen-Konstrukt durchgeführt. Dazu wurden 25 µl (1,25 mg) gewaschene Goldpartikel (2.2.12.1) mit insgesamt 3 µg Plasmid-DNA des jeweiligen Promotor-Reporter-Gen-Konstrukts beladen. Sollten die keimenden Pollen für die quantitative Bestimmung der GUS-Aktivität (2.2.12.3.2) eingesetzt werden, wurden zusätzlich 3 µg Plasmid-DNA des *Luciferase*-Reporter-Gen-Konstrukts (pUbi:Luc:nos) auf die Goldpartikel gefällt. Die Goldpartikel wurden zunächst mit der Plasmid-DNA gemischt und zur Fällung der DNA 25 µl 2,5 M CaCl₂ und 10 µl 0,1 M Spermidin in den Deckel des Reaktionsgefäßes vorgelegt. Beim Schließen wurde der Fällungsansatz sofort für 2 min *gevoxt*. Nach Abzentrifugation (10 sec, 10.000xg) wurden die Goldpartikel mit 125 µl Ethanol gewaschen, in 65 µl Ethanol aufgenommen, gründlich *gevoxt* und zum vollständigen Resuspendieren der Partikel 1-2 sec im Schallwasserbad inkubiert. Je Schuss wurden 10 µl des Fällungsansatzes auf einen *Macrocarrier* vorgelegt. Der Goldpartikel-Beschuss erfolgte nach Herstellerangaben mit der *PDS 1000/He gun* der Firma Bio-Rad Laboratories (München) modifiziert nach SCHREIBER *et al.* (2003) mit folgenden Parametern:

Parameter des Partikel-Beschusses

Abstände zwischen den einzelnen Komponenten

Berstscheibe und <i>Macrocarrier</i>	20 mm
<i>Macrocarrier</i> und Stopnetz	15 mm
Stopnetz und Zielgewebe	55 mm
Gasdruck	1.550 psi
Vakuum	28 inch Hg
Größe der Goldpartikel Ø	0,3 - 3,0 µm
Goldmenge je Schuß	~ 200 µg

Nach dem Beschuss wurden die Platten mit keimenden Pollen über Nacht bei RT inkubiert. Am Folgetag erfolgte entweder der histochemische GUS-Nachweis (2.2.12.3.1) oder die quantitative Bestimmung der GUS-Aktivität (2.2.12.3.2).

2.2.12.2.2. Transiente Transformation von Maisembryonen

Zur transienten biolistischen Transformation wurden Maisembryonen 10 Tage nach Befruchtung (*A188 x H99*) steril präpariert und mit der Skutellumseite nach oben auf MS-Medium ausgelegt. Je Platte wurden 15 Embryonen mit Plasmid-DNA-beladenen Goldpartikeln beschossen. Der Fällungsansatz und die Beschußparameter entsprachen denen der transienten Transformation von *in vitro* keimenden Pollen (2.2.12.2.1), der Gasdruck betrug jedoch nur 1.350 psi.

2.2.12.3. Analyse transient transformierter Maisgewebe

Die Expressionsstärke und -spezifität der Promotoren in Promotor-Reporter-Gen-Konstrukten mit dem *uidA*-Gen als Reporter-Gen wurden indirekt über den Nachweis der Aktivität der β -*Glucuronidase* (GUS), dem *uidA*-Genprodukt, bestimmt.

Die qualitative Bestimmung der GUS-Aktivität in unterschiedlichen Geweben erfolgte über einen histochemischen GUS-Nachweis (2.2.12.3.1). Quantitative Nachweise der GUS-Aktivität in *in vitro* keimenden Maispollen wurden luminometrisch durchgeführt (2.2.12.3.2).

2.2.12.3.1. Histochemischer GUS-Nachweis

Für den histochemischen Nachweis der GUS-Aktivität in transient transformierten Geweben (2.2.12.2) wurden diese einen Tag nach der Transformation mit X-Gluc-Färbelösung überschichtet und bei 37°C inkubiert (MCCABE *et al.*, 1988). Transient transformierte Maisembryonen (2.2.12.2.2) wurden für 24 h gefärbt und anschließend eingescannt. Die Färbung in Pollen und Pollenschläuchen transient transformierter *in vitro* keimender Pollen (2.2.12.2.1) erfolgte für 6 h. Die durch katalytische Bildung des 5,5'-Dibromo-4,4'-Dichloro-Indigo auftretende Blaufärbung wurde fotografisch dokumentiert.

2.2.12.3.2. Quantitative Bestimmung der GUS- und Luciferase-Aktivität

Zur quantitativen Bestimmung der GUS- und *Luciferase*-Aktivitäten von transient transformierten *in vitro* keimenden Pollen (2.2.12.2.1) wurde das Gewebe nach über-Nacht-Inkubation bei RT mit einer Rasierklinge von den PGM-Platten abgekratzt und auf Eis in vorgekühlte 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Nach der Zugabe von 200 μ l EGL-Puffer (0,1 KPO₄ pH 7,8, 1 mM EDTA, 10 mM DTT, 5% (v/v) Glycerol) wurden die Proben mit einem Dispergierwerkzeug für 30 sec homogenisiert und zelluläre Bestandteile anschließend 10 min bei 4°C und 10.000xg abzentrifugiert. Die Überstände wurden erneut zentrifugiert und die geklärten Proteinlysate für die luminometrische Aktivitätsbestimmung der β -*Glucuronidase* und *Luciferase* im Luminometer *Lumat LB 9501* (EG&G Berthold, Australien) eingesetzt:

Instrumentenparameter Lumat LB 9501

Meßdauer	10 s / 1 min
Anzahl der Messungen	1
Verzögerung Injektion/Messung	0 sec
Injektionsdauer	1,2 sec
Kalkulationsfaktor RLU	1.000
Maximaler Hintergrund (RLU/s)	50

Zur luminometrischen Bestimmung der *Luciferase*-Aktivität wurden 20 µl des geklärten Proteinextrakts bei RT für 1 min präinkubiert und im Luminometer automatisch mit *Luciferase Assay Reagent* (Promega, Mannheim) versetzt. Bei der katalytischen Umsetzung des Luciferin-Substrats in Oxyluciferin durch die *Luciferase* wird Licht emittiert. Diese Lichtemission wurde für 1 min gemessen und als relative Lichteinheiten (RLUs) ausgegeben.

Die luminometrische Bestimmung der GUS-Aktivität erfolgte mit dem *Gus-light™ chemiluminescent reporter gene assay system* (Applied Biosystems, Darmstadt). 10 µl Proteinlysate wurden mit 90 µl einer 1:100 Substratverdünnung versetzt und 15 min bei RT inkubiert. Als Substrat diente Glucuron, dessen katalytische Umsetzung durch die *β-Glucuronidase* nach automatische Zugabe des *Accelerators* im Luminometer gemessen wurde. Die aus der *Accelerator*-Zugabe resultierende Lumineszenz wurde 10 sec gemessen und ebenfalls als RLU ausgegeben.

Die Hintergrundaktivität im GUS- und *Luciferase*-Aktivitäts-Test wurde aus unbeschossenen *in vitro* keimenden Pollen ermittelt und von den Meßwerten der transformierten Proben subtrahiert. Meßwerte unter der Hintergrundaktivität wurden bei der Auswertung nicht berücksichtigt. Um die Netto-GUS-Aktivität mit der jeweiligen Transformationseffizienz zu normalisieren, wurden die ermittelten Meßwerte der GUS-Aktivität durch die korrespondierenden Meßwerte der *Luciferase*-Aktivitätsbestimmung geteilt. Die so normalisierten GUS-Aktivitäten (GUS_{norm}) der sechs parallel durchgeführten Transformationen je Konstrukt wurden gemittelt.

$$GUS_{norm} = \frac{GUS - GUS^{Hintergrund}}{Luc - Luc^{Hintergrund}}$$

2.2.13. Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierungen erfolgten nach der Kettenabbruchmethode (SANGER *et al.*, 1977) mit dem *ABI PRISM™ Dye Terminator Cycle Sequencing Kit with AmpliTaq® DNA Polymerase* (Applied Biosystems, Weiterstadt) und einem automatischen Sequenziergerät vom Typ 377A der Firma Applied Biosystems. Der Standardsequenzierungsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

Sequenzierungsansatz

DNA	500 ng
Primer	15 pmol
Big-Dye	3 µl
Half-Term	7 µl
DMSO	0,5 µl
H ₂ O	ad 20 µl

Die Sequenzreaktion erfolgte im Thermocycler *Biometra Uno II* (Whatman-Biometra, Göttingen) mit folgendem *PCR*-Profil: 96°C 2 min, 26 Zyklen (96°C 30 sec, 50°C 15 sec, 60°C 3.5 min), 60°C 10 min. Der 20 µl Sequenzansatz wurde mit 35 µl Ethanol versetzt, durchmischt und bei 18°C, >15.000xg für 25 min zentrifugiert. Der Überstand wurde mit einer ausgezogenen Pasteurpipette abgenommen und das Pellet 20 min bei RT getrocknet. Die Gelläufe sowie deren Auswertung wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Wienand²² durchgeführt.

²² Biozentrum Klein Flottbek und Botanischer Garten, Universität Hamburg

2.2.14. Computergestützte Auswertung und Analyse

Die Sequenzdaten wurden mit den folgenden Programmen verarbeitet, ediert und *online* mit den aktuellsten Versionen der Datenbanken dEST, EMBL, Genbank, PIR, PROSITE, SWISS-PROT und TrEMBL verglichen:

BLAST 2.x (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>; ALTSCHUL *et al.*, 1997)

BCM Search Launcher (<http://www.hgsc.bcm.tmc.edu/SearchLauncher>; WORLEY *et al.*, 1998; SMITH *et al.*, 1996; WORLEY *et al.*, 1995)

Dragon Promotor Finder 1.3 (http://sdmc.i2r.a-star.edu.sg/promoter/promoter1_4/DPF.htm, Infocomm Research 2002)

GeneDoc (NICHOLAS und NICHOLAS, 1997)

Graphical Codon Usage Analyser (<http://http.gcu.schoedl.de/>, FUHRMANN *et al.*, 2003)

ExpASy Server (<http://tw.expasy.org/>; GASTEIGER *et al.*, 2003)

PredictProtein 1.99.08 (<http://cubic.bioc.columbia.edu>, ROST, 1996)

Prosite 99.07 (<http://www.expasy.ch/prosite/>, HOFMANN *et al.*, 1999)

SignalP 1.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>, NIELSEN *et al.*, 1999)

Softberry Inc. (<http://www.softberry.com/berry.phtml>)

Webcutter 2.0 (<http://www.firstmarket.com/cutter/cut2.html>, HEIMAN, M., 1997)

WinGene 1.0 (HENNING, L., 1999)

WinPep 1.22 (HENNING, L., 1999)

Die Auswertung von Autoradiografiesignalen erfolgte densitometrisch mit dem Programm *PCBAS 2.09g* (raytest Isotopenmeßgeräte GmbH) nach Einlesen der Autoradiogramme mit handelsüblichen *Scannern*.

3. Ergebnisse

3.1. Identifizierung von differentiell exprimierten Genen bei Mais, die an der Pollenentwicklung und -fertilität beteiligt sind

Für die Charakterisierung von Genen, die an der Pollenentwicklung und -fertilität beteiligt sind, ist die männlich sterile *white pollen* (*whp*) Mutante bei Mais ein geeignetes Untersuchungsobjekt. Die Sterilität des *whp*-Pollens wird auf eine Flavonoldefizienz aufgrund ausbleibender Expression der Chalkonsynthese während der Pollenentwicklung zurückgeführt (POLLAK *et al.*, 1995). Ob diese Flavonoldefizienz in der *whp*-Mutante Auswirkungen auf die Expression weiterer, möglicherweise für die Fertilität des Pollens essentieller Gene hat wurde näher untersucht. Mögliche Unterschiede im Genexpressionsmuster können durch subtraktive Hybridisierungen von cDNA-Populationen aus Pollen des fertilen *Wildtyps* (*wt*) und der sterilen *whp*-Mutante identifiziert werden.

3.1.1. Subtraktive Hybridisierung

Um in zwei mRNA-Populationen differentiell exprimierte Transkripte zu identifizieren, werden beide mRNA-Populationen zunächst in cDNAs überschrieben. Die cDNA Population, in der nach differentiell exprimierten Transkripten gesucht werden soll, wird als *tester* oder *target* bezeichnet, die Referenz-cDNA-Population bezeichnet man als *driver*. In der Regel erhält die *driver*-Population eine molekulare Markierung, z.B. durch Biotin (BUCHANAN-WOLLASTON und AINSWORTH, 1997). Zusätzlich oder alternativ kann eine selektive Amplifikation *tester*-spezifischer cDNAs erfolgen (BD BIOSCIENCES, 2000).

Im Anschluss an eine Hybridisierung homologer *tester*- und *driver*-cDNAs können mit Hilfe der Markierung cDNA-Hybride aus *tester*- und *driver*-cDNAs sowie verbliebene *driver*-cDNAs aus dem Gemisch entfernt werden. Danach können nicht hybridisierte *tester*-cDNAs mittels *PCR* spezifisch angereichert werden.

Um Transkripte zu identifizieren, die für die Fertilität des *Wildtyp*-Pollens essentiell sind und möglicherweise aufgrund der Flavonoldefizienz im sterilen *whp*-Pollen nicht exprimiert werden, wurde folgender Subtraktionsansatz konzipiert:

Als *tester*- Population wurden cDNAs (2.2.6.) aus RNAs (2.2.4.1.) von 10 min *in vitro* gekeimtem reifen Pollen (2.2.2.1.) des fertilen *Wildtyps*²³ verwendet. Als *driver*-Population

²³ *Wildtyp*-Genotyp: *C₂/c₂whp/whp* bzw. *C₂/C₂whp/whp* (flavonolhaltig → fertil)

dienten cDNAs, die aus mRNAs von 10 min *in vitro* gekeimtem reifen Pollen der männlich sterilen *white pollen*²⁴-Mutante gewonnen wurden.

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten beiden Subtraktionsmethoden nach BUCHANAN-WOLLASTON und AINSWORTH (1997), modifiziert nach LORBIECKE und SAUTER (2002), und BD BIOSCIENCES (2000) werden im folgenden dargestellt.

3.1.2. Subtraktive Hybridisierung nach BUCHANAN-WOLLASTON und AINSWORTH

Nach der cDNA-Synthese aus mRNAs *in vitro* gekeimter reifer Pollen des *Wildtyps* und der *whp*-Mutante wurden die korrespondierenden cDNAs mit den Endonukleasen *AluI* und *RsaI* geschnitten (2.2.7.1.). An die resultierenden, 50 bp bis 500 bp großen, cDNA-Fragmente wurden entsprechende *tester*⁻²⁵ bzw. *driver*⁻²⁶ Adaptoren ligiert. Diese Adaptoren erlauben die spezifische Amplifikation der *tester* oder *driver*-cDNA-Population. Die *PCR*-Amplifikation der *tester*-cDNAs erfolgte mit der Adaptorkomponente *T1*, die der *driver*-cDNAs mit dem 5' Biotin-markierten *D1*-homologen Primer *D3*²⁷. In sechs aufeinanderfolgenden Hybridisierungsrunden wurden cDNAs der *tester*-Population jeweils mit einem fünf- bis zehnfachen Überschuss der Biotin-markierten *driver*-cDNAs hybridisiert. Die resultierenden *tester/driver*-cDNA-Hybride sowie überschüssige *driver*-cDNAs wurden dann mittels Streptavidin beschichteten, paramagnetischen Partikeln (Dynal, Hamburg) aus dem Gemisch entfernt. Die verbliebenen *tester*-cDNAs wurden spezifisch amplifiziert und in der nächsten Hybridisierungsrunde erneut mit einem Überschuss an biotinylierten *driver*-cDNAs versetzt.

Die angereicherten cDNA-Sequenzen der *tester*-Population wurden nach einem abschließenden *PCR*-Amplifikationsschritt mit der Endonuklease *EcoRI* restringiert, aufgereinigt und subkloniert. 130 der daraus resultierenden Subtraktionsklone wurden über *Dot Blot* Hybridisierungen analysiert (Abb. 3-1).

3.1.2.1. *Dot Blot* Hybridisierung der Subtraktionsklone

Die *Dot Blot* Hybridisierung (2.2.7.1.1.) ermöglicht es, eine relativ große Zahl von erhaltenen Subtraktionsklonen schnell und effizient auf eine differentielle Expression der zugehörigen Gene hin zu untersuchen. Hierzu werden zwei Membranen mit gleichen Mengen *PCR*-amplifizierter Insertionsfragmente der Subtraktionsklone beladen und gegen radioaktiv markierte Sonden aus den *tester*- und *driver*-cDNA-Ausgangspopulationen hybridisiert. Die Expositi-

²⁴ *white pollen*-Genotyp: *c₂/c₂whp/whp* (flavonoldefizient → steril)

²⁵ Adaptor *T1* 5'-CTTCTTGCTTGAATTCGGACTA-3' und Adaptor *T2* 5'-P-TAGTCCGAATTCGAAGCAAGAGCACA-3'

²⁶ Adaptor *D1* 5'-CGGTATCGATAAGCTTGA-3' und Adaptor *D2* 5'-P-TCAAGCTTATCGATACCGCACA-3'

²⁷ Primer *D3* 5'-Biotin-CGGTATCGATAAGCTTGA-3'

onszeiten der Autoradiogramme werden anhand der Hybridisierungssignale, die beide Sonden mit Kontroll-cDNA-Fragmenten konstitutiv exprimierter Gene geben, angeglichen. Danach erlaubt der *in silico* Vergleich der Signalstärken (2.2.14.) Rückschlüsse auf die Expressionsmuster der korrespondierenden Gene in den Ausgangsgeweben der Subtraktion.

92 Subtraktionsklone wurden wie beschrieben analysiert. Die Anpassung der Expositionzeiten beider Membranen und densitometrische Normalisierung der Expositionssignale erfolgte mit Hilfe der internen Kontrolle (GAPDH). Ein Vergleich zwischen den beiden *Dot Blots* (Abb. 3-1) zeigt zehn Subtraktionsklone (D7, D14, D15, D32, D36, D38, D56, D58, D64 und D74), die mit einem Faktor von 2,3 bis 4,2 deutlich stärker mit der *tester*-Sonde hybridisieren. Der Subtraktionsklon D138 zeigt mit der *tester*-Sonde ein schwächeres Signal (Faktor 0,4).

Die aus den *Dot Blot* Hybridisierungen gewonnenen Ergebnisse liefern erste Hinweise auf eine differentielle Expression der von den Subtraktionsklonen repräsentierten Gene. Weiterführende Untersuchungen auf Transkriptionsebene erfolgen in *Northern* Analysen (3.1.2.3).

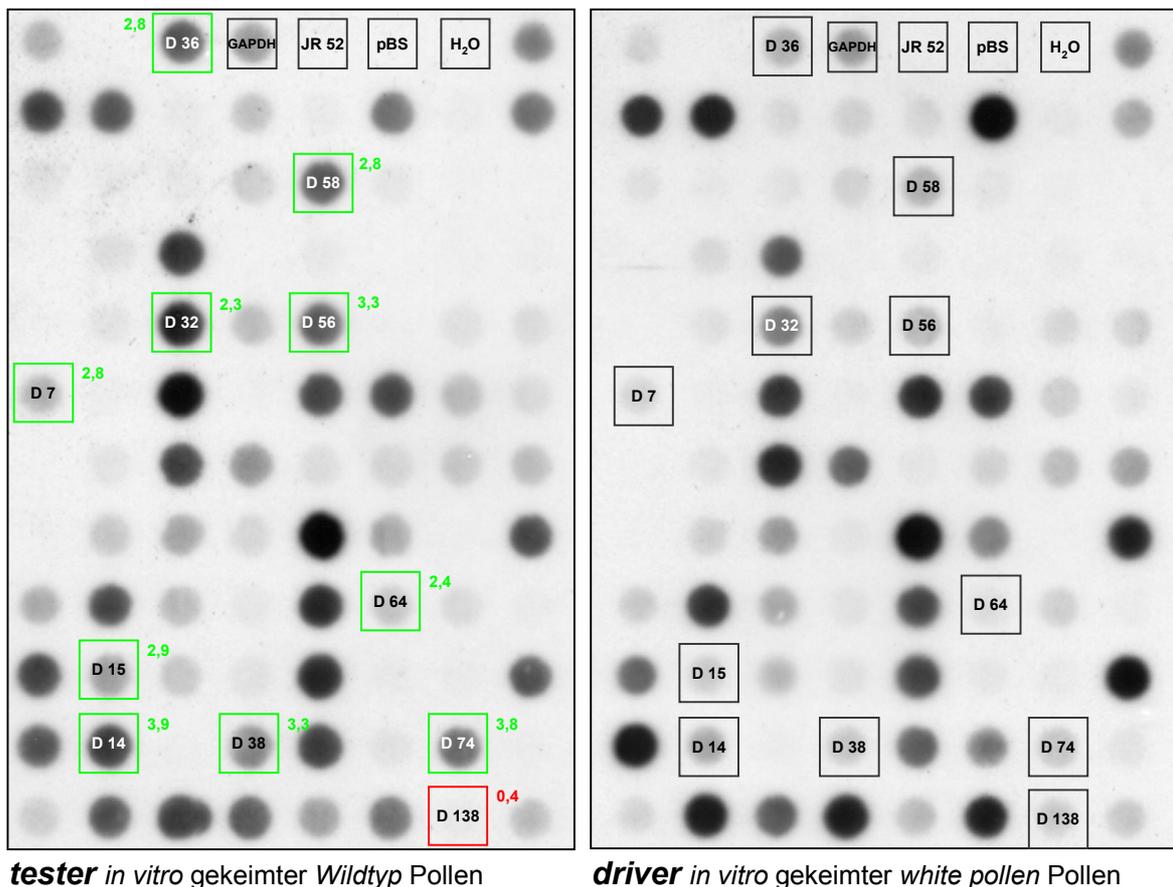


Abb. 3-1: Hybridisierungen von Inserts der Subtraktionsklone mit *tester*- und *driver*-Sonden

cDNA-Inserts auf zwei identisch beladenen Membranen wurden gegen radioaktiv markierte Sonden aus *tester*- und *driver*-cDNAs hybridisiert. Über densitometrische Vergleiche der Signalstärken können Subtraktionsklone identifiziert werden, die differentiel exprimierter Gene repräsentieren. Die hochgestellten Faktoren geben das jeweilige Signalverhältnis an: In grün sind Subtraktionsklone mit erhöhter, in rot mit verringerter Expression im *tester*-Gewebe dargestellt. Die densitometrische Normalisierung der Expressionssignale erfolgte über das Hybridisierungssignal der internen Kontrolle (GAPDH).

3.1.2.2. Sequenzanalysen der identifizierten Subtraktionsklone

Um wiederholte Hybridisierungen mit identischen cDNA-Fragmenten in *Northern* Analysen zu vermeiden, wurden cDNA-Fragmente von Subtraktionsklone mit voraussichtlich differentieller Expression in *wt*- und *whp*-Pollen (Abb. 3-1) zuvor sequenziert (2.2.13.) und durch Datenbankabgleich auf Homologien zu bereits bekannten Sequenzen (2.2.14.) hin untersucht. Die Ergebnisse der Sequenzanalyse und Datenbankrecherchen sind in (Tab. 3-1) wiedergegeben.

Interessanterweise wiesen die abgeleiteten Aminosäuresequenzen von fünf der zehn potentiell differentiell exprimierten Subtraktionsklone (D7, D15, D56, D64 und D74) sowie von weiteren drei Subtraktionsklonen (im *Dot Blot* nicht dargestellt D1, D3 und D4) Homologien zu drei unterschiedlichen Bereichen der in Tomate identifizierten Proteinkinase PTI1 (PTO INTERACTOR 1 [U28007], ZHOU *et al.*, 1995) auf.

Der Klon D2 besitzt auf Aminosäureebene Homologien zu einem Pollenallergen [Z27090] aus *Phleum pratense*, Klon D32 zu einem Signalprotein mit Adenylylcyclase-Aktivität [AJ307886]. Der Klon D10 entspricht einem Bereich eines Actingens aus *Zea mays* [U60511]. Der Subtraktionsklon D58 enthält zwei miteinander artifiziell fusionierte cDNA-Fragmente mit Homologien zu einem Gen unbekannter Funktion aus *Arabidopsis thaliana* [AY064060] sowie zu einem EST aus *Sorghum bicolor* [BF657161]. Klon D36 ist Teil der ribosomalen 25S RNA aus *Zea mays*. Ein im *tester*-Gewebe vergleichsweise schwächer exprimiertes Gen repräsentiert der Subtraktionsklon D138, der eine Homologie zu einem EST aus *Saccharum officinarum* [CA212010] zeigt.

Klon	Homologie
D1 / 4 / 15 / 64	[U28007] <i>Lycopersicon esculentum</i> PTO INTERACTOR 1 (Pti1)
D2	[Z27090] <i>Phleum pratense</i> Pollenallergen
D3 / 7	[U28007] <i>Lycopersicon esculentum</i> PTO INTERACTOR 1 (Pti1)
D10	[U60511] <i>Zea mays</i> Actin
D32	[AJ307886] <i>Zea mays</i> Signalprotein mit Adenylylcyclase Aktivität
D56 / 74	[U28007] <i>Lycopersicon esculentum</i> PTO INTERACTOR 1 (Pti1)
D58	[AY064060] <i>Arabidopsis thaliana</i> unbekanntes Protein [BF657161] <i>Sorghum bicolor</i> EST
D138	[CA212010] <i>Saccharum officinarum</i> EST

Tab. 3-1: Homologien der isolierten Subtraktionsklone oder ihrer abgeleiteten Aminosäuresequenzen zu DNA- und Proteinsequenzen in den Datenbanken

Subtraktionsklone mit identischen Insertionsfragmenten sind gemeinsam aufgeführt. [Accession Nummern] der entsprechenden homologen Sequenzen oder Proteine sind angegeben.

3.1.2.3. Northern und Southern Analysen der identifizierten Subtraktionsklone

Mit *Northern* Analysen (2.2.4.3.) wurde untersucht, ob die identifizierten Subtraktionsklone mit Homologie zum PTI1 aus Tomate tatsächlich ein differentiell exprimiertes Gen repräsentieren. Hierzu wurden in *Northern* Analysen RNAs unterschiedlicher Gewebe und Maisgenotypen eingesetzt und die cDNA-Insertionssequenz des Subtraktionsklons D56 als radioaktiv markierte Sonde (2.2.3.3.2.) verwendet.

Die *Northern* Hybridisierung (Abb. 3-2) zeigt, dass gleiche Mengen *Pti1*-homologer Transkripte im *wt*- als auch im *whp*-Pollen detektiert werden können. Das entspricht nicht den Erwartungen. Durch die Subtraktion sollten gerade cDNA-Sequenzen abgereichert werden, die im *tester*- und *driver*-Gewebe gleich stark exprimierte Transkripte repräsentieren.

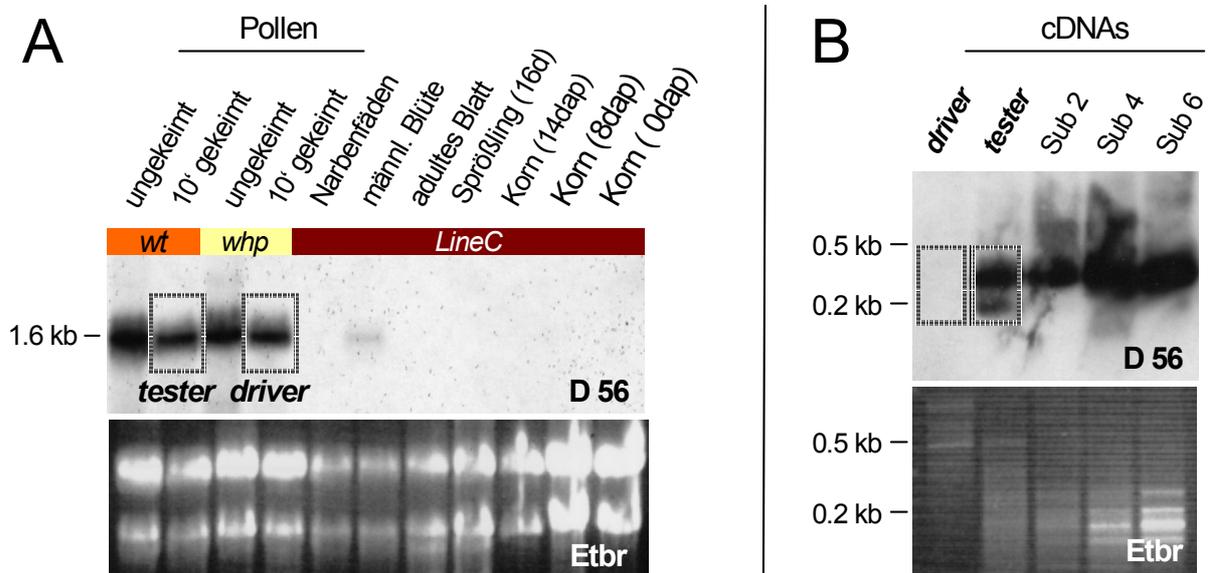


Abb. 3-2: Northern und Southern Hybridisierung mit dem isolierten Subtraktionsklon D56

A *Northern* Hybridisierung von RNAs unterschiedlicher Maisgewebe der angegebenen Genotypen. *Pti1*-homologe Transkripte werden in gekeimten Pollen des *Wildtyp* (*tester*) und des *white pollen* (*driver*) Genotyps sowie schwach in männlichen Blüten der Linie *LineC* detektiert. Die Anwesenheit von D56-homologen Transkripten im *tester*- und *driver* Gewebe hätte in der Subtraktion zu einer Abreicherung der korrespondierenden Sequenzen führen müssen. Das ethidiumbromidgefärbte Gel (Etbr) zeigt nahezu äquivalente Beladung des Gels mit 20 µg Gesamt-RNA je Spur.

B *Southern* Hybridisierung der für die Subtraktion eingesetzten *tester*- und *driver*-cDNA-Populationen sowie der aus den einzelnen Subtraktionsrunden erhaltenen cDNA-Populationen (Sub 2, 4 und 6). Anders als im *Northern* Blot konnten in der korrespondierenden *driver*-cDNA Population keine D56-homologe Sequenzen detektiert werden. Eine Abreicherung D56-homologer Sequenzen bei der Subtraktion konnte daher nicht erfolgen.

Das Ethidiumbromidgefärbte Gel (unten, Etbr) zeigt die Beladung mit je 1 µg cDNAs. Als Sonde im *Northern* und *Southern* Blot wurde das Insertionsfragment des Subtraktionsklons D56 eingesetzt.

Um diesen Widerspruch zu klären, wurden *Southern* Analysen (2.2.3.4.) mit den *tester*- und *driver*-cDNA-Populationen durchgeführt die für die Subtraktion eingesetzt wurden. Als Sonde wurde wiederum das Insertionsfragment des Subtraktionsklons D56 verwendet. Die Hybridisierung zeigt, dass D56-homologe cDNAs nur in der *tester*-, nicht jedoch in der *driver*-cDNA-Population vorliegen (Abb. 3-2B). Hierdurch konnten die entsprechenden *Pti1*-homologen Sequenzen im Verlauf der Subtraktion nicht angereichert werden und verblieben in der Subtraktion. Wie später bei einem Vergleich einer virtuell mit *AluI* und *RsaI* geschnittenen *ZmPti1*-cDNA gezeigt werden konnte, repräsentieren die acht isolierten *AluI/RsaI*-Subtraktionsfragmente (Tab. 3-1) die kurzen Restriktionsfragmente (<230 bp) der *ZmPti1*-cDNA (3.2.1). Zwei theoretisch existierende, größere Restriktionsfragmente konnten hingegen nicht isoliert werden (Abb. 3-3). Analysen, die für die Subtraktion eingesetzten cDNA-Populationen, haben gezeigt, dass in den *driver*-cDNAs kurze cDNAs unterrepräsentiert sind (Abb. 3-2B). So konnten Subtraktionsklone isoliert werden, die nicht-differenziell exprimierte Transkripte repräsentieren.

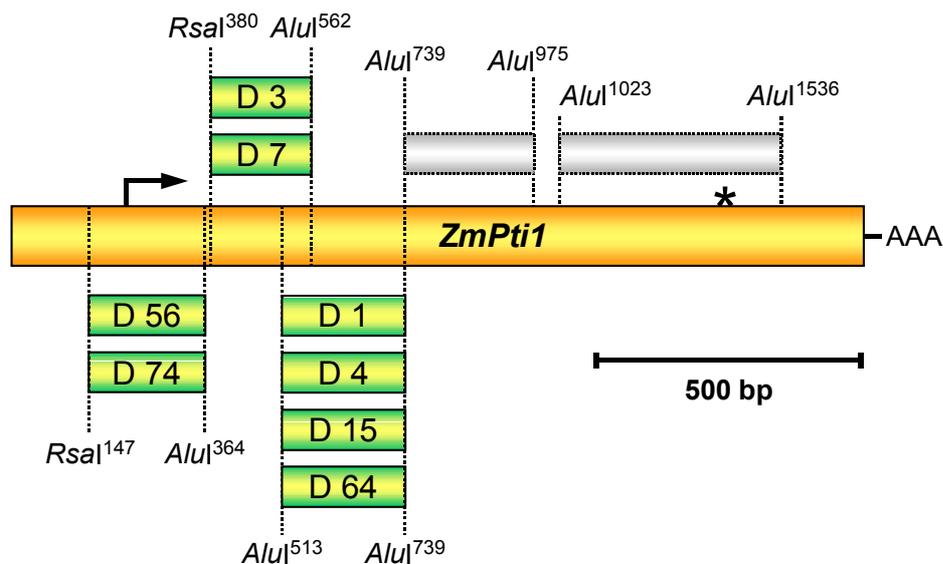


Abb. 3-3: *ZmPti1*-cDNA mit den zugeordneten Insertionsfragmenten der *Pti1*-homologen Subtraktionsklone

Die acht Insertionsfragmente der isolierten *Pti1*-homologen Subtraktionsklone (grün-gelb) können aus dem *AluI/RsaI* Restriktionsmuster der *ZmPti1*-cDNA abgeleitet werden. Sie sind 182, 217 und 226 bp lang. Zwei weitere nicht isolierte, theoretisch auftretende *AluI*-Subtraktionsfragmente (grau, 236 und 513 bp in Länge) sind zusätzlich angegeben. Weitere Erläuterungen im Text.

Alle Fragmente sind entsprechend ihrer jeweiligen Position in der 1,6 kb langen cDNA angeordnet. Nur relevante Schnittstellen sind angegeben, hochgestellte Zahlen geben die Position der Schnittstelle an. Translationsstart (→) und -stop (*) des *ZmPti1*.

3.1.3. Suppressive subtraktive Hybridisierung (BD Biosciences)

Aufgrund der Probleme in der Subtraktionsmethode nach BUCHANAN-WOLLASTON und AINSWORTH (3.1.2) wurde ein methodischer anderer Ansatz zur Identifizierung differentiell exprimierter Gene gewählt: Die suppressive subtraktive Hybridisierung (SSH, 2.2.7.2.) nach BD BIOSCIENCES (2000) mit dem *PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit* (BD Biosciences, Heidelberg). Als Ausgangsmaterial wurden wiederum *tester*- und *driver*-cDNA-Populationen aus RNAs *in vitro* gekeimter *wt*- und *whp*-Pollen synthetisiert.

Bei dieser Methode findet in den ersten Schritten eine Normalisierung der selten und häufig auftretenden Sequenzen in der *tester*-cDNA-Population statt. Gleichzeitig erfolgt die Anreicherung differentiell exprimierter Sequenzen. Dieses hat zur Folge, dass sowohl sehr selten auftretende cDNA-Sequenzen, als auch cDNAs, die zu gering differentiell exprimierten Genen gehören in der Subtraktion verbleiben und nicht abgereichert werden.

Zehn der circa 200 analysierten Subtraktionsklone (2.2.7.2.1.), die putativ differentiell exprimierte Gene repräsentieren, wurden sequenziert (2.2.13.) und in *Northern* Analysen untersucht (2.2.4.3.). Für keinen der zehn untersuchten Klone konnte eine differentielle Expression in den Ausgangsgewebe gezeigt werden.

3.1.4. Fazit aus den subtraktiven Hybridisierungen

Mit den beiden durchgeführten Methoden konnten bei der Subtraktion zwischen *in vitro* gekeimtem Pollen des *Wildtyps* und des *white pollen* Genotyps nicht die gewünschten Ergebnisse erzielt werden.

Dennoch erschienen die aus der Subtraktion nach BUCHANAN-WOLLASTON und AINSWORTH isolierten *Pti1*-homologen Sequenzen, aufgrund der extrem starken und pollenspezifischen Expression des korrespondierenden Gens in Mais (vgl. Abb. 3-2A), als ein besonders interessantes Ziel weiterer Untersuchungen.

3.2. Isolierung eines *Pti1*-homologen Gens *ZmPti1*

Nahezu alle bis dato isolierten Gene der *Pti1*-Familie anderer Pflanzen sind ausschließlich mit der Pathogenabwehr in grünen Geweben assoziiert (1.4.).

Es stellten sich daher folgende Fragen: Handelt es sich bei dem identifizierten *Pti1*-Homologen aus Mais tatsächlich um ein Gen der *Pti1*-Familie? Inwieweit ist eine pollenspezifische Expression mit einer Funktion von *Pti1* bei der Pathogenabwehr vereinbar? Oder spielt Mais-*Pti1* eine Rolle bei der Pollenentwicklung und Pollenfertilität?

Aufgrund dessen wurde die Isolierung einer Mais-*Pti1*-cDNA (*ZmPti1*), eines Mais-*Pti1*-Gens und eine funktionelle Charakterisierung des Genprodukts durchgeführt.

3.2.1. Isolierung einer *Pti1*-homologen cDNA aus Mais

Aus einer mit dem *SMART™ cDNA Library Construction Kit* (BD BIOSCIENCES, 2001) erstellten cDNA Bibliothek (2.2.8.) von 10 min *in vitro* gekeimten *Wildtyp* Pollen²⁸ wurden durch *Plaquescreening* (2.2.8.1.) vier unabhängige Phagenklone isoliert. Als Sonde wurde das Digoxigenin-markierte Insertionsfragment des Subtraktionsklons D56 verwendet (2.2.3.3.1.). Nach Überführen des Phagemids in den Bakterienstamm *BM 25.8* (2.2.8.2.) wurden die Klone analysiert. Alle vier isolierten Klone (cSHD56_1, cSHD56_2, cSHD56_3 [AY554281] und cSHD56_4 [AY554282]) verfügen über etwa 1,6 kb lange cDNA-Insertionen. Da der cDNA-Klon cSHD56_3 die höchste Homologie zur genomischen Sequenz des *Pti1*-Gens (3.2.3.1) aufweist, wird dieser hier exemplarisch dargestellt (Abb. 3-4).

Basenpaar relativ zum Translationsstart +1	Base bei		Aminosäure bei	
	cSHD 56_3	cSHD56_4	cSHD56_3	cSHD56_4
-52	cTc	cCc	außerhalb des ORF	
+145	aTt	aCt	Ile	Ser
+294	Gtg	Atg	Val	Met
+379	gTt	gCt	Val	Ala
+406	gAa	gGa	Glu	Gly
+1282	tCt	tTt	außerhalb des ORF	

Tab. 3-2: Sequenzunterschiede der isolierten *ZmPti1*-cDNA-Klone cSHD56_3 und _4

Angegeben sind Stelle und Art der Unterschiede (Großbuchstaben) der Nukleinsäuresequenz der beiden vollständig sequenzierten *ZmPti1*-cDNA Klone cSHD56_3 und _4 sowie die sich hieraus ergebenden Abweichungen in der abgeleiteten Aminosäuresequenz.

²⁸ Die RNAs für die Herstellung der cDNA-Bibliothek und für die Subtraktion nach BUCHANAN-WOLLASTON und AINSWORTH (3.1.2) waren identisch.

Der Vergleich (2.2.13., 2.2.14.) der beiden vollständig sequenzierten Klone cSHD56_3 und cSHD56_4 ergab einen Unterschied in 6 Basenpaaren sowie eine alternative Polyadenylierungsstelle (Tab. 3-2; Abb. 3-4). Vier dieser Basenunterschiede führen an den entsprechenden Stellen zu Änderungen in der abgeleiteten Aminosäuresequenz. Die anderen beiden liegen außerhalb des offenen Leserasters. Die cDNA des Klons cSHD56_3 ist nach Basenpaar +1.396 polyadenyliert, die des Klons cSHD56_4 nach Basenpaar +1.291.

```

1      gccaggccag gtaaccacaca acacaaggag aaggggaagg gggcgaggg
51     aagggctccg cgctcgcgtcc cttctcttcc tctctctctc tccaacaccc
101    catccatcag cgctgccctc cgcattgctc ttgatccatc cagtacatcg
151    attcTcccc caagatcaaa ggccggagaa ggaggaagaa aggttaggga
201    gtcggccatg ggatgctttt catgctgctg tgtggcagat gacgacaacg
251    ttggcaggag gaagaagcat gacgatccct atgttccat cctgctcat
301    gtttataatt ttggacctag ccggttcca gcccacacc ctgtcatctc
351    caTttggcaga gctcagccaa ttgcagtacc ggccattcat ctggaagagc
401    tgaaggaat tacaataaac ttcagcagtg atgccctcat tggcgagggc
451    tcgtatgccg gagtctatct tgggtgtgctg aaagatggga cgaaatctgc
501    aGtgaagaag cttgactcca gaaacagcc tgatcaagaa ttctttgtgc
551    aggtttcagc tgtctcaaga ttgaagcatg agaatgTtgt ccaactcgtc
601    ggatactgcg ccgAaggag caccgcgctc cttgcttatg agtatgcaac
651    taggggatca ttgcatgata tctccatgg taaaagggt gtgaaaggag
701    cccagccagg gccagtcctg tcatggatgc agcgagctag gattgccgta
751    tgtgctgctc ggggtctcga gttcctccac gagaaggccg atcctcagat
801    ggtccaccgc gacatcaagt caagcaacat actgctcttt gaccatgatg
851    ttgcgaagat cggggacttc gacatctcaa accaggcccc tgacatggct
901    gcgcgcctcc actctactcg cgttcttggc acctttggct accatgcacc
951    agaatatgcc atgactggac agcttagcac gaagagtgat gtctacagct
1001   ttggagttgt gctgctggag cttttaaccg gtcgcaagcc agttgaccac
1051   acactgcccc gtggccagca gaggccttgat acatgggcta caccgaggct
1101   tagtgaagac aaggtgaggc aatgcgctga tccaaggctc ggagacgaat
1151   accctccaaa ggctgtagcc aagatggctg ctgtggccgc cctctgctg
1201   caatacagagg gtgaattccg tccaacatg agcatcgtcg tcaaggctct
1251   gaacccttg ctgcacagcc ggtctggcaa ccgccctact gctcgtcgg
1301   cctcccacgc tgccgagcga tccggactgt gatttctcat cgctgcgaca
1351   actttgggtt cacgaaaaag gaccgtcttg tggagcgttg gtgttgctgt
1401   gtcgtgactg ccaaagcctt ggcgcagaga agagctttgc catgcagctg
1451   tgtattgtaa attgttttgt aagcgatgcg cctcctgggtC tgtgtgccct
1501   gtcatcatcc tattctattc tagaaaatgg tgtacgatgg atcatggatg
1551   ataccaacta tttggtctct tttggaatgc gaaaatgcag cacttggctt
1601   ccgtaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaa

```

Abb. 3-4: Nukleinsäuresequenz der isolierten *ZmPti1*-cDNA des Subtraktionklons cSHD56_3

Der vorhergesagte, 1122 bp lange offene Leserahmen ist grün dargestellt, Start (atg) und Stopcodon (tga) sind angegeben. Positionen, an welchen Abweichungen zwischen den Nukleinsäuresequenzen des dargestellten Klons cSHD56_3 und des zweiten vollständig sequenzierten Subtraktionsklons cSHD56_4 festgestellt wurden sind unterstrichen und in Großbuchstaben dargestellt. Die alternative Polyadenylierungsstelle des Klons cSHD56_4 ist durch eine Raute ♦ markiert.

3.2.2. Analyse der abgeleiteten Aminosäuresequenz von *ZmPti1*

Die genauere Analyse der von der *ZmPti1*-cDNA ([AY554281]; 3.2.1) abgeleiteten Aminosäuresequenz kann Anhaltspunkte für die Zugehörigkeit zur Familie der *Pti1*-Kinasen und Funktion des *ZmPti1*-Produkts liefern (Abb. 3-5).

Die abgeleitete Aminosäuresequenz von 374 Aminosäuren codiert für ein 40.840 Da großes Protein. Dieses ist wahrscheinlich im Cytoplasma lokalisiert, da es kein Signalpeptid identifiziert werden konnte. Homologieuntersuchungen auf Aminosäureebene bestätigen eine 71%- bzw. 78%-ige Identität von ZmPTI1 zum PTO INTERACTOR 1 (LePTI1) aus Tomate bzw. zu einer PTI1-ähnlichen Kinase aus Reis. Diese und weitere Homologien zu Serin/Threonin-Kinasen aus anderen Organismen sind in Tab. 3-3 zusammengefaßt. Eine Gegenüberstellung dieser Aminosäuresequenzen ist in Abb. 3-6 dargestellt.

Protein ID	Bezeichnung		Identität	Ähnlichkeit
NP_908680	putative Pto kinase interactor 1	<i>O. sativa</i>	78%	86%
AAC61805	Pto kinase interactor 1	<i>L. esculentum</i>	71%	79%
NP_188367	Serin/Threonin Proteinkinase	<i>A. thaliana</i>	69%	78%
AAF91336	Pti1-ähnliche Kinase	<i>G. max</i>	65%	80%
CAE55203	Protein Kinase 1	<i>N. tabacum</i>	65%	80%
AAG16628	Serin/Threonin Kinase BNK1	<i>B. napus</i>	46%	60%
BAA94509	Protein Kinase 1	<i>P. nigra</i>	44%	58%

Tab. 3-3: Homologie der abgeleiteten *ZmPti1*-Aminosäuresequenz zu bekannten Serin/Threonin-Proteinkinasen anderer Pflanzen

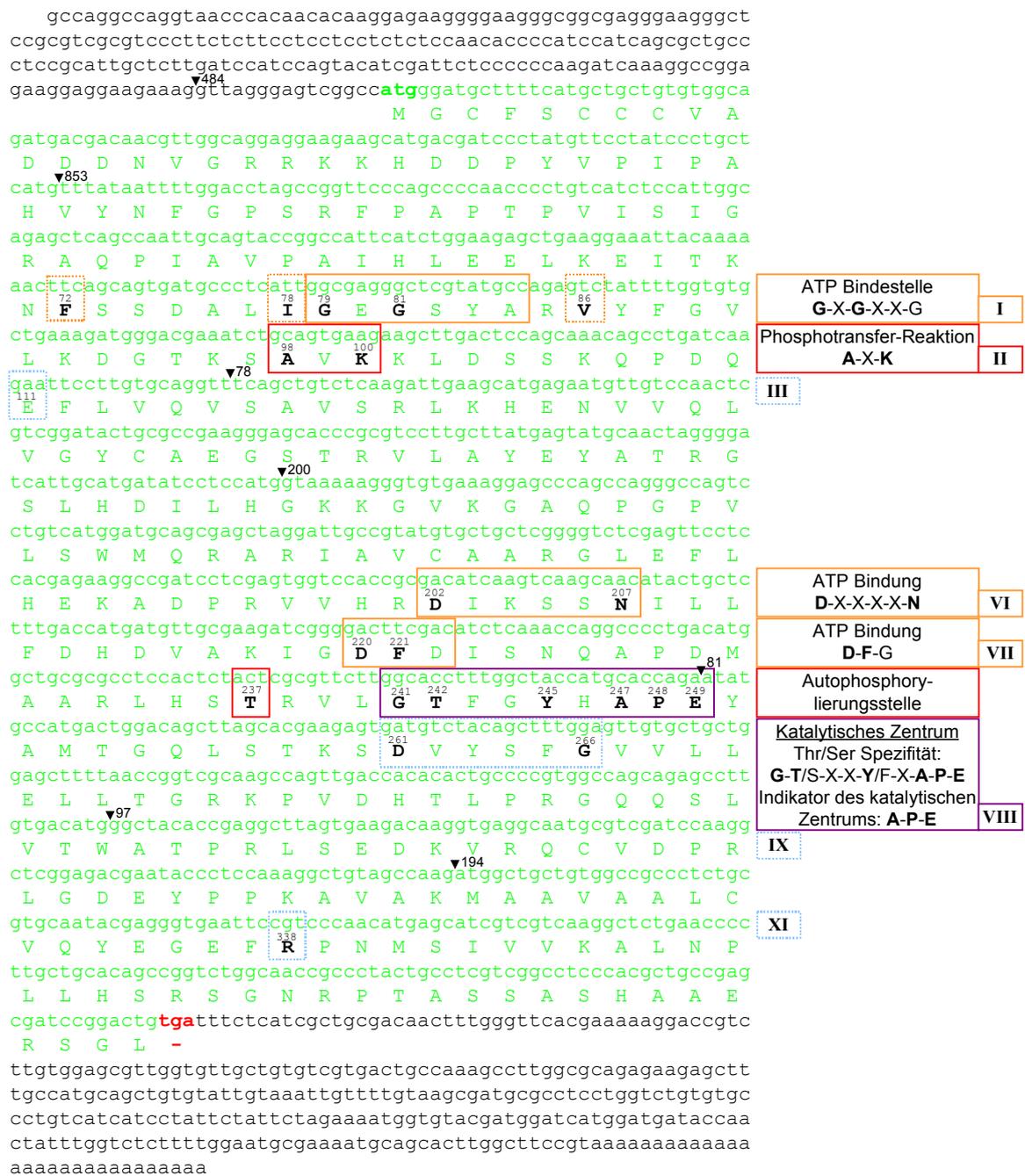


Abb. 3-5: ZmPti1: Nukleinsäuresequenz der cDNA mit abgeleiteter Aminosäuresequenz und charakteristischen Kinasesubdomänen

Dargestellt ist die Nukleinsäuresequenz der ZmPti1-cDNA des Klonen cSHD56_3 mit der abgeleiteten Aminosäuresequenz des offenen Leserahmens (grün). Die Konsensus-Sequenzen der Subdomänen bekannter Proteinkinasen, ihre Funktion und Bezeichnung nach HANKS et al. (1988) sind rechts verzeichnet. Hoch konservierte Aminosäuren in der Konsensus-Sequenz sind fett dargestellt. Übereinstimmungen von Aminosäuren zwischen der abgeleiteten Aminosäuresequenz und im Konsensus sind in der Sequenz fett hervorgehoben und numeriert. Die Subdomänen IV, V und X mit schwächer konservierten Aminosäuren unbekannter Funktion sind nicht eingezeichnet. Die Positionen und Längen der sieben Introns sind angegeben (▼; siehe dazu 3.2.3.).

3.2.2.1. *ZmPti1* codiert für eine Serin/Threonin-Proteinkinase

Die detaillierte Analyse der aus der *ZmPti1*-cDNA abgeleiteten Aminosäuresequenz zeigt, dass es sich bei ZmPTI1 wahrscheinlich um ein Familienmitglied der Proteinkinasen mit Serin/Threonin-Spezifität handelt. Die für Proteinkinasen charakteristischen Subdomänen nach HANKS *et al.* (1988) konnten auch in der *ZmPti1*-Aminosäuresequenz identifiziert werden (Abb. 3-5 und Abb. 3-6).

Die insgesamt elf bekannten Subdomänen (I-XI) der Proteinkinasen teilen sich in hochkonservierte sowie weniger stark konservierte Subdomänen auf. Die hochkonservierten Subdomänen (I, II, VI, VII, VIII und IX) besitzen katalytische Funktionen oder sind für die Zusammenführung der entsprechenden Reaktionszentren verantwortlich. Die weniger stark konservierten Bereiche (III, IV, V, X und XI) liegen wahrscheinlich als Schleifen vor und unterstützen die Bildung einer funktionsfähigen Sekundärstruktur, die die aktiven Zentren zueinander ausrichtet.

Hochkonservierte Aminosäuren in den einzelnen katalytischen Subdomänen scheinen eine wichtige Rolle bei der Katalyse zu spielen. Den meisten wird dabei eine Beteiligung an der ATP-Bindung und Übertragung der Phosphatgruppe zugeschrieben. In den von HANKS *et al.* (1988) und HANKS und QUINN (1991) verglichenen Aminosäuresequenzen von Proteinkinasen aus Vertebraten, Hefen, *Drosophila*, Nematoden, *Aplysia*, *Aspergillus*, *Hydra*, *Phaseolus* und dem S13 Virus sind 14 Aminosäuren hoch konserviert. Von diesen 14 Aminosäuren sind 13 in der ZmPTI1-Primärsequenz an charakteristischer Position zu identifizieren (Abb 3-5): Glycin (G⁷⁹), Glycin (G⁸¹), Valin (V⁸⁶), Lysin (K¹⁰⁰), Glutaminsäure (E¹¹¹), Asparaginsäure (D²⁰²), Asparagin (N²⁰⁷), Asparaginsäure (D²²⁰), Phenylalanin (P²⁴⁸), Glutaminsäure (E²⁴⁹), Asparaginsäure (D²⁶¹), Glycin (G²⁶⁶) und Arginin (R³³⁸). Das in Subdomäne VII hochkonservierte Glycin²²², zwei Positionen C-terminal von der Asparaginsäure²²⁰, ist in ZmPTI1 durch eine Asparaginsäure²²² ersetzt.

Den elf Subdomänen I-XI der Proteinkinasen sind nach HANKS *et al.* (1988) kennzeichnende Funktionen zugeordnet. Das Zentrum der katalytischen Domäne wird in den Subdomänen VI bis IX vermutet. In dieser Region befinden sich die Mehrzahl der hoch konservierten Aminosäurereste. Die charakteristischen Funktionen der Subdomänen können auch für das abgeleitete ZmPTI1 postuliert werden.

Die Subdomäne I mit der Konsensus-Sequenz Gly-X-Gly-X-X-Gly befindet sich nahe dem N-Terminus der katalytischen Domäne und ist direkt an der ATP-Bindung beteiligt. Die konservierten Aminosäurereste Glycin⁷⁹ und Glycin⁸¹ von ZmPTI1 fallen in diesen Konsensus. In Position -7 und -1 zum ersten Glycin sind häufig hydrophobe Aminosäuren (in ZmPTI1 Phenylalanin⁷² und Isoleucin⁷⁸) zu finden.

Dreidimensionale Modelle der ATP-Bindung durch Nukleotidbindende Proteine mit gleicher Konsensus-Sequenz wie z.B. v-Src (WIERENGA und HOL, 1983) zeigen, dass die Aminosäuren des Konsensus eine Ellenbogenstruktur um Nukleotide ausbilden. Hierbei steht das erste Glycin mit der Ribose, das zweite mit der terminalen Phosphatgruppe in Kontakt. Ein konserviertes Valin, zwei Positionen carboxyterminal der Konsensus-Sequenz (V⁸⁶ bei ZmPTI1), scheint dabei die Positionierung der Glycine zu unterstützen.

Funktionen bei der ATP-Bindung werden ebenfalls den invarianten Aminosäureresten Asparaginsäure²⁰² und Asparagin²⁰⁷ in Subdomäne VI und den Aminosäuren in Subdomäne VII (Konsensus Asp-Phe-Gly; in ZmPTI1 Asp²²⁰, Phe²²¹ und Asp²²²) zugeschrieben. Die Asparaginsäurereste an den Positionen 202 und 220 könnten dabei mit den Phosphatgruppen des ATP interagieren (BRENNER, 1987). Der Konsensus D-F-G der Subdomäne VII ist in der letzten Position in ZmPTI1 und fünf weiteren aufgeführten Proteinkinasen modifiziert (Abb. 3-6). Bei den *Pti1*-homologen Kinasen aus Mais, Reis, Tomate, *Arabidopsis* und *Glycine max* ist statt eines Glycins eine weitere Asparaginsäure (D²²² in ZmPTI1) vorhanden.

Das invariante Lysin (K¹⁰⁰) in Subdomäne II ist die wahrscheinlich am besten charakterisierte Aminosäure der katalytischen Domäne von Proteinkinasen. Lysin scheint am Phosphotransfer direkt beteiligt zu sein. ATP-Analoga sowie Substitutionen des Lysins durch andere Aminosäuren (inklusive Arginin; KAMPS und SEFTON, 1986; SNYDER *et al.*, 1985; CHEN *et al.*, 1987, ZHOU *et al.* 1995) führen zur vollständigen Inhibierung der Enzymaktivität (ZOLLER *et al.*, 1981; KAMPS *et al.*, 1984; RUSSO *et al.*, 1985). Inwieweit der recht konservierte Abstand von 14 bis 23 Aminosäuren – bei ZmPTI1 beträgt er 16 Aminosäuren – zwischen der Subdomäne I und dem Lysin der Subdomäne II für die Proteinfunktion kritisch ist, ist unklar. Ein Alanin zwei Positionen N-terminal (A⁹⁸ bei ZmPTI1) des konservierten Lysins tritt in fast allen von HANKS *et al.* (1988) untersuchten Proteinkinasen auf.

Empirische Untersuchungen haben gezeigt, dass weitere Konsensus-Sequenzen im Bereich der Subdomäne VI und VIII Hinweise auf die Substratspezifität von Proteinkinasen für Tyrosinreste oder Serin/Threonin-Reste liefern. Aufgrund der Übereinstimmung mit dem Konsensus für Serin/Threonin-Proteinkinasen in Subdomäne VIII (Gly-Thr/Ser-X-X-Tyr/Phe-X-Ala-Pro-Glu) kann postuliert werden, dass es sich bei ZmPTI1 (G²⁴¹-T²⁴²-F-G-Y²⁴⁵-H-A²⁴⁷-P²⁴⁸-E²⁴⁹) um eine Serin/Threonin-Proteinkinase handelt.

Die Subdomäne VIII (Konsensus Ala-Pro-Glu; in ZmPTI1 Ala²⁴⁷-Pro²⁴⁸-Glu²⁴⁹) liegt nahe des katalytischen Zentrums der Proteinkinasen. Analysen mit Affinitätssubstraten, die kurz vor der Konsensus-Sequenz binden, führten zur Inhibierung der Enzymaktivität (BRAMSON *et al.*, 1982). Darüber hinaus konnte für v-Src (BRYANT und PARSONS, 1984) gezeigt werden, dass

alle drei Aminosäuren für die Kinaseaktivität essentiell sind. Bei Proteinkinasen mit Autophosphorylierungsaktivität befindet sich die Phosphorylierungsstelle innerhalb von 20 Aminosäuren stromaufwärts dieser Subdomäne. Eine putative Autophosphorylierungsstelle von ZmPTI1 könnte somit das Threonin²³⁷ sein.

Die Funktionen der Subdomänen III, IV, V, IX, X und XI sind bisher nicht geklärt. Subdomäne IX umfaßt einen relativ konservierten Bereich, der von den stark konservierten Aminosäuren Asparaginsäure und Glycin flankiert wird, die sich auch in ZmPTI1 (Asp²⁶¹ und Gly²⁶⁶) wiederfinden. Der in Subdomäne XI liegende, konservierte Argininrest (in ZmPTI1 R³³⁸) markiert das carboxyterminale Ende der katalytischen Domäne.

Zusammenfassend kann aufgrund dieser Resultate postuliert werden, dass ZmPTI1 eine *Pti1*-homologe Proteinkinase mit Serin/Threonin-Substratspezifität ist. Das identifizierte Threonin²³⁷ zwischen Subdomäne VII und VIII könnte das mögliche Ziel einer Autophosphorylierungsaktivität sein.

3.2.3. Genomische Organisation des *ZmPti1*-Gens

Die Isolierung, Sequenzierung und weiterführende genomische Untersuchungen des *ZmPti1*-Gens sollten Einblick in seine genomische Organisation geben. Insbesondere war hierbei von Interesse, mögliche *Pti1*-homologe Sequenzen im Maisgenom zu bestimmen.

3.2.3.1. Isolierung eines genomischen *ZmPti1*-Klons

Zur Isolierung eines genomischen *ZmPti1*-Klons wurde eine genomische λ *Fix*[®] II Bibliothek aus der *Wildtyp*-Maislinie *LineC* durchmustert (2.2.9.1.). Als Sonde diente der radioaktiv markierte (2.2.3.3.2.) 3' nicht-translatierte Bereich²⁹ der isolierten *ZmPti1*-cDNA. Zwei aus insgesamt 18 Phagenpopulationen der ersten *Screening*-Runden wurden für die weitere Untersuchung ausgewählt und vereinzelt (2.2.9.2.). Die beiden Klone zeigten in *PCR*-Analysen Sequenzen homolog zum 5' ORF und 3' UTR der *ZmPti1*-cDNA.

Mit Hilfe der Endonukleasen *EcoRI* und *PstI* wurden Restriktionen von DNA der beiden isolierten Phagenklone g11 und g24 durchgeführt. Anschließend *Southern* Analysen (2.2.9.4.) mit unterschiedlichen *ZmPti1*-homologen Sonden zeigten, dass nur Phagenklon g24 vollständig bezüglich des transkribierten Bereichs des *ZmPti1*-Gens ist. Die *Southern* Analysen des Phagenklons g24 und die daraus hergeleitete Struktur des Phagenklons sind in Abb. 3-7 dargestellt. Als Sonden wurden die folgenden Bereiche der *ZmPti1*-cDNA (Abb. 2-1) eingesetzt: der 5' untranslatierte Bereich³⁰ (5' UTR), der 5' Bereich des offenen Leserahmens³¹ sowie der offene Leserahmen inklusive der 3' untranslatierten Region³² (ORF+3' UTR).

Einzelne Teilsequenzen von Klon g24 wurden per *PCR* amplifiziert (2.2.3.2.):

- der offene Leserahmen des *ZmPti1*-Gens beginnend mit dem Startcodon bis kurz vor die Polyadenylierungsstelle im 3' UTR (→ TOPO 63-1-1, Tab. 3-4).
- ein 3,0 kb-Fragment, das den gesamten 3' UTR zwischen Stopcodon und 3' Ende des Phageninserts umfasst (→ TOPO 63-7-2, Tab. 3-4).

Nach Subklonierung der korrespondierenden, überlappenden Amplifikate in den *pCR*[®]2 *TOPO*[®] Vektor (Invitrogen, Karlsruhe) erfolgte deren Sequenzierung (2.2.13.).

²⁹ Sonde **3'UTR-Pti1**: *PCR*-Amplifikat mit den Primern *PRMMH53* und *PRMMH52* vom *ZmPti1*-cDNA-Klon

³⁰ Sonde **5'UTR-Pti1**: *PCR*-Amplifikat mit den Primern *LD 5' Insert* und *PRMMH62* vom *ZmPti1*-cDNA-Klon

³¹ Sonde **5'ORF-Pti1**: Insertionsfragment des Subtraktionsklons D56

³² Sonde **ORF+3'UTR-Pti1**: *PCR*-Amplifikat mit den Primern *PRMMH55* und *PRMMH52* vom *ZmPti1*-cDNA-Klon

Die Sequenzen der *PCR*-Amplifikate und des Subklons eines *PstI*-Restriktionsfragments des Phagenklons g24 (→ pBKS:1,4kb-*PstI*-g24, Tab. 3-4) ergaben keine Informationen über *ZmPti1*-Genbereiche 5' des Startcodons. Um diese Region zu isolieren, wurde ein *inverser PCR* Ansatz (HARTL und OCHMANN, 1996; Abb. 2-2) durchgeführt. Durch *inverse PCRs* (*iPCR*, 2.2.9.5.) können DNA-Bereiche amplifiziert werden, die sich links vom 5' Primer und rechts vom 3' Primer befinden. In Standard-*PCRs* können hingegen nur DNA-Abschnitte *zwischen* bekannten 5'- und 3'-Primerbindestellen amplifiziert werden. Bei der *iPCR* werden im Anschluss an die Restriktion geringe DNA-Mengen aller resultierenden Restriktionsfragmente gemeinsam ligiert. Durch die Ligation entstehen, aufgrund der sehr geringen DNA-Konzentration im Ansatz auch zirkuläre DNA-Moleküle (→ 4,1 kb-g24-*PstI*-'Plasmid'). Bei diesen befindet sich der zu amplifizierende DNA-Abschnitt zwischen den Primern. Die in dieser Arbeit durchgeführte *iPCR* brachte ein etwa 3,0 kb langes *PCR*-Fragment hervor, das kloniert und sequenziert wurde (→ TOPO 69-1-2 /4, Tab 3-4). Die Länge des 3,0 kb-Fragments entsprach in etwa der erwarteten Größe. Es ergibt sich aus der Gesamtlänge des 4,1 kb-*PstI*-Fragments abzüglich des 900 bp-Abstandes der zur Amplifikation eingesetzten Primer *PRMMH75/62*.

g24 Subklon	Beschreibung des Vektorinserts	Insertgröße
TOPO 69-1-2 TOPO 69-1-4	Promotor und 5' untranslatierte Region (5'UTR): aus <i>inverser PCR</i> Amplifikation von <i>PstI</i> restringierter, religierter g24 Phagen-DNA (Primer <i>PRMMH75/62</i>)	3,2 kb
TOPO 63-1-1	offener Leserahmen (ORF) und 3' nicht-translatierte Region (3'UTR): aus <i>PCR</i> Amplifikat von g24 Phagen-DNA (Primer <i>PRMMH55/52</i>)	3,0 kb
TOPO 63-7-2	3' nicht-translatierte Region (3'UTR) bis 3' Phagen-Insertende: aus <i>PCR</i> Amplifikat von g24 Phagen-DNA (Primer <i>PRMMH53/T3-17mer</i>)	3,0 kb
TOPO 74-3-5	Intron 1 bis Intron 2: aus <i>PCR</i> Amplifikat von g24 Phagen-DNA (Primer <i>PRMMH85/PRMMH70</i>)	1,0 kb
pBKS:1,4kb- <i>PstI</i> -g24	offener Leserahmen: das 1,2kb lange, in pBluescript KS subklonierte <i>PstI</i> -Restriktionsfragment von Phagenklon g24	1,2 kb

Tab. 3-4: Subklone des Phagenklons g24 zur Bestimmung der Sequenz des *ZmPti1*-Gens

Die vollständige genomische Sequenz des *ZmPti1*-Gens wurde aus den sechs in Tab. 3-4 aufgeführten Klonen abgeleitet und ist in *GeneBank* (*accession number* AY554283) deponiert. Aus dem Vergleich der vollständigen genomischen Sequenz und der bekannten cDNA-Sequenz von *ZmPti1* wurde die genomische Struktur hergeleitet (Abb. 3-8). Das klonierte *ZmPti1*-Gen besteht aus acht Exons und sieben Introns. Der Translationsstart befindet sich in Exon 2. Eine sehr ähnliche Exon/Intron-Struktur besitzt auch das *Pti1*-homologen Gen aus Reis (eigene *in silico* Analysen, Tab. 3.5). Sequenzvergleiche zwischen einer *OsPti1*-cDNA

[NM_183791] und der zugehörigen genomischen Sequenz aus einem Bereich des Chromosoms 1 [AP003211] zeigten ebenfalls eine Genstruktur aus acht Exons und sieben Introns. Ähnlichkeiten der *Pti1*-Homologen aus Reis und Mais bestanden auch hinsichtlich der Größe der jeweils korrespondierenden Exons und Introns (siehe Tab. 3-5).

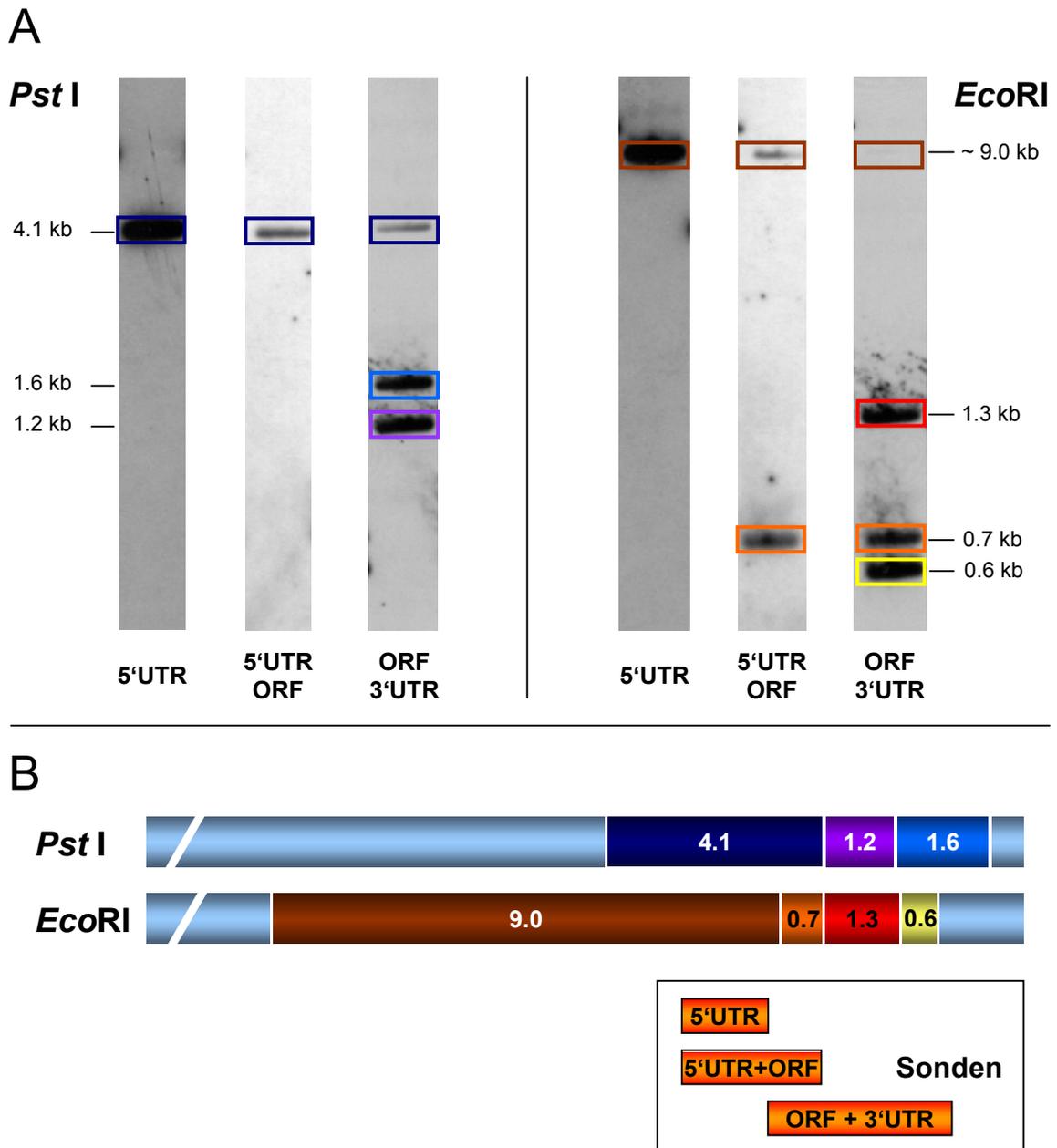


Abb. 3-7: Southern Analyse des genomischen *ZmPti1*-Phagenklons g24

A Southern Detektion von *Pst*I- bzw. *Eco*RI-Restriktionsfragmenten des genomischen *ZmPti1*-Phagen g24. Bei der Southern Analyse wurde die DNA nacheinander gegen die angegebenen Sonden hybridisiert.
B Schema der aus den Southern Ergebnissen abgeleiteten Anordnung der *ZmPti1*-*Pst*I- und *Eco*RI-Restriktionsfragmente des Phageninserts des Lambda *Fix*[®]*II*-Phagen g24. Detektionssignale im Southern Blot in **A** und die korrespondierenden Restriktionsfragmente in **B** sind gleichfarbig dargestellt. Die Größe der einzelnen Fragmente sind in Kilobasen angegeben. Die für die Analysen eingesetzten drei Sonden (vgl. Abb. 2-1) sind entsprechend ihrer Hybridisierungen den Phagen-Restriktionsfragmenten zugeordnet.

	Größe in bp			Größe in bp	
	<i>ZmPti1</i>	<i>OsPti1</i>		<i>ZmPti1</i>	<i>OsPti1</i>
Exon 1	193	n.d.	Intron 1	484	n.d.
Exon 2	109	85 (ohne 5'UTR)	Intron 2	853	1.010
Exon 3	254	258	Intron 3	78	102
Exon 4	124	125	Intron 4	200	259
Exon 5	274	272	Intron 5	81	115
Exon 6	132	133	Intron 6	97	98
Exon 7	88	89	Intron 7	194	465
Exon 8	435	153 (ohne 3'UTR)			

Tab. 3-5: Vergleich der Exon- und Introngrößen des *Pti1*-Gens aus Mais und eines *Pti1*- Gens aus Reis

Angegeben sind die aus dem Vergleich der entsprechenden cDNA- und genomischen Sequenzen abgeleiteten Exon- und Introngrößen der homologen *Pti1*-Gene aus Mais [AY554283] und Reis [NM_183791, AP003211]. n.d. = für die Analysen nicht verfügbar.

3.2.3.2. Genomische Southern Analysen mit *ZmPti1*

Zur Bestimmung der Anzahl *Pti1*-homologer Gene bei Mais wurde mit *EcoRI* oder *PstI*-restringierte genomische DNA der Linie *LineC* in *Southern* Analysen (2.2.3.5.) eingesetzt (Abb. 3-8). Nach Hybridisierungen mit den radioaktiv markierten Sonden gegen den Promotorbereich³³, ORF-*Pti1*, sowie 3' UTR-*Pti1* des klonierten *Pti1*-homologen Gens, konnten alle aus der klonierten genomischen *ZmPti1*-Sequenz abgeleiteten *EcoRI* und *PstI*-Restriktionsfragmente (vgl. Abb. 3-8 A+B) detektiert werden. Außerdem konnten alle in der genomischen DNA detektierten Fragmente – mit Ausnahme eines 4 kb-*EcoRI*-Fragmentes – den korrespondierenden Fragmenten des Phagenklons g24 (3.2.3.1, Abb. 3-7) zugeordnet werden:

In den *Southern* Analysen mit *PstI*-geschnittener, genomischer DNA wurden insgesamt drei Fragmente detektiert. Ein nur mit der *Pti1*-Promotor-Sonde detektierbares 4,1 kb langes Fragment enthält die Promotorregion des *ZmPti1*-Gens. Das korrespondierende Teilstück aus dem Phagenklon g24 diente in ligierter Form als *template* für die *iPCR* (2.2.9.5.). Die beiden 1,6 und 1,2 kb langen Teilstücke hybridisieren unterschiedlich stark mit der Sonde des offenen Leserahmens. Während das 1,2 kb lange Fragment relativ stark hybridisiert, liefert das 1,6 kb Restriktionsfragment nur ein schwaches Signal. Da das größere 1,6 kb-Fragment außerdem mit der 3' UTR-Sonde detektiert wird, kann es dem 3' Bereich des *ZmPti1*-Gens zugeordnet werden. Das 1,2 kb Fragment dagegen ist zentral lokalisiert.

³³ Sonde **Promotor-*Pti1***: PCR-Amplifikation mit den Primern *PRMMH89* und *PRMMH90* von Phagen-DNA des Phagenklons g24

Die genomische *Southern* Detektion *EcoRI*-restringierter DNA liefert ein komplexeres Bild von sechs Restriktionsfragmenten. Das längste, circa 9,0 kb große, Fragment hybridisiert mit der Promotorsonde und etwas schwächer mit der ORF-*Pti1*-Sonde. Folglich enthält es den 5' Bereich des *ZmPti1*-Gens und Teile der codierenden Sequenz. Ein 600 bp langes *EcoRI*-Fragment enthält das 3' UTR und wird mit der korrespondierenden Sonde nachgewiesen wird. Neben diesem 600 bp-Fragment werden zwei weitere, 1,3 kb und 700 bp lange, Teilstücke mit der ORF-*Pti1*-Sonde detektiert. Deren Anordnung zueinander kann, unter Einbeziehung der *Southern* Analyse des Phagenklons g24 (Abb. 3-7), bestimmt werden.

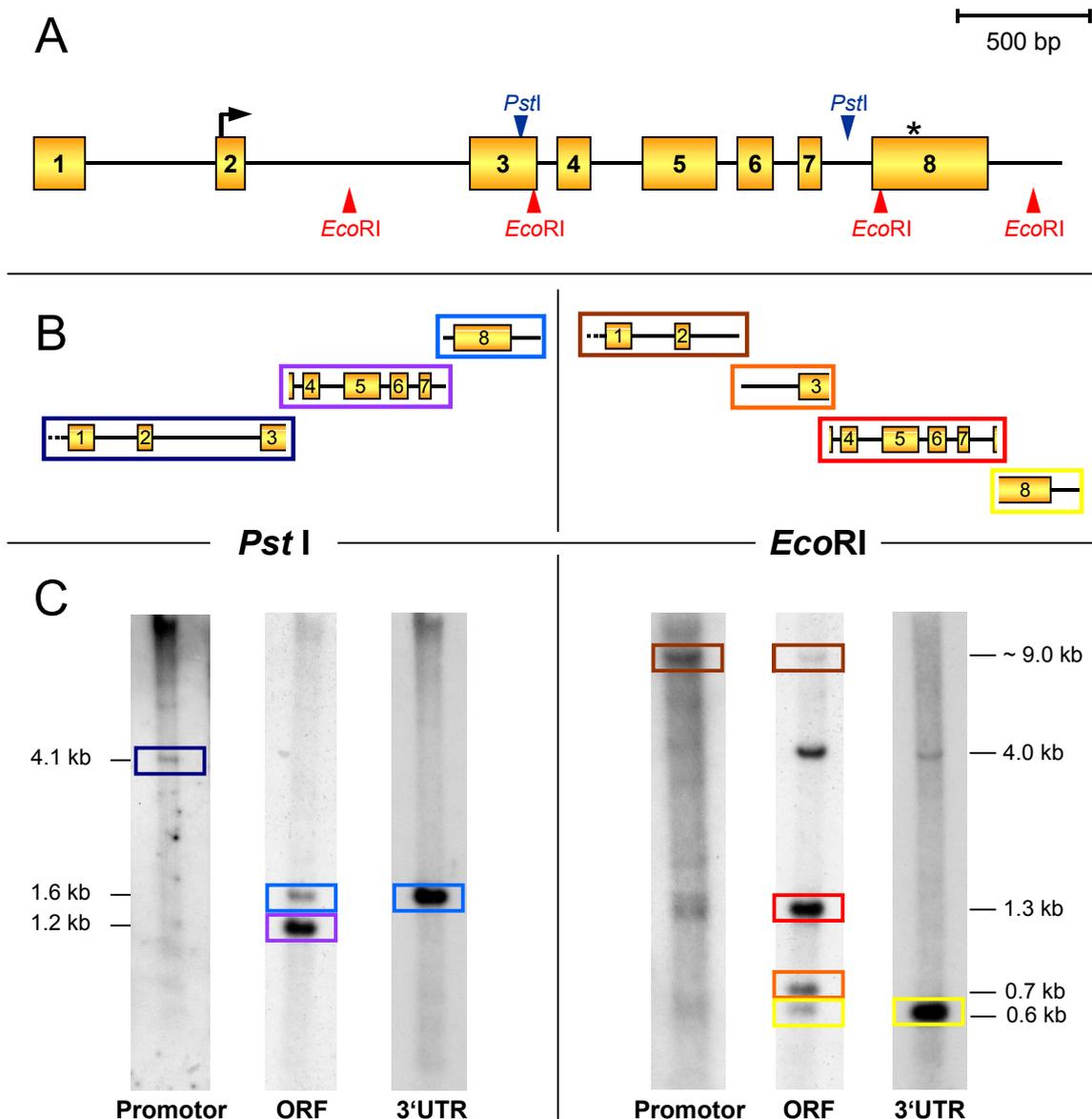


Abb. 3-8: Exon/Intron-Struktur des *ZmPti1*-Gens und *Southern* Analysen genomischer DNA

A Darstellung der Struktur des *ZmPti1*-Gens. Positionen und Längen der acht Exons und sieben Introns sind aus dem Vergleich der genomischen mit der cDNA-Sequenz hergeleitet. Der Translationsstart befindet sich am Anfang des Exons 2. Das Translationsende (*) und Restriktionsschnittstellen sind eingezeichnet.

B Darstellung der aus der genomischen Sequenz abgeleiteten *PstI*- bzw. *EcoRI*-Restriktionsfragmente.

C *Southern* Analysen von *PstI*- und *EcoRI*-geschnittener genomischer *LineC*-DNA (20 µg je Spur). Die hergeleiteten *PstI*- und *EcoRI*-Fragmente werden im *Southern* mit den angegebenen Sonden detektiert. Korrespondierende Hybridisierungssignale und Restriktionsfragmente sind in **B** und **C** in gleicher Farbe markiert (vgl. Abb 3-7). Das im detektierte 4 kb-*EcoRI*-Fragment könnte zu einer weiteren *Pti1*-Genkopie gehören.

Ein sechstes Fragment (4,0 kb), das relativ stark mit der Sonde des offenen Leserahmens sowie schwächer mit der Sonde des 3'-UTRs hybridisiert, kann weder mit der *Southern* Analyse des Phagenklons g24 (3.2.3.1) noch mit der Sequenz des klonierten *ZmPti1*-Gens [AY554283] in Einklang gebracht werden. Bei diesem Fragment kann es sich um den Teil eines weiteren *ZmPti1*-homologen Gens mit einem veränderten *EcoRI*-Restriktionsmuster handeln. Die Ergebnisse der genomischen *Southern* Analysen zeigen, dass es in Mais ein, möglicherweise zwei *ZmPti1* repräsentierende Gene gibt.

3.3. Analyse von *ZmPti1*

3.3.1. mRNA-Expression von *ZmPti1*

Bei der Analyse der aus der Subtraktion nach BUCHANAN-WOLLASTON und AINSWORTH isolierten, *Pti1*-homologen Subtraktionssequenzen (3.1.2.3) gab es erste Anhaltspunkte für eine stark pollenspezifische Expression des zugehörigen Gens. Um detaillierteren Aufschluss über das Expressionsmuster des *ZmPti1*-Gens zu erhalten, wurden *Northern* Analysen (3.3.1.1) durchgeführt und ein *PCR*-basierter Ansatz (3.3.2) verfolgt.

3.3.1.1. *Northern* Analysen zur Expression des *ZmPti1*-Gens

In *Northern* Analysen mit Gesamt-RNAs aus unterschiedlichen Geweben des *Wildtyps* und der *whp*-Mutantenlinie (Abb. 3-9) kann die Expression des *ZmPti1*-Gens untersucht werden. *Northern* Hybridisierungen mit den radioaktiv markierten Sonden 3' UTR-*Pti1* und ORF-*Pti1* zeigten im wesentlichen dasselbe Expressionsmuster für *ZmPti1* in beiden Maislinien. Die *ZmPti1*-Expression steigt in den Antheren im Verlauf der Pollenentwicklung stark an. Die größte mRNA-Menge konnte in reifem Pollen und in *in vitro* gekeimtem Pollen nachgewiesen werden. *ZmPti1*-spezifische mRNAs konnten in allen anderen untersuchten Geweben nicht nachgewiesen werden (vgl. hierzu auch 3.3.1.2).

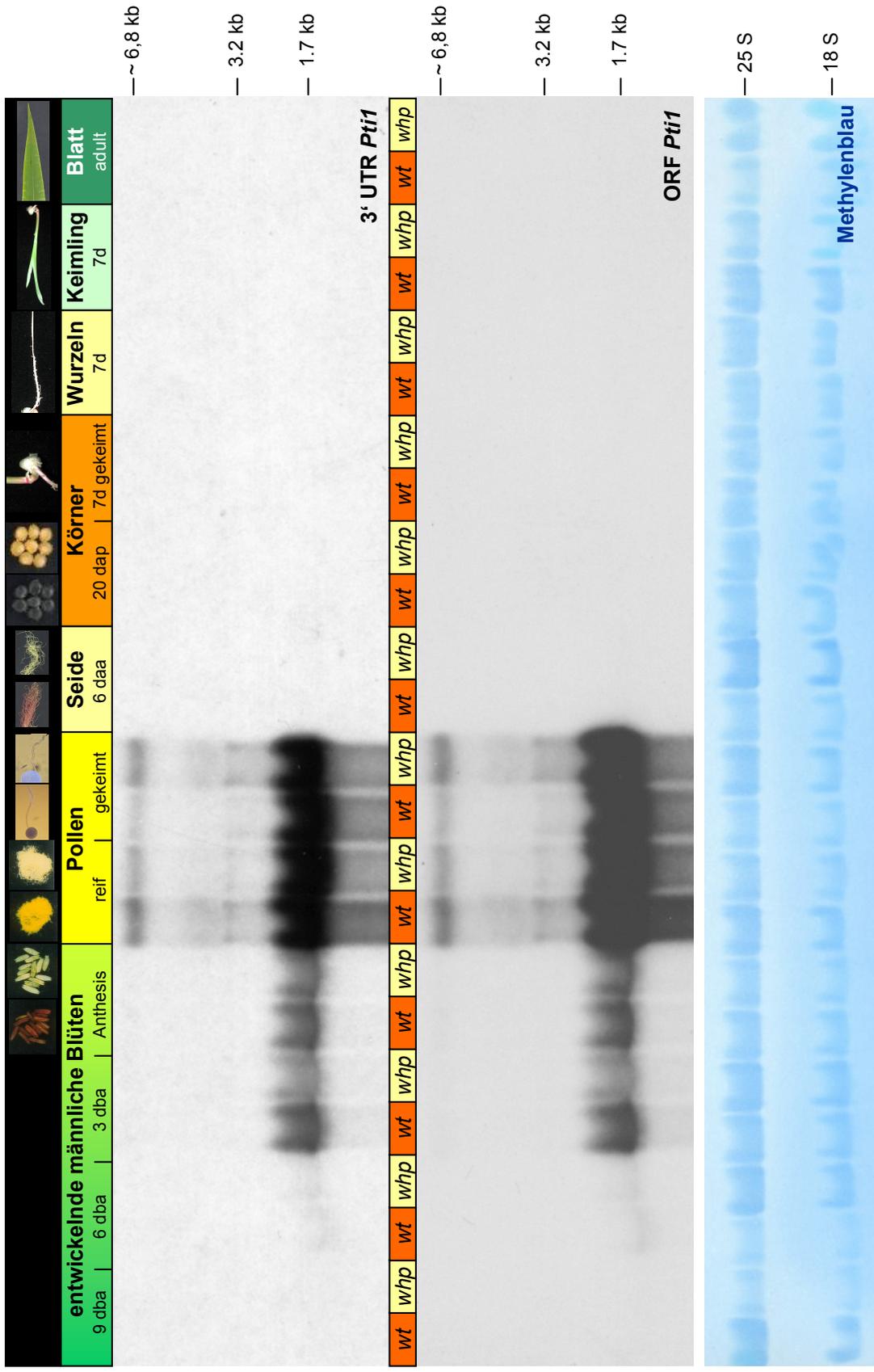


Abb. 3-9: Expression des ZmPti1-Gens in entwickelnden Pollen und anderen Geweben aus dem Wildtyp und der whp-Mutante
 Nachweis ZmPti1-homologer Transkripte in sich entwickelnden männlichen Blüten, reifem Pollen und 10 min *in vitro* gekeimtem Pollen mit radioaktiv markierten Sonden aus dem 3' nicht translatierten Bereich (3'UTR Pti1) und dem offenen Leserahmen (ORF-Pti1). Vollständig gespleißte ZmPti1-Transkripte besitzen eine Länge von 1,7 kb. Die Expression des ZmPti1-Gens nimmt während der Pollenentwicklung zu und erreicht in reifem Pollen ihr Maximum. Die [Methylenblau] gefärbte Membran zeigt nahezu äquivalente Beladung mit je 20 µg Gesamt-RNA. [dba] Tage vor Anthesis, [daa] Tage nach Anthesis, [dap] Tage nach Pollinierung, [d] Tage, [wf] Wildtyp Genotyp (C₂/C₂:whp/whp und C₂/C₂:whp/whp), [whp] white pollen Genotyp (C₂/C₂:whp/whp).

Der Unterschied zwischen der Stärke des Hybridisierungssignals in Pollen und in männlichen Blüten ist auf das unterschiedliche Ausgangsmaterial für die RNA-Isolierung und nicht auf eine unterschiedliche Expression des *Pti1*-homologen Gens zurückzuführen ist. Bei den RNAs aus männlichen Blüten handelt es sich, aufgrund der Zusammensetzung des Pflanzengewebes, um eine gemischte RNA-Population aus Pollen-RNAs und RNAs aus dem übrigen Blütenstand. Demgegenüber entstammen die RNAs aus reifem und *in vitro* gekeimtem Pollen ausschließlich diesem einen Gewebetyp. Dieses gilt insbesondere auch deshalb, da das Entwicklungsstadium des isolierten Pollens und des Pollens im männlichen Blütenstand identisch ist.

Die Länge der Transkripte von 1,7 kb, die das stärkste Signal liefern, stimmt mit der der *ZmPti1*-cDNA überein. Es handelt sich somit um vollständig gespleißte mRNAs des zuvor klonierten *ZmPti1*-Gens (3.2.3). Zusätzlich konnten mit beiden Sonden geringere Mengen von Transkripten mit einer Länge von etwa 3,2 kb detektiert werden. Dabei könnte es sich um alternativ bzw. unvollständig gespleißte Transkripte des *ZmPti1*-Gens handeln. Eine vollständig ungespleißte prä-mRNA des *ZmPti1*-Gens würde theoretisch eine Länge von 3,6 kb besitzen. Darüber hinaus wurden mit beiden Sonden mRNAs von circa 6,8 kb Länge nachgewiesen. Die Herkunft dieser mRNAs ist nicht bekannt, das gewebe- und entwicklungs-spezifische Expressionsmuster ist jedoch vergleichbar mit dem der *ZmPti1*-mRNAs.

Die beiden zusätzlich zu den 1,7 kb langen *ZmPti1*-mRNAs nachgewiesenen Transkripte stammen möglicherweise von einer zweiten *ZmPti1*-Genkopie (4.3.). Die *Southern* Analysen lieferten bereits Hinweise darauf (3.2.3.2).

3.3.1.2. **PCR-Ansatz zur Analyse der Expression des *ZmPti1*-Gens**

Mittels eines *PCR*-Ansatzes (2.2.4.4.), der freundlicherweise von Dr. Stefan Scholten³⁴ durchgeführt wurde, wurden cDNA-Populationen, die RNAs einzelner Zelltypen oder Gewebe der Maislinie *A188* repräsentieren, auf die Anwesenheit von *ZmPti1*-Sequenzen hin untersucht. Hierzu erfolgte die Amplifikation aus den entsprechenden cDNA-Populationen mit einem *ZmPti1*-spezifischen Primerpaar³⁵, welches aus dem offenen Leserahmen und dem 3' nicht-translatierten Bereich der korrespondierenden cDNA abgeleitet wurde.

Für die Analyse standen cDNA-Populationen aus Spermazellen, aus drei verschiedenen Zelltypen des Embryosacks (Eizelle, Synergiden, Zentralzelle) und des Nucellus, aus Embryonen und Endosperm verschiedenen Alters sowie aus jungen Blättern von 7-Tage alten

³⁴ Biozentrum Klein Flottbek und Botanischer Garten, Universität Hamburg

³⁵ Primer *PRMMH59* und *PRMMH52*

Pflanzen zur Verfügung. Als Positivkontrolle für die gewählten Reaktionsbedingungen diente die Amplifikation des entsprechenden Genbereichs aus genomischer DNA der Linie A188.

Aus allen eingesetzten cDNA-Populationen wurde ein *PCR*-Produkt der erwarteten Größe erhalten (Abb. 3-10). Damit konnte eine *ZmPti1*-Expression in allen untersuchten Geweben und Zelltypen nachgewiesen werden. Die hier angewendete *PCR*-Analyse wurde methodisch bis in den Sättigungsbereich der Amplifikation durchgeführt und ist deshalb rein qualitativ zu interpretieren und lässt keine Schlüsse auf die tatsächlich vorhandene Menge an *ZmPti1*-Transkripten in den jeweiligen Geweben oder Zelltypen zu (4.2.).

Neben der sehr starken in *Northern* Analysen nachgewiesenen (3.3.1.1) *ZmPti1*-Expression in Pollen konnte auch eine Expression in Zellen des Embryosacks (Eizelle, Synergiden, Zentralzelle), dem Nucellusgewebe, in Embryonen und dem Endosperm sieben und 14 Tage nach Befruchtung sowie in sieben Tage alten Blättern gezeigt werden.

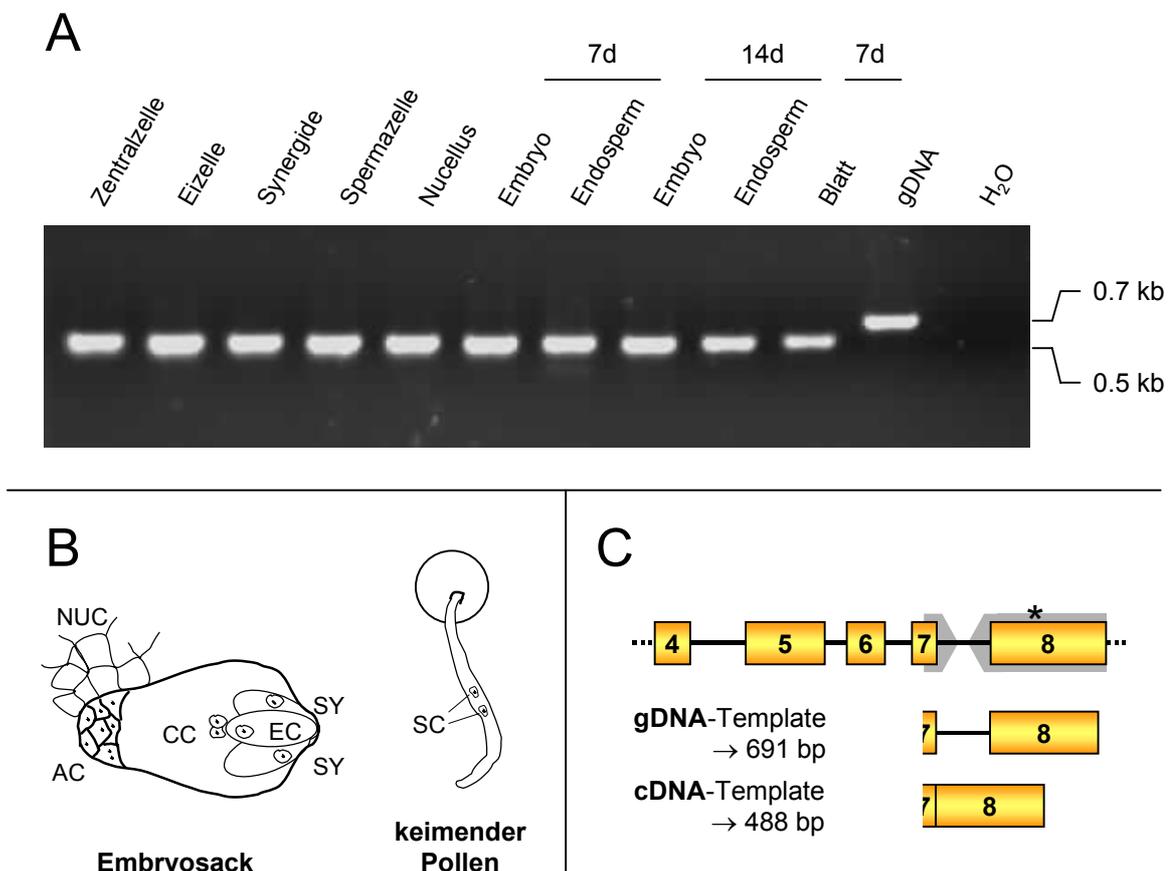


Abb. 3-10: Nachweis von *ZmPti1*-homologen Transkripten in Zelltypen des männlichen und weiblichen Gametophyten sowie entwickelnden Körnern und Blättern

A Elektrophoretisch aufgetrennte *PCR*-Amplifikate im ethidiumbromidgefärbten Agarosegel. In allen untersuchten Zelltypen bzw. Gewebearten werden *ZmPti1*-Transkripte über *PCR* nachgewiesen. gDNA: Positivkontrolle, Amplifikation des 691 bp großen genomischen *ZmPti1*-Abschnitts von genomischer DNA. H₂O: Kontrolle ohne DNA. Alle als Template eingesetzten Nukleinsäuren stammen aus der Maislinie A188.

B Schematische Darstellung eines Embryosacks und eines keimenden Pollenkorns. Einzelzellen und Gewebe in denen die *ZmPti1*-Expression untersucht wurde sind angegeben: Eizelle (EC), Synergiden (SY), Zentralzellen (CC), Nucellus (NUC), Antipoden (AC, nicht untersucht), Spermazellen (SC).

C Bei *PCR* von genomischer DNA bzw. cDNA werden mit den Primern PRMMH59 (in Exon 7) und PRMMH52 (im 3'UTR) *ZmPti1*-Teilsequenzen von 691 bp bzw. 488 bp Länge amplifiziert.

3.3.2. Charakterisierung des *ZmPti1*-Promotors

Die Expression von eukaryotischen Genen unterliegt einer komplexen, von *cis*- und *trans*-aktiven Faktoren abhängenden Regulation. Der Promotor eines Gens umfaßt alle stromaufwärts des Transkriptionsstarts liegenden, regulatorischen DNA-Bereiche. An diese *cis*-Faktoren binden sogenannte *trans*-aktive, ortsunabhängige Transkriptionsfaktoren. Das Zusammenspiel von *cis*- und *trans*-aktiven Faktoren bestimmt die Stärke und Gewebsspezifität der jeweiligen Genexpression.

Für das *ZmPti1*-Gen konnte in *Northern* Analysen (3.3.1.1) eine starke Expression in Pollen gezeigt werden. Hinweise auf spezifische Sequenzelemente in der *ZmPti1*-Promotorregion, die die außergewöhnlich starke Genexpression erklären, konnten in *in silico* Analysen gewonnen werden (3.3.2.1). Darüber hinaus sollten transient Promotor-Reporter-gen-Konstrukte transient in *in vitro* keimenden Pollen exprimiert werden (3.3.2.2). Diese Experimente könnten Hinweise darauf geben, welche Promotorbereiche des *ZmPti1*-Gens essentiell für die pollenspezifische Expression sind.

3.3.2.1. *in silico* Analysen des *ZmPti1*-Promotors

Die *in silico* Analyse des *ZmPti1*-Promotors im Bereich von -2.209 bis +691 ist in Abb. 3-11 zusammengefaßt. Der aufgrund des *Consensus* von REESE (1998) vorhergesagte *ZmPti1*-Transkriptionsstart +1 (Gccaggccag) stimmt mit dem 5'-Ende der isolierten *ZmPti1*-cDNA (Abb. 3-4, 3.2.1) überein. Die TATA-Box (TAATAAAA) zwischen -33 und -25 sowie die CCAAT-Box (CCAAT) zwischen -103 und -99 sind die Grundelemente proteincodierender Gene. Neben diesen konnten eine Vielzahl von *cis*-Sequenzelementen identifiziert werden, die mit einer pollenspezifischen Expression in Verbindung gebracht werden (1.6.).

Die von BATE und TWELL (1998) für den Promotor des späten Pollengens *lat52* aus Tomate beschriebenen Motive Pollen-Box I (PBI) mit der Konsensus-Sequenz tGTGGtt³⁶ und das GAAA-Motiv (aGAAA) treten gemeinsam auf. Im *ZmPti1*-Promotor sind sie in enger Nachbarschaft zur TATA- und CCAAT-Box mehrfach vorhanden. Die ebenfalls von BATE und TWELL identifizierte Sequenz TCCACCATA fehlt in diesem Kontext. Sequenzmotive dieses Typs liegen im *ZmPti1*-Promotor weiter stromaufwärts. Während die Kombination aller drei Motive eine effiziente pollenspezifische Expression zur Folge hat, fällt diese bei Abwesenheit des GAAA-Motivs aus. Die Motivkombination GTGG/GAAA führt nur zu einer reduzierten Expression.

³⁶ der Kern des Sequenzmotivs ist in Großbuchstaben angegeben

Weiter stromaufwärts zwischen -282 und -231 ist im *ZmPti1*-Promotor eine AT-reiche Region vorhanden (77%, unterstrichen in Abb. 3-11). Der Promotor des Pollengens *lat52* aus Tomate weist in vergleichbarer Entfernung zum Transkriptionsstart ebenfalls eine AT-reiche Region (97%) auf. AT-reiche Regionen gelten als Bindungsstelle für HMG1-ähnliche³⁷ Proteine, die z.B. die DNA-Bindeaffinität des humanen Transkriptionsfaktors HOXD9 erhöhen können (ZAPPAVIGNA *et al.*, 1996). Innerhalb des AT-reichen Abschnitts bei *ZmPti1* liegt die Sequenz AATGATA, die Homologien zum Box I-Motiv GACNAATGATA aufweist. Box I und Box II (GTTTGT) besitzen nach DZELZKALNS *et al.* (1993) hemmende Effekte bei der pollenspezifischen Expression des SLG³⁸-Promotors aus *Brassica*.

Ab Position -201 ist im *ZmPti1*-Promotor die Sequenz AGATCA lokalisiert, die zu 5/6 dem Konsensus des *Quantitative*-Elements AGGTCA aus dem Maispromotor des *Zm13* Gens entspricht (HAMILTON *et al.*, 1998). *Quantitative-Box*-ähnliche Motive finden sich auch in den für die Expressionsstärke verantwortlichen Promotorregionen der pollenspezifisch exprimierten Gene *lat52* und *lat59* aus Tomate sowie des *ntp303*-Gens aus Tabak. In den Promotoren dieser drei Gene sowie dem des *Zm13* folgt den jeweiligen *Quantitative*-Elementen ein 32 bp großer, für die Gewebespezifität verantwortlicher Bereich. Dieser liegt 20-40 bp stromaufwärts der TATA-Box. Eine solche *Specificity-Box* ist im *ZmPti1*-Promotor *in silico* nicht identifizierbar.

Bei der *in silico* Analyse des *ZmPti1*-Promotors werden neben Grundelementen pollenspezifische Sequenzmotive gefunden, die Einfluss auf die Expressionsstärke und Gewebespezifität haben. Transiente Expressionsanalysen mit Deletionskonstrukten des *ZmPti1*-Promotors könnten die Funktionalität der gefundenen Elemente experimentell bestätigen und zur Identifizierung von weiteren Sequenzmotiven beitragen, die für die pollenspezifische Expression essentiell sind.

³⁷ *High Mobility Group 1*

³⁸ *S Locus Glycoprotein*

[2201] GGACAAACGACAAGTTCGGGCATAATCTAGGTTGCTCTTTATTGTGATGTTTGATTGATTGTAT
 ATGATTTTCATCCTCTCGAAAATTTAAAACCTCTCTTTGTGGAAATATATATTTTTATTACATGCATGCAACA
 TTTGTGGAAATTTGCTTGGGCTCTGCTTTTCTAACAACTACTACCCCATATTTTTGTGTCCCTCATAGAAGT
 TTAACACAAGTAGGATCATGACTTGACATACGGAATTTAAAATAGCCGGTTCATCCACTTTAAAACGTCA
 TATTAATTTGTGGCAGCTCCATGTTACTCTTTTGGCTAAACGAGAAAACAGCAGGTTGAATAATCCATA
 TTCATCAAATAATGAAGAAAAGAAAGATTACCTTCACCTGCTAAGAGCTACACGCCTACACCCACATATCCC
 CATATGAATTAGAGCAAAATAAACAAAGGGGCATGGTGAATAATCAATCAACCTCAATACAGATTTCAT
 CAAACAAGATCAGAACAATAGATACACAATAGAGTTACCTCCGTTCTAGCTCAGTAATGCAGTCAACTTGA
 GTCTGGTTGTAAGCAACTCAGAGAACAAGAATGCAATGCACCTCAAACCTGACCTACAATAGGCAAAA
 TACTAAATAAGCCTGTATGGTAAAGAAAGGCATTGAGAGAAAGCAAACTTCCTAGAAACTTTAGAGATCA
 TCAAGCATATCAGGAAAGCTCATCAGTTTTTGTGACCTCTCATTTGCAAAAATTGACAGGAACCTTTAAAAGGG
 GGAGTAACATCAACATTGAACAAAGGACCCAAATTCAGATATCAGTTTTGTGTGGAA [-1378]
 [-1377] AGCAAAAACATCTCAGATGGCTGGGATTTGGGAATGAATAATAAATTTGACAGCAGGGATCAGGAGC
 CAGGGTGTGAATGTAACATGGCAGTCAAACTCCAATAAATCATTGTTTCAGAGTACTATGGGAAAGACG
 ACCCTTTACCCTAGCTATATAGATGCAAAAACCTTATGGGATATATCAGAAAATGAAGAAAATAATGTTGC
 TACCGTTCTTGACCTGACAGGTCAATGATTAACATGGTTTATGTGCCTATATGAGAGAAGTCTTCTTGG
 CCGTTTCTTCTGAAACTACTAAATGGTTCAAACCTTTTGCCAAGAAAGAACTCTCTGGGATAAATCATGGG
 CTGGGATGCCAGAAGGAATAACAGGTCCATTTTTAACCTAGATCTATCAGGCAGAAATTCATGGATGGG
 GACAGGGTCAGCGCAAGCAACAGAAAATGGATGTTTTTGGCGTACCAGTTATCTTTGTTCCACGAAACAAG
 CATTACTAAGCAAAGTTCCAACATAGAAACGCCTGCTTTCACAAAATAATAGATAATATTCACATATCGA
 TAGAACAAGAAAAGAGGAACGAAGTCTGTACTACGACGGCGTATGGCGCCCTCAAAGAGCAGCGCGC
 CGGGACGATCGATGGCG [-727]
 [-726] GCAGGAACTTGCTCCCGACGCAGCTGACTCCCGGTGGCGCGTATGCGGGGCAACCGACGGCGG
 CGTCCCAGGCAACGATGGCCTCGAGTAGGGAGGTGACACGGGTGCGGCTAGCGCGAGCCGAAGGATTCGAGC
 GTAGTGGGGAAGTGTGCTGTGAGGGGAGGGGAGCTGGACGTGGGGCGGTAGAGGGGCTAGAAGCGCGGCTC
 GTGGGGCGAGGCGGGGCATCGTGTGAGGGGGCGCTCGGGTACTGATTTAGCAGCAGGCGAGGAAGGGAA
 TCGAGGTCGGAGGCGGAGAGGGAAGCAGTTAGGCGACCGAGCGTGGAGACGAAGGAAGGGAGTGGGTGTGG
 GAGGGGAGGGGATCTTGGCGGCGTTGATGSAAGGGGCGACGGCTGGAATTCCTGTGACGATGGAGCCG
 GGGCGGGGCGACGAGTGTGGACGATTTACTTACGATCTTAATAGAGTAGTAATGATAATTACTGTAAGATA
 GATACATCCAGCCAGCATGTTAGCCAGGTGCCAGATCAACAGTAGTAAATGTTGCATGTATGTACGGACA
 GAGCGGTGGGGCGAGGAGGAATGGCAAGAAATAGCAAAGCGAGAGGGTGTGTGCGCATTCCAATGTGCGA
 GCGGTGGTGGGAGCAGAGGCGAGGAAAGGACGGTCCGACGGACTGGACGTGGACGGGAAATAATAAAAACGG
 AACGGAAACGGCAACAAGTAA [-1]
 [+1] GCCAGGCCAGGCAACCCACAAACACAAGGAGAAGGGGAAGGGGCGGAGGGGAAGGGCTCCGCGTCTCGT
 GTCCCTTCTCTCTCTCTCTCTCAACACCCCATCCATCAGCGCTGCCCTCGGCATTGCTGTGATAACC
 ATCCAGTACATCGATTTCTCCCCCAAGATCAAAGGCCGGAGAAGGAGAAAGAAAGGTAGCCATCACCTCTG
 GTGTTGCTTTTTTTTCTCTCTCTCTCAACTGGTTTGGCATGTAAAATTTTTATATCGCGCGTGCCAAAT
 GTGAACTCCGTCGGATTTTATCCCTTCTCTCAAGACTTCTCTCTCTGCTTGTACGAACTGCGCCG
 CGCCGGCTTGGGCTCTCGATCCTCGATCTCGCCGAGAAAGCAGACGTTAACCGCCAGTCAGGTTCTTCTCT
 TGATTTGTGATAAGAAAAACTCTGATCAAATTTCTCGCATATTCGCACGGCAGATTCGGTCACTCAACT
 CCATCTCTCTGTTTCTCTCAGCGCCGTACGCAATGCCGATCTTACAAATATACCAGGAGGATTTCTG
 AAAATCGATCGAGACTTTTTTTTTGGACAGTTTTTAATAATGTGTGAAATACAAATGTTTGGCAGCTTTTCG
 GTTATACAGGAGCCATGTAAATGTGATTTGTGTAATTGAAGGTTAGGGAGTCCGCC [+691] ATG

A1

A2

A3

Pollen-Spezifität

tGTGGtt PBI Bate und Twell, 1998
 aGAAA Bate und Twell, 1998
 TCCACCATA Bate und Twell, 1998
 GTGA Roger et al., 2001

Enhancer

AGGTCA Q-Element Hamilton et al., 1998

Silencer

GACNAATGATA Box I Dzelzkalns et al., 1993
 GTTTTG Box II Dzelzkalns et al., 1993

Abb. 3-11: in silico Analyse des Promotors und der 5' nicht-translatierten Region des ZmPti1-Gens

Mit pollenspezifischer Genexpression assoziierte cis-Elemente in der Nukleinsäuresequenz des ZmPti1-Promotors. Promotorregion von -2.209 bis -1; 5'-untranslatierte Region (+1 bis +691, schwarzer Balken); Intron 1 (hellgrau hinterlegt); putativer Transkriptionsstart bei +1 G. Die Konsensussequenz der markierten cis-aktiven Elemente sind unten angegeben. Die AT-reiche Region ist unterstrichen. CCAAT-Box, TATA-Box sind markiert. Weitere Erläuterungen im Text.

Rechts als [graue Balken] sind die, von den drei ZmPti1-Promotor-Reporter-Gen-Konstrukten beinhalteten Promotorbereiche, angegeben.

3.3.2.2. Expressionsanalysen mit transient transfomierten *ZmPti1*-Promotorkonstrukten

Aufgrund der begrenzten Zahl bisher identifizierten Sequenzmotiven in den Promotoren polenspezifischer Gene, ist die isolierte computergestützte Analyse des *ZmPti1*-Promotors in Hinblick auf die Identifizierung von *cis*-aktiven Elementen schwierig. Eine gute Möglichkeit, regulativ wirkende DNA-Sequenzen im Promotorbereich einzugrenzen, bietet die transiente Expressionsanalyse. Hierbei wird das Zielgewebe mit Promotor-Reporter-Gen-Konstrukten transformiert und die transient gebildeten Reporter-Gen-Produkte quantitativ nachgewiesen. Die Bestimmung der Produktmenge erlaubt Rückschlüsse auf die Expressionsstärke des jeweils eingesetzten Promotorfragments im entsprechenden Gewebe. Als Reporter-Gene eignen sich Gene, die für ein stabiles und leicht nachweisbares Produkt codieren und dabei in den für die transiente Transformation verwendeten Geweben eine geringe endogene Hintergrundaktivität aufweisen.

In der von Jantjeline Kluth³⁹ im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Projektstudie, wurde das 1,8 kb große *E. coli* β -Glucuronidase-Gen *uidA* (JEFFERSON *et al.*, 1987) als Reporter-Gen zur Charakterisierung der *ZmPti1*-Promotoraktivität verwendet. Zur transienten Expressionsanalyse wurden drei verschiedene Abschnitte des *ZmPti1*-Promotors A1, A2 und A3 (vgl. Abb. 3-11 / 3-12) eingesetzt. Die verwendeten Promotorfragmente mit Längen von 2,9 kb, 2,0 kb und 1,4 kb enthalten zusätzlich zu den Promotorbereichen das nicht-translatierte Exon 1, das Intron 1 sowie den nicht-translatierten Bereich des Exons 2 und enden unmittelbar vor dem Startcodon des *ZmPti1*-ORFs (Abb. 3-13AB). Die Promotorfragmente wurden aus DNA des isolierten genomischen Phagenklons g24 amplifiziert⁴⁰ und über die Primer-internen *Pst*I/*Xba*I-Schnittstellen gerichtet vor das Reporter-Gen kloniert. Das Polyadenylierungssignal im Konstrukt liefert der *nos*-Terminator des *Nopalinsynthetase*-Gens (DEPICKER *et al.*, 1982). Die Klonierungsstrategie ist in Tab. 3-6 zusammenfassend dargestellt. Die für die Klonierungen genutzten, molekularbiologischen Standardmethoden sind im Kapitel 2.2. dokumentiert.

³⁹ Biozentrum Klein Flottbek und Botanischer Garten, Universität Hamburg

⁴⁰ Amplifikation der Promotorfragmente aus Phagen-DNA des genomischen *ZmPti1*-Phagenklons g24 mit den angegebenen Primern. Die von den Fragmenten umfassten Promotorbereiche sind angegeben:

A1 PRMMH101/100 [-2.201 bis +691] **A2** PRMMH102/100 [-1.377 bis +691] **A3** PRMMH103/100 [-726 bis +691]

Da bis vor kurzem kein geeignetes System zur Analyse transienter Expression in Maispollen etabliert war, wurden frühere Untersuchungen pollenspezifisch exprimierender Maispromotoren in heterologen Systemen durchgeführt. Mit der leicht modifizierten Methode nach SCHREIBER und DRESSELHAUS (2003) existiert seit kurzem ein System zur transienten Genexpression in *in vitro* gekeimten Mais- und anderen Pflanzenpollen. Zur biolistischen Transformation (2.2.12.2.1.) *in vitro* gekeimter Maispollen (2.2.2.1.) wurden zusätzlich zu den drei *ZmPti1*-Promotor-Reporter-Gen-Konstrukten (→ pA1:GUS:nos, pA2:GUS:nos und pA3:GUS:nos) zwei weitere Vektoren eingesetzt (Abb. 3-12C): als Positivkontrolle ein *uidA*-Konstrukt unter Kontrolle des konstitutiv exprimierenden *Ubiquitin*-Promotors aus Mais (→ pUbi:GUS:nos; CHRISTENSEN *et al.*, 1992), als Negativkontrolle ein *uidA*-Konstrukt ohne Promotorsequenz (→ p:GUS:nos). Neben der quantitativen Bestimmung der β -Glucuronidase in Pollen erfolgte ein histochemischer Nachweis der β -Glucuronidase -Aktivität in Maispollen und Maisembryonen.

ZmPti1-Promotorfragmente			Reporter-Gen + Terminator
A1	A2	A3	pUbi.cas (Dr. Reinhold Brettschneider ⁴¹)
PCR Amplifikation aus DNA des genomischen <i>ZmPti1</i> -Phagenklon g24			
<i>PRMMH 101/100</i>	<i>PRMMH 102/100</i>	<i>PRMMH 103/100</i>	<i>Pst</i> // <i>Xba</i> I-Verdau
Subklonierung der PCR-Amplifikate in <i>TOPO pCR</i> [®] 2			zum Entfernen des <i>Ubiquitin</i> -Promotors
→ TOPO 76-1	→ TOPO 76-3	→ TOPO 76-5	→ p:GUS:nos
<i>Pst</i> // <i>Xba</i> I Verdau			
Subklonierung der <i>Pst</i> // <i>Xba</i> I <i>ZmPti1</i> -Promotorfragmente in p:GUS:nos			siehe links
→ pA1:GUS:nos	→ pA2:GUS:nos	→ pA3:GUS:nos	

Tab. 3-6: Klonierungsstrategie zur Herstellung der *ZmPti1*-Promotor-Reporter-Gen-Konstrukte

Die jeweils aus den einzelnen Schritten resultierenden Vektoren sind in fett angegeben. Der Vektor *TOPO pCR*[®]2 stammt von der Firma Invitrogen (Karlsruhe).

⁴¹ Biozentrum Klein Flottbek und Botanischer Garten, Universität Hamburg

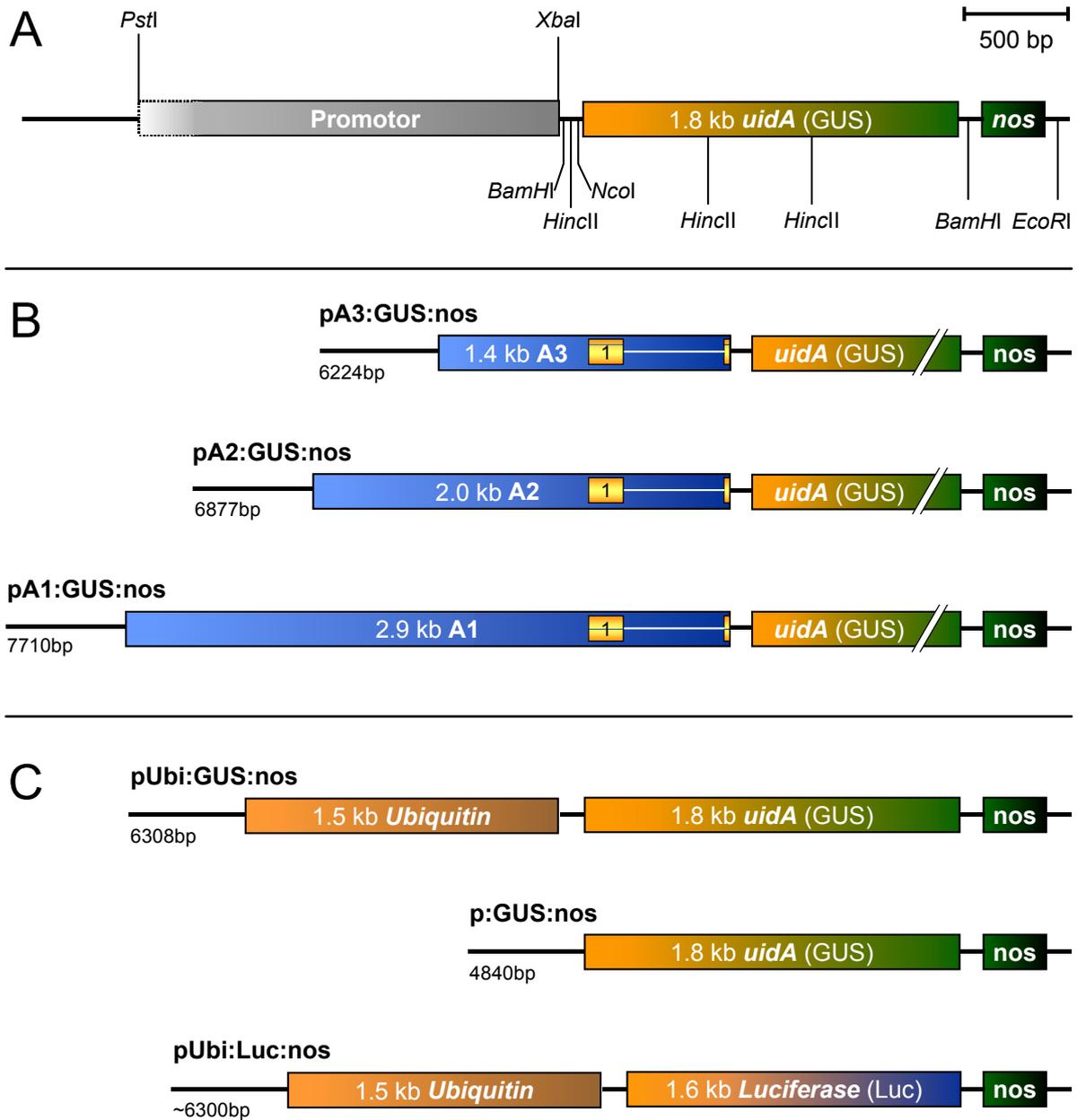


Abb. 3-12: Promotor-Reporter-Gen-Konstrukte für transiente Expressionsstudien des *ZmPti1*-Promotors

A Schematischer Aufbau der verwendeten Konstrukte: vor das *uidA*-Reporter-Gen wurden verschiedene Promotorbereiche kloniert. Der *nos*-Terminator des *Nopalinsynthetase*-Gens liefert das Polyadenylierungssignal. Einige Restriktionsschnittstellen sind angegeben.

B Zur Analyse der Expressionsstärke und -spezifität des *ZmPti1*-Promotors wurden drei *ZmPti1*-Promotor-Reporter-Gen-Konstrukte hergestellt: A1, A2 und A3. Diese unterscheiden sich in ihrer Länge am 5' Ende. Alle Bereiche beinhalten die 5' nicht-translatierte Region des *ZmPti1*-Gens bis zum Translationsstart.

C Als Positivkontrolle wurde das *uidA*-Gen unter Kontrolle des konstitutiv exprimierenden *Ubiquitin*-Promotors [pUbi:GUS:nos], als Negativkontrolle ein Konstrukt ohne Promotor [p:GUS:nos] verwendet. Zur Normalisierung der Transformationseffizienz wurden für die quantitative Bestimmung der GUS-Aktivität das unter Kontrolle des *Ubiquitin*-Promotors stehende *Luciferase*-Gen [pUbi:Luc:nos] co-transformiert.

Histochemischer Nachweis der β -Glucuronidase-Aktivität

Der histochemische GUS-Nachweis (2.2.12.3.1.) mit transformierten Pollen der Linie A188 zeigt, dass alle drei *ZmPti1*-Promotorfragmente und der *Ubiquitin*-Promotor in Pollen aktiv sind (Abb. 3-13). Nach sechs Stunden Substratinkubation war die GUS-Aktivität als Blaufärbung sowohl in Pollenkörnern als auch in den *in vitro* ausgekeimten Pollenschläuchen sichtbar. In den unbeschossenen Nullkontrollen (nicht abgebildet) wurde keine GUS-Aktivität nachgewiesen. Eine vergleichende Aussage über die Expressionsstärke der einzelnen Promotorkonstrukte kann aufgrund von histochemischen Analysen nicht gemacht werden.

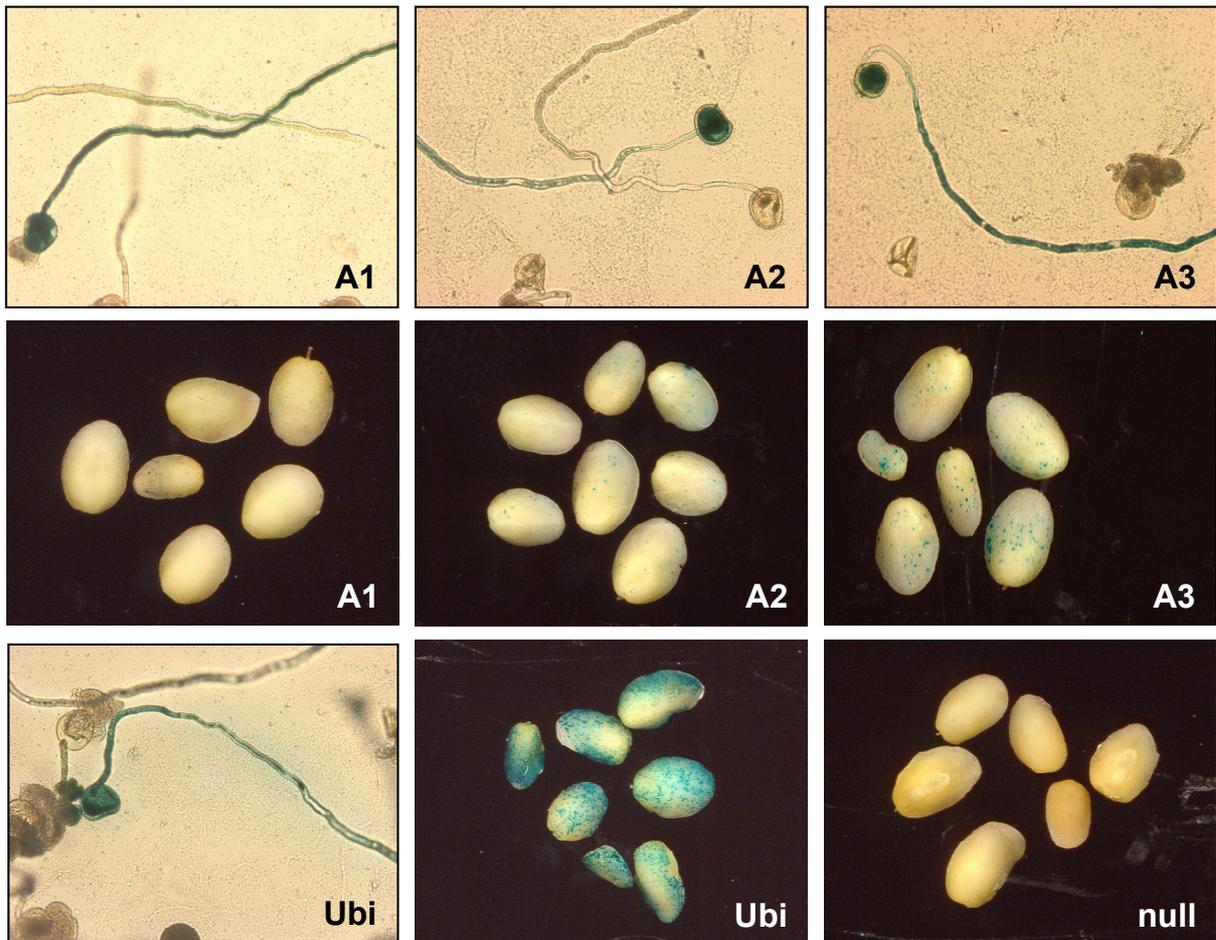


Abb. 3-13: Histochemischer GUS-Nachweis in transient transformierten Pollen und Embryonen

in vitro gekeimter Maispollen der Linie A188 und zehn Tage alte Embryonen aus Kreuzungen zwischen den Linien A188 und H99 wurden mit den *ZmPti1*-Promotor-Reportergen-Konstrukten pA1:GUS:nos [A1], pA2:GUS:nos [A2], pA3:GUS:nos [A3], dem *Ubiquitin*-Promotor getriebenen Kontrollkonstrukt pUbi:GUS:nos [Ubi] und dem promotorlosen Konstrukt p:GUS:nos [null] biolistisch transformiert. Pollen wurden nach der Transformation ü.N. bei RT prä-inkubiert. Der Nachweis der β -Glucuronidase-Aktivität erfolgte durch Inkubation in Gegenwart des Substrats X-Gluc für sechs (Pollen) bzw. 24 Stunden (Embryonen).

Die drei *ZmPti1*-Promotorbereiche A1, A2 und A3 sind in *in vitro* gekeimten Pollen aktiv. Signifikante Unterschiede in der GUS-Aktivität - auch in bezug auf die Positivkontrolle [Ubi] - sind nicht feststellbar. In Embryonen ist eine - verglichen mit der Positivkontrolle [Ubi] - geringe GUS-Aktivität dieser Konstrukte nachweisbar, die jedoch mit abnehmender Länge des *ZmPti1*-Promotor-Fragments zunimmt. Die Nullkontrolle [null] zeigt keine histochemisch nachweisbare GUS-Aktivität.

Aufnahmen: Jantjeline Kluth, Biozentrum Klein Flottbek und Botanischer Garten, Universität Hamburg

Der histochemische GUS-Nachweis mit transformierten Pollen der Linie *A188* zeigt, dass alle drei *ZmPti1*-Promotorfragmente und der *Ubiquitin*-Promotor in Pollen aktiv sind (Abb. 3-13). Nach sechs Stunden Substratinkubation war die GUS-Aktivität als Blaufärbung sowohl in Pollenkörnern als auch in den *in vitro* ausgekeimten Pollenschläuchen sichtbar. In den unbeschossenen Nullkontrollen (nicht abgebildet) wurde keine GUS-Aktivität nachgewiesen.

Zur Überprüfung der gewebespezifischen Aktivität der eingesetzten *ZmPti1*-Promotorbereiche wurden zehn Tage alte Maisembryonen (Linie *A188* x *H99*) ebenfalls biolistisch transformiert (2.2.12.2.2.; Abb 3-13). Die optische Auswertung der Blaufärbung ergab, dass mit den beiden längeren Promotorkonstrukten pA1 und pA2 nur relativ schwache GUS-Aktivität in den Embryonen auftritt, bei dem kürzesten Promotorkonstrukt pA3 hingegen tritt eine stärkere Blaufärbung auf. Wesentlich höhere GUS-Aktivitäten wurden für konstitutiven Referenz-Promotor *Ubiquitin* gefunden. Ein GUS-Konstrukt ohne Promotor p:GUS:nos führt nicht zu einer detektierbaren GUS-Expression (Abb. 3-13 2E). Wie der histochemische GUS-Nachweis zeigt, scheint die Gewebespezifität der *ZmPti1*-Promotorbereiche A1, A2 und A3 mit zunehmender Verkürzung des 5' Promotorbereiches abzunehmen. Eine Grundaktivität ist jedoch bei allen *ZmPti1*-Promotor-Reporter-Gen-Konstrukten vorhanden.

Quantitative Bestimmung der GUS-Aktivität

Da aufgrund der histochemischen GUS-Färbung bei Pollen keine Quantifizierung der GUS-Aktivität möglich war, wurden Enzymassays mit Gesamtproteinextrakten der transformierten Pollen durchgeführt. Zur Normalisierung der am Luminometer gemessenen GUS-Aktivitäten gegen die Effizienz der Transformation wurde ein, unter Kontrolle des konstitutiv exprimierenden *Ubiquitin*-Promotors stehendes, *Luciferase*-Gen aus *Photinus pyralis* als zweites Reporter-Gen-Konstrukt (\rightarrow pUbi:Luc:nos) co-transformiert. Durch Messung beide Enzymaktivitäten, GUS und *Luciferase*, konnte dann die GUS-Aktivität zur Transformationseffizienz ins Verhältnis gesetzt werden.

In drei unabhängigen Experimenten wurden fünf Konstrukt-Kombinationen⁴² eingesetzt, welche jeweils in sechs Parallelansätzen biolistisch in keimenden Pollen der Linie *A188* transformiert wurden. Am Folgetag wurden die Gesamtproteine aus den Pollen extrahiert und in Enzymassays zur luminometrischen Bestimmung der GUS- und *Luciferase*-Aktivität eingesetzt (2.2.12.3.2.). Zur Bestimmung des Hintergrunds wurden Gesamtproteinextrakte aus unbeschossenen *in vitro* keimenden Pollen verwendet. Die GUS-Aktivitäten wurden nach Abzug der Hintergrundaktivität gegen die gemessene *Luciferase*-Aktivität normalisiert und

⁴² jedes der fünf Promotor-Reporter-Gen-Konstrukte + pUbi:Luc:nos

gemittelt. Die GUS-Aktivität im Proteinextrakt der mit pUbi:GUS:nos transformierten Pollen (Positivkontrolle) wurden jeweils gleich 100% gesetzt. Die GUS-Aktivitäten der anderen vier Konstrukte wurden anteilig hierzu berechnet (Abb. 3-14).

In drei unabhängigen Experimenten konnte im Vergleich zum *Ubiquitin*-GUS-Konstrukt mit allen drei *ZmPti1*-Promotorfragmenten nur eine relativ geringe GUS-Aktivität festgestellt werden. Die durchschnittlich höchste GUS-Aktivität konnte mit 17,21% in Pollenextrakten der pA2:GUS:nos-Transformation gefunden werden. Zu beachten ist dabei jedoch, dass der gemittelte Wert durch einen hohen Einzelwert (34,19%) aus dem ersten Versuch positiv beeinflusst wird und deshalb einen hohen Fehler besitzt (12,05%). Die *ZmPti1*-Promotorfragmente A1 und A3 führen zu wesentlich geringeren GUS-Aktivitäten von 8,15% (Fehler 1,93%) und 6,88% (Fehler 2,28%). Diese GUS-Aktivitäten liegen nur wenig höher als die GUS-Aktivität in Pollen, der zuvor mit einem promotorlosen p:GUS-Konstrukt transformiert wurde (3,88%, Fehler 1,39%).

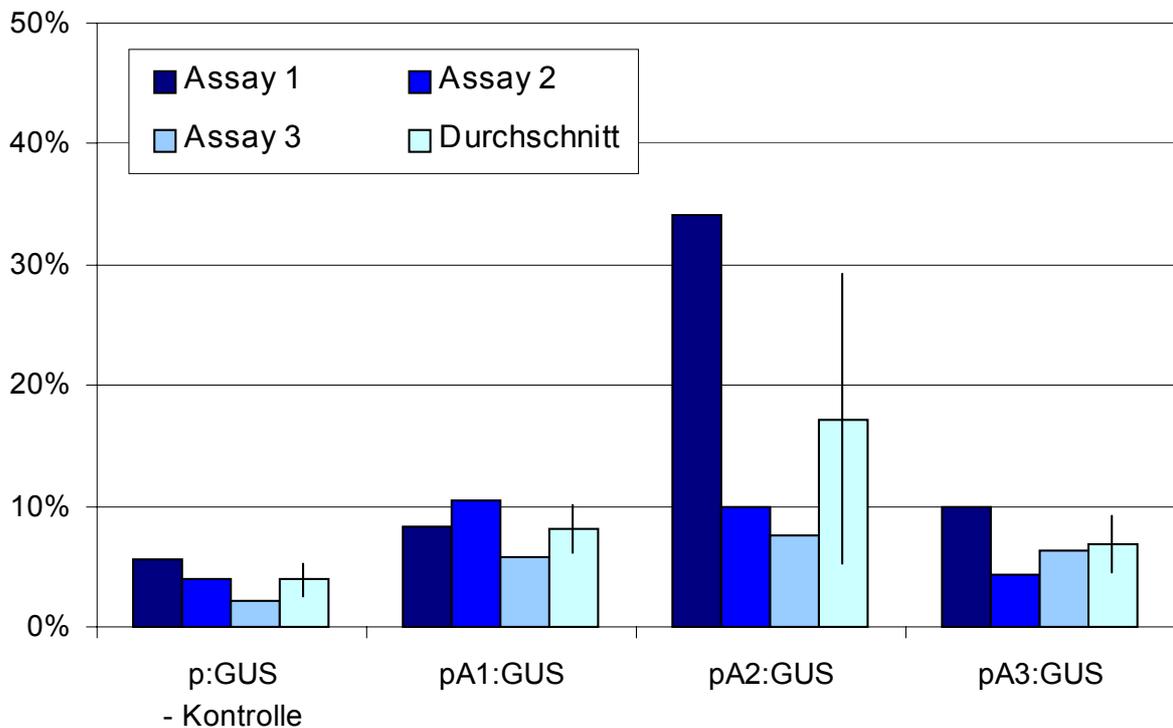


Abb. 3-14: GUS-Aktivitäten in Proteinextrakten von transient transformierten *in vitro* gekeimten Pollen

Nach der transienten Transformation von Maispollen der Linie A188 mit verschiedenen Promotor-Reporter-Konstrukten wurden die GUS-Aktivitäten in Enzymassays bestimmt und luminometrisch gemessen. Die gegen die Transformationseffizienz normalisierten Aktivitäten sind zu der GUS-Aktivität des *uidA*-Reporterkonstrukts unter Kontrolle des konstitutiv exprimierenden *Ubiquitin*-Promotors (100%) in Relation gesetzt. Drei Enzymassays [Assay 1, 2 und 3] mit jeweils sechs Parallelansätzen je Konstrukt wurden ausgewertet. Der errechnete Durchschnitt (hellblauer Balken) und der Fehler ist angegeben.

Die für die Transformationen eingesetzten Promotor-Reporter-Konstrukte sind (vgl. Abb. 3-12):

[p:GUS] Negativkontrolle, promotorlos; [pA1:GUS], [pA2:GUS] und [pA3:GUS] *uidA*-Gen jeweils unter Kontrolle eines der drei *ZmPti1*-Promotorfragmente A1, A2 oder A3.

3.3.3. Expression des ZmPTI1-Proteins

Die vorangehenden Experimente haben gezeigt, dass das *ZmPti1*-Gen fast ausschließlich in Pollen exprimiert wird. Inwieweit sich diese starke transkriptionelle Genexpression auch auf Proteinebene widerspiegelt kann durch *Western* Analysen untersucht werden.

3.3.3.1. Überexpression des rekombinanten ZmPTI1-6His-Fusionsproteins

Um Experimente zum Nachweis des ZmPTI1-Proteins durchzuführen, war zuvor die Generierung eines gegen das *ZmPti1*-Genprodukt gerichteten Antikörpers notwendig. Zu dessen Synthese wurde zunächst das ZmPTI1-Protein als His-Tag-Fusionsprotein in *E. coli* überexprimiert. Hierzu wurde der offene Leserahmen der *ZmPti1*-cDNA per *PCR* amplifiziert⁴³ und nach Verdau mit den Endonukleasen *NdeI* und *NotI* in einen entsprechend linearisierten Expressionsvektor (*pET-30a*; Novagen/Merck Biosciences, Schwalbach) kloniert (→ *pET-30:Pti1*, 2.2.5.1.).

Nach Transformation des Expressionsvektors *pET-30:Pti1* in den *E. coli*-Stamm *BL21(DE3)* (QIAGEN, Hilden) konnte kein rekombinantes ZmPTI1-His-Fusionsprotein (ZmPTI1-6His) exprimiert werden. Als eine mögliche Ursache hierfür wurde die unterschiedliche Codon-Verwendung in Prokaryoten und Eukaryoten angenommen⁴⁴, die durch die Verwendung des *E. coli*-Stamms *Rosetta(DE3)* (Novagen/Merck Biosciences, Schwalbach) kompensiert wurde⁴⁴. Zum Nachweis der IPTG-induzierten Expression wurde das His-markierte Protein unter denaturierenden Bedingungen durch Ni-NTA-Affinitätsaufreinigung isoliert (2.2.5.2.), in einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE, 2.2.5.7.) aufgetrennt und auf Nitrocellulosemembranen übertragen (2.2.5.9.). Das etwa 41 kDa große, rekombinante ZmPTI1-6His-Fusionsprotein konnte mittels eines His-Tag Antikörpers (Novagen/Merck Biosciences, Schwalbach) in *Western* Analysen detektiert werden (2.2.5.10.).

Das synthetisierte ZmPTI1-6His entspricht mit circa 41 kDa der berechneten Proteingröße (Abb. 3-15). Die Fusion des His-Tags an den C-Terminus des rekombinanten ZmPTI1-Proteins gewährleistet, dass nur vollständige Fusionsproteine an die Ni-NTA-Matrix binden. Das aufgereinigte rekombinante ZmPTI1-6His wurde zur Synthese eines polyklonalen Antikörpers eingesetzt.

⁴³ Amplifikation mit den Primern *PRMMH55* 5'-GGAGTCGCATATGGGATGCTTTTCATGCTG-3' und *PRMMH64* 5'-GCGATGGCGGCCGCCAGTCCGGATCGCTCGGCAGC-3' vom *ZmPti1*-cDNA-Klon cSHD56_3

⁴⁴ nur 3% der Argininbindenden transfer-RNAs in *E. coli* weisen das zum AGG passende Anticodon auf, das in ZmPTI1 für fast ein Drittel aller Arginine codiert.; *Rosetta(DE3)* trägt das zusätzliche Plasmid *pRARE* auf dem tRNAs mit Isoakzeptoren für solche Anticodons codiert sind, die in *E. coli* sonst selten vorkommen.

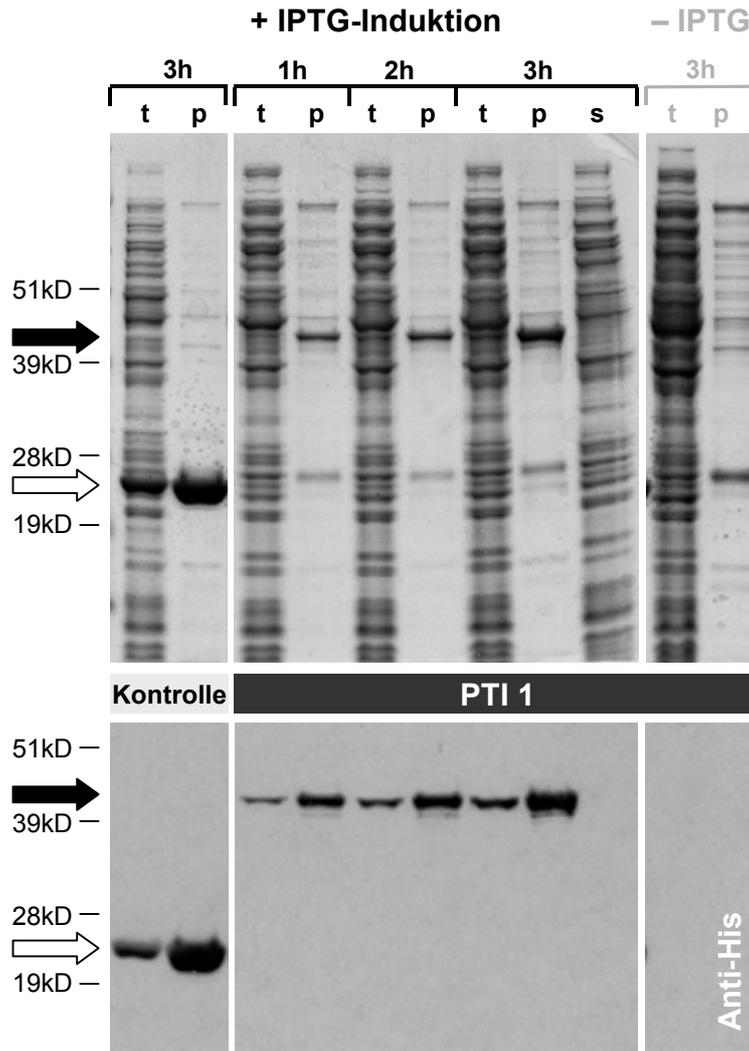


Abb. 3-15: Überexpression von rekombinatem ZmPTI1-6His: SDS-PAGE und immunologischer Nachweis

Oben In der SDS-PAGE aufgetrennte Proteinextrakte mit rekombinatem Kontrollprotein (weißer Pfeil, Maus-DHFR, 26kD) und ZmPTI1-6His-Fusionsprotein (schwarzer Pfeil, 41kD) ein bis drei Stunden nach IPTG-Induktion. Rechts: Proteinextrakte der nicht induzierten ZmPTI1-6His-Kultur. [t] Gesamtprotein aus 100 µl Kultur, [p] Ni-NTA-Affinitätsmatrix-aufgereinigte Proteinextrakte aus 1000 µl Kultur und [s] Extrakt der nicht-Ni-NTA-gebundenen Proteine aus 100 µl Kultur.

Unten Nachweis des rekombinanten ZmPTI1-6His durch *Western* Blot mit His-Tag-Antikörper: Mit zunehmender Kulturdauer steigt die Ausbeute an ZmPTI1-6His an. Unter denaturierenden Bedingungen wird ZmPTI1-6His vollständig durch Bindung an die Ni-NTA-Matrix aus dem Gesamtextrakt entfernt (kein ZmPTI1-6His in [s]). In der nicht-induzierten Kontrollkultur wird kein ZmPTI1-6His gebildet.

3.3.3.2. Synthese eines polyklonalen Antikörpers gegen ZmPTI1

Die Synthese eines gegen ZmPTI1 gerichteten polyklonalen Antikörpers wurde in zwei Kaninchen von der Firma Biogenes (Berlin) durchgeführt (2.2.5.8.). Um die Sensitivität des gewonnenen Antiserums zu erhöhen, wurde nach einem ersten Immunisierungsdurchlauf mit insgesamt 700 mg rekombinantem ZmPTI1-6His je Tier ein zweiter Immunisierungsdurchlauf mit weiteren 300 mg Protein durchgeführt.

Die erhaltenen Antiseren der beiden Tiere #5221 und #5222 wurden hinsichtlich ihrer immunogenen Aktivität gegen das ZmPTI1-Protein getestet (Abb. 3-16B). Hierzu wurden die Spezifitäten sowie die einzusetzenden Konzentration der Antiseren durch *Western* Analysen (2.2.5.8.1.) mit rekombinantem ZmPTI1-6His (2.2.5.2.) und Pollengesamtprotein (2.2.5.6.) ermittelt.

Die Funktionalität der beiden Antiseren konnte sowohl für den Nachweis des rekombinanten ZmPTI1-6His als auch für ZmPTI1 in Pollengesamtprotein festgestellt werden. Die im *E.coli* Gesamtprotein ebenfalls nachgewiesenen Bakterienproteine stören bei *Western* Detektionen in Pflanzenextrakten nicht (vgl. Abb. 3-16 A/B). Kontrollen der immunogenen Aktivität des Präimmunserums⁴⁵ zeigten kaum Kreuzreaktionen mit anderen Proteinen aus *E. coli* oder aus Pollen. Für alle nachfolgenden Experimente zum Nachweis des natürlich vorkommenden ZmPTI1 in Proteinextrakten aus Maisgeweben wurde das Antiserum des Tiers #5222 in den Konzentrationen 1:250 bis 1:500 als primärer Antikörper eingesetzt.

⁴⁵ es wurde vor der ersten Immunisierung aus den Kaninchen gewonnen

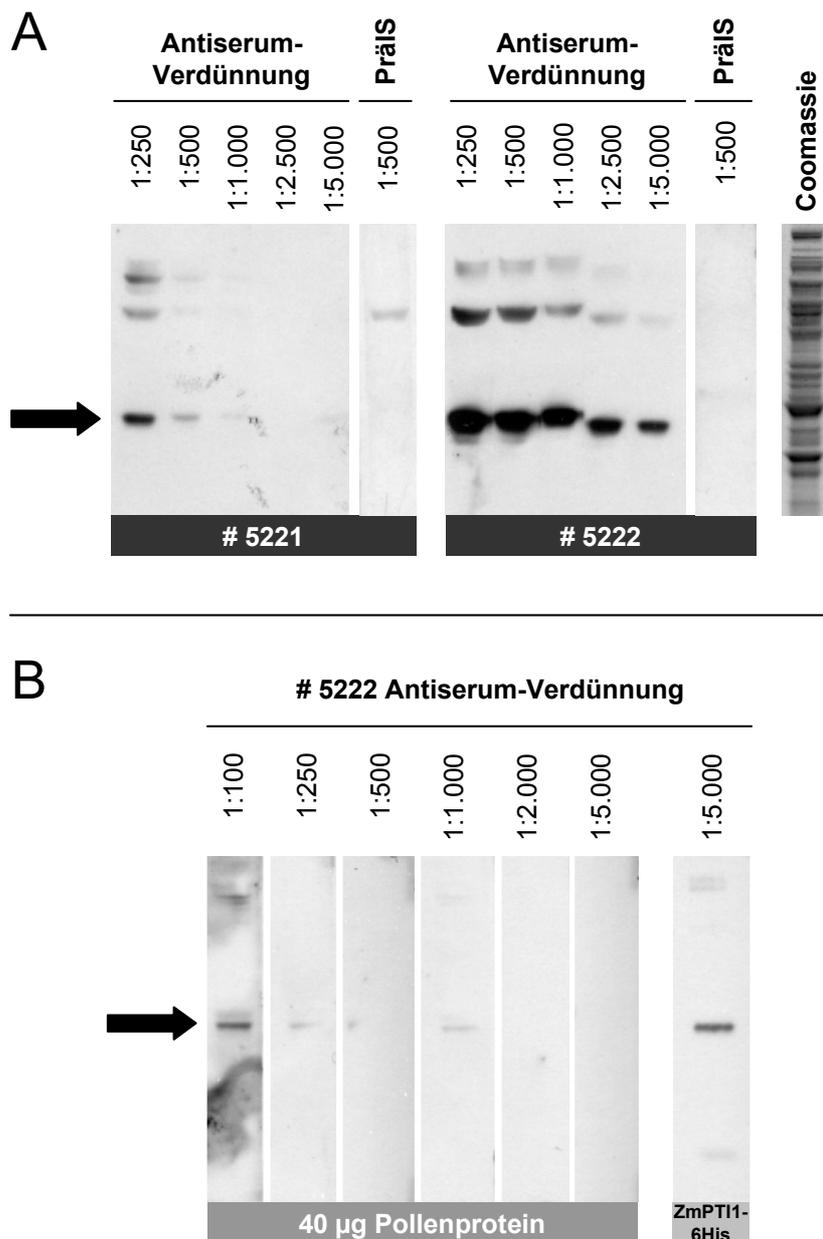


Abb. 3-16: Test der polyklonalen Antikörper gegen ZmPTI1

A *Western* Detektionen des rekombinanten ZmPTI1-6His [schwarzer Pfeil, ~41 kD] in Gesamtproteinextrakten von je 100 µl Bakterien-Expressionskultur mit den angegebenen Verdünnungen der Antiseren aus den Kaninchen #5221 und #5222. Beide Antiseren sind funktionell, die immunogene Aktivität des Antiserums #5222 ist jedoch höher. Die *Western* Detektion mit dem Präimmunsereum [Präis] zeigt kaum immunogene Hintergrundaktivität bei dem Antiserum #5222. [Coomassie] Coomassiegefärbter Gesamtproteinextrakt aus 100µl Bakterien-Expressionskultur.

B Das ZmPTI1-sensitivere Antiserum #5222 wurde in den angegebenen Konzentrationen zum *Western* Nachweis von natürlich vorkommendem ZmPTI1 [schwarzer Pfeil] in Pollengesamtprotein eingesetzt. ZmPTI1 wird bei Antiserenkonzentrationen von 1:1000 und höher detektiert. Für weitere *Western* Detektionen in Maisgeweben wurde das Antiserum #5222 in Konzentrationen von 1:500 bis 1:250 eingesetzt.

Die Positivkontrolle [ZmPTI1-6His] zeigt den Nachweis von 100 ng aufgereinigtem, rekombinantem ZmPTI1-6His.

3.3.3.3. **Western Analyse von ZmPTI1 in Proteinextrakten verschiedener Maisgewebe**

In *Western* Analysen mit dem polyklonalen Antikörper gegen ZmPTI1 (3.3.3.2) sollte in Gesamtproteinextrakten unterschiedlicher Maisgewebe das Vorkommen des ZmPTI1-Proteins untersucht werden (Abb 3-17). Im wesentlichen wurden Proteinextrakte aus Geweben gewonnen, deren Gesamt-RNAs bei dem Nachweis von *ZmPti1*-Transkripten bereits im *Northern* (3.3.1.1) eingesetzt worden waren. Hierdurch sollte ein direkter Vergleich zwischen Transkript- und Proteinmenge ermöglicht werden, der erste Anhaltspunkte auf die Regulation der *ZmPti1*-Expression geben könnte.

ZmPTI1 konnte in sich entwickelnden männlichen Blüten, reifem Pollen und mit Pollen bestäubter Seide nachgewiesen werden. In sich entwickelnden männlichen Blüten nimmt die ZmPTI1-Menge im Verlauf der Pollenreifung zu. Während in männlichen Blüten neun bis sechs Tage vor der Anthesis noch kein ZmPTI1 detektierbar ist, kann das ZmPTI1-Protein drei Tage vor Anthesis und zum Zeitpunkt der Anthesis nachgewiesen werden. Auch in Pollen können größere ZmPTI1-Proteinmengen detektiert werden. Ein direkter Vergleich der ZmPTI1-Mengen in Proteinextrakt aus sich entwickelnden Pollen und aus reifem Pollen ist aufgrund der komplexen Gewebezusammensetzung des Blütengewebes, bestehend aus reifen und sich entwickelnden Pollen sowie dem umgebenden Blütengewebe, nicht möglich.

Da bei der Proteinextraktion aus sechs Stunden nach Pollinierung geernteter Seide ([Seide, polliniert] in Abb. 3-17) die eingesetzten Pollen mit aufgearbeitet wurden, kann das detektierte ZmPTI1 aus der Seide aber auch aus dem Pollen stammen. Letzteres scheint wahrscheinlicher, da in unpollinierter Seide weder *ZmPti1*-Transkripte (vgl. Abb 3-9, 3.3.1.1) noch ZmPTI1-Protein ([Seide, 6 daa] in Abb. 3-17) nachgewiesen werden konnten. Nicht ausgeschlossen werden kann, dass durch die Pollinierung in Seide eine *ZmPti1*-Expression induziert wird.

Der verwendete polyklonale Antikörper erkennt neben ZmPTI1 weitere Proteine. Mit dem korrespondierenden Präimmenserum wurden hingegen keine Proteine in Gesamtproteinen detektiert (Daten nicht gezeigt). Es ist nicht auszuschließen, dass es sich bei den zusätzlich mit dem Antiserum detektierten Proteinen z.B. um Proteinkinasen handelt, deren hochkonservierten Kinasedomäne bzw. Kinasesubdomänen der polyklonale Antikörper ebenfalls binden könnte: Die *Western* Detektion des rekombinant überexprimierten Tomate-*Pti1*-Genprodukts LePTI1(K96N) (3.3.4) mit dem ZmPTI1-Antiserum ist möglich⁴⁶.

⁴⁶ persönliche Mitteilung Melanie Rose, Biozentrum Klein Flottbek und Botanischer Garten, Universität Hamburg

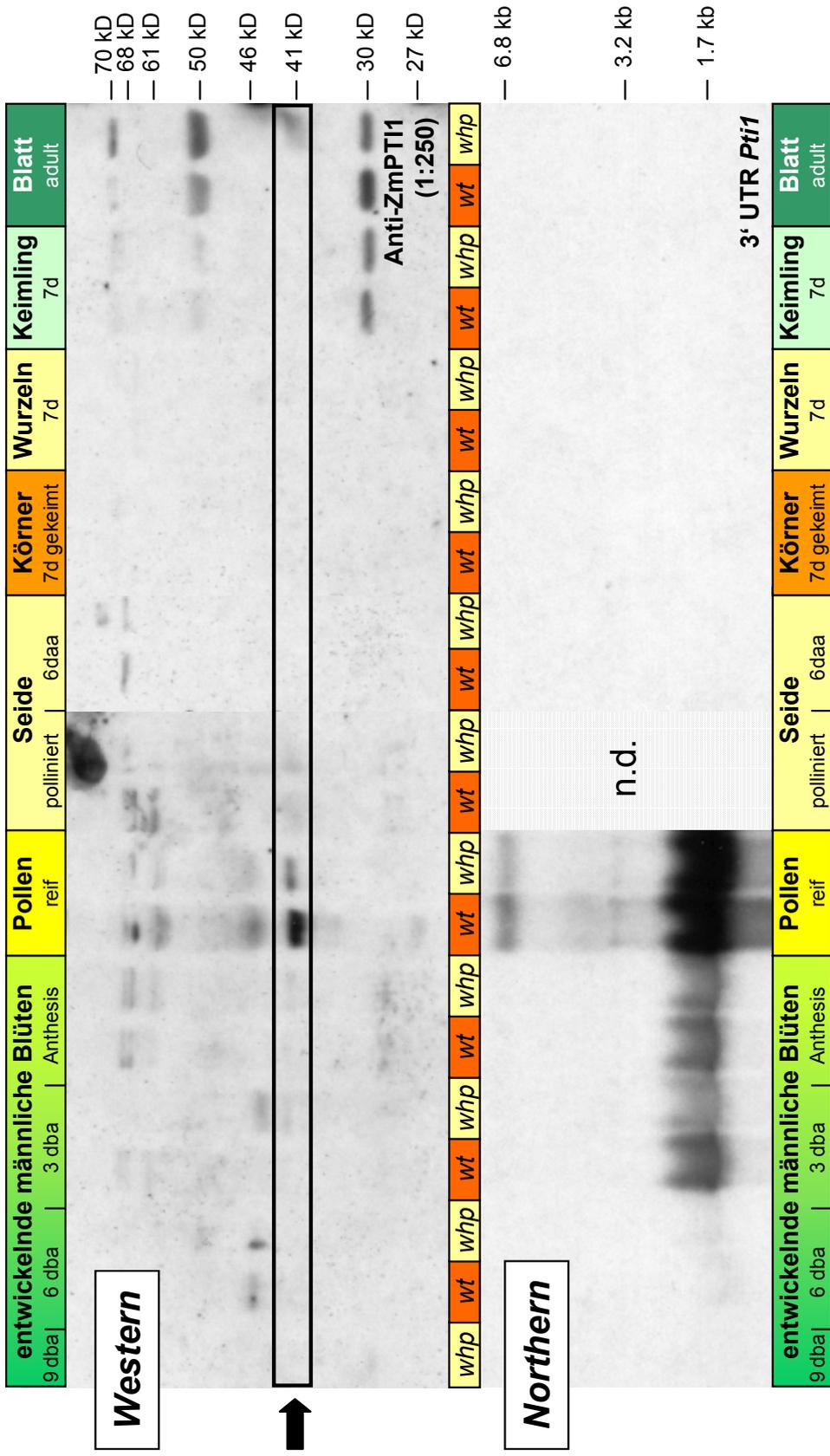


Abb. 3-17: Western Detektion des endogenen ZmPT11 in verschiedenen Maisgeweben
Oben ZmPT11 (Pfeil) wird in Gesamtproteinextrakt (40 µg je Spur) aus späten Entwicklungsstadien männlicher Blüten, reifem Pollen sowie pollinierter Seide (6h nach Pollinierung) mit dem ZmPT11-Antikörper nachgewiesen. Unterschiede der ZmPT11-Proteinmenge im *Wildtyp* und *whp*-Genotyp sind auf ungleiche Belastung zurückzuführen. Die durch Regression ermittelten Größen prominenter Proteine sind angegeben.
Unten Northern Nachweis der *ZmPt11*-Transkripte in den zur Western Analyse korrespondierenden Geweben (vgl. Abb. 3-9).
 [dba] Tage vor Anthesis, [daa] Tage nach Anthesis, [dap] Tage nach Pollinierung, [d] Tage, [wf] *Wildtyp* Genotyp (*C₂/C₂whp/whp* und *C₂/C₂whp/whp*), [*whp*] *white pollen* Genotyp (*C₂/C₂whp/whp*).

Um zu überprüfen, ob die ZmPTI1-Expression translational reguliert ist und/oder von der Pollenkeimung abhängig ist wurde untersucht, ob die ZmPTI1-Proteinmenge während der Pollenkeimung ansteigt. Hinweise für derartige Regulationsmechanismen sind von MASCA-RENHAS (1993), STORCHOVA *et al.* (1994), STADLER *et al.* (1999), HULZINK *et al.* (2002) sowie JOHNSON und PREUSS (2003) beschrieben worden. Hierzu wurden ZmPTI1-Mengen in Proteinextrakten aus keimenden Pollen mit denen aus entwickelnden und reifen Pollen verglichen (Abb 3-18).

Wie in der *Western* Detektion zuvor (Abb 3-17), kann die im Vergleich zu isolierten Pollen relativ geringe ZmPTI1-Menge in sich entwickelnden Blütenständen ([Blüte, 0 dba] in Abb 3-18) ihre Ursache in der komplexeren Zusammensetzung dieses Gewebes haben. Das ZmPTI1-Signal im *Wildtyp*-Proteinextrakt ist aufgrund des unvollständigen Proteintransfers nur schwach zu sehen. In reifem und in 3 h *in vitro* gekeimtem Pollen (2.2.2.1.) gibt es keine signifikanten Unterschiede in der ZmPTI1-Proteinmenge (2.2.5.6.1). Es ist jedoch vorstellbar, dass Proteine aus der Seide eine stimulierende Wirkung auf die ZmPTI1-Menge im keimenden Pollen besitzen könnten. Um diese Möglichkeit zu überprüfen, wurde Pollen in Flüssigmedium in Gegenwart von Proteinextrakt aus Seide ausgekeimt (2.2.2.1.).

Eine stimulierende Wirkung der Seideproteine auf die ZmPTI1-Menge war unter den gewählten Versuchsbedingungen nicht nachweisbar. 3 h nach Induktion der Keimung nimmt die ZmPTI1-Menge scheinbar leicht ab. Die geringere Proteinmenge ist nicht auf die Beladung des Gels zurückzuführen. Auch die Änderung der Zusammensetzung des Pollenextrakts durch die Zugabe von Seideproteinen kann vernachlässigt werden. Vortests haben gezeigt, dass die dem Keimmedium zugesetzten Seideproteine vor der eigentlichen Proteinextraktion aus den gekeimten Pollen annähernd quantitativ entfernt werden. Eine mögliche Ursache für die verringerte ZmPTI1-Menge wäre z.B. ein Abbau des ZmPTI1 durch Proteasen des Seideextrakts während der Keimung.

Eine sehr starke Abnahme der ZmPTI1-Menge ist in Pollen 18 Stunden nach Beginn der *in vitro* Keimung zu beobachten. Diese Abnahme kann nur zum Teil mit einer etwas geringeren Beladung des Gels erklärt werden. Möglicherweise ist auch die Abnahme der ZmPTI1-Menge nach 18 h auf unspezifische oder proteasevermittelte Degradation zurückzuführen.

Die durchgeführten *Western* Analysen zeigen, dass das ZmPTI1-Protein nur in späten Stadien der Blütenentwicklung sowie in reifen Pollen in detektierbaren Mengen vorhanden ist. Es ist sehr wahrscheinlich, dass das nachgewiesene ZmPTI1-Protein in sich entwickelnden Blüten allein auf die spezifische Expression in den enthaltenen Pollen zurückzuführen ist. Damit korreliert die Expression auf Proteinebene mit dem Transkriptionsmuster des *ZmPti1*-Gens (3.3.1.1). In den ersten 3 Stunden nach dem *in vitro* Auskeimen der Pollen verändert

3.3.4. Funktionsanalyse von ZmPTI1

Wie in Abschnitt 3.2 bereits angeführt, erscheint eine ausschließliche Funktion des ZmPTI1 aus Mais im Rahmen der Pathogenabwehr aufgrund des Expressionsmusters schwer vorstellbar. Deshalb ist eine Funktionsaufklärung des Mais-PTI1 von großem Interesse.

In Tomate besitzen die beiden Serin/Threonin-Proteinkinasen LePTO und LePTI1 *in vitro* Autophosphorylierungsaktivität (LOH und MARTIN, 1995; ZHOU *et al.*, 1995). Diese geht in beiden Kinasen verloren, wenn das hochkonservierte Lysin der Kinasesubdomäne II (vgl. 3.2.2.1) gegen ein Glutamin (\rightarrow LePTO(K69Q), LOH und MARTIN, 1995) bzw. Asparagin (\rightarrow LePTI1(K96N), ZHOU *et al.*, 1995) ausgetauscht wird.

LePTO ist in der Lage LePTI1 zu phosphorylieren. Der Ausfall dieser *trans*-Kinaseaktivität führt ebenfalls zum Verlust der Interaktionsfähigkeit mit LePTI1. LePTO wird hingegen nicht durch LePTI1 phosphoryliert (ZHOU *et al.*, 1995). Putative *in vivo* und *in vitro* Phosphorylierungssubstrate von LePTI1 konnten bisher nicht identifiziert werden (BOGDANOVE und MARTIN, 2000).

In Experimenten sollte gezeigt werden, ob es sich bei ZmPTI1 um eine funktionelle Kinase handelt. Zunächst wurde hierfür untersucht, ob ZmPTI1 eine Autophosphorylierungsaktivität besitzt und durch die Tomate-Kinasen LePTO und LePTI1 *trans*-phosphoryliert werden kann. Mit dem Ziel, erste Anhaltspunkte für eine *in vivo* Funktion des Mais-PTI1 zu liefern, wurden weitere Kinase Assays durchgeführt, in denen eine mögliche Phosphorylierung von ZmPTI1 durch Gesamtproteinextrakte verschiedener Maisgewebe untersucht wurde.

3.3.4.1. Überexpression von rekombinantem ZmPTI1(K100N)-6His-Fusionsprotein

Bei der Durchführung von Kinase Assays (3.3.4.2) zum Nachweis einer möglichen Phosphorylierungsaktivität des PTI1 aus Mais wurden zwei verschiedene ZmPTI1-Proteine verwendet. Neben dem rekombinanten ZmPTI1-6His-Fusionsprotein (3.3.3.1), welches, abgesehen von seinem His-Tag, dem natürlich vorkommenden Mais-PTI1 entspricht, wurde ein weiteres, modifiziertes ZmPTI1-6His-Fusionsprotein in *E. coli* überexprimiert: Bei diesem ZmPTI1 wurde in der Kinasesubdomäne II das hochkonservierte Lysin¹⁰⁰ durch ein Asparagin¹⁰⁰ ersetzt. Ein Austausch des, an dem Phosphotransfer scheinbar direkt beteiligten, Lysins verschiedener Kinasen (vgl. 3.2.2.1, Abb. 3-6) führt nach ZOLLER *et al.* (1981), KAMPS *et al.* (1984) und RUSSO *et al.* (1985) zur vollständigen Inhibierung der Phosphorylierungsaktivität. Der Austausch erfolgte ausgehend vom Expressionsvektor des ZmPTI1-6His (pET-30:Pti1,

vgl. 3.3.3.1) durch *PCR* mit einem in der Sequenz modifizierten Primer⁴⁷. Das aus der *PCR* hervorgegangene Amplifikat wurde in den *pCR*[®]2.1-*TOPO* Vektor (Invitrogen, Karlsruhe) subkloniert. Anschließend konnte der für den Austausch vorgesehene Teil des offenen Leserahmens mit den Endonukleasen *Nde*I und *Hind*III ausgeschnitten und in einen ebenso restringierten pET-30:Pti1 übertragen werden. Der so entstandene Vektor pET-30:Pti1-(K100N) wurde teilweise sequenziert, um sicherzustellen, dass im modifizierten Leserahmen das Lysin durch Asparagin ersetzt worden war. Das so erhaltene Plasmid wurde für die Überexpression des rekombinanten ZmPTI1(K100N)-6His-Fusionsproteins, wie bereits für das rekombinante ZmPTI1-6His beschrieben (3.3.3.1), eingesetzt.

3.3.4.2. Kinase Assays

Zur Durchführung der Kinase Assays wurden rekombinante Kinasen aus Tomate und Mais nach Transformation der entsprechenden Vektoren (2.2.11.) einzeln im *E. coli* Stamm *Ro-setta*(DE3) (Novagen/Merck Biosciences, Schwalbach) überexprimiert (2.2.5.1.) und jeweils affinitätschromatografisch unter nativen Bedingungen aufgereinigt (2.2.5.3.; 2.2.5.4.; 2.2.5.5.). Die an der spezifischen Aufreinigungsmatrix immobilisierten, rekombinanten Proteinkinasen wurden alleine, in Kombinationen oder mit nativen Gesamtproteinextrakten unterschiedlicher Gewebe in Gegenwart von radioaktiv-markiertem γ -[³²P]-ATP inkubiert. Nicht eingebautes ATP und Proteine der Gesamtproteinextrakte wurden durch wiederholtes Waschen entfernt. Die Phosphorylierungsaktivität wurde qualitativ nach Auftrennung der an der Immobilisierungsmatrix verbliebenen Proteine mittels SDS-PAGE durch Autoradiografie bestimmt (2.2.5.11.1.).

Für die Kinase Assays standen als Positivkontrollen das autophosphorylierungsaktive PTO aus Tomate als Maltosebindeprotein-Fusion (→ MBP-LePTO, LOH und MARTIN, 1995) und das, durch einen Aminosäuretausch mutierte, autophosphorylierungsdefiziente PTI1 aus Tomate als Glutathion-S-Transferase-Fusionsprotein (→ GST-LePTI1(K96N), ZHOU *et al.*, 1995) zur Verfügung. Die entsprechenden Expressionsvektoren wurden freundlicherweise von Gregory B. Martin⁴⁸ zur Verfügung gestellt.

Aus Mais standen rekombinantes ZmPTI1 (→ ZmPTI1-6His, 3.3.3.1) sowie das, durch einen Aminosäureaustausch in der Kinasesubdomäne II, mutierte ZmPTI1(K100N) als His-Fusionsproteine (→ ZmPTI1(K100N)-6His, 3.3.4.1) zur Verfügung.

⁴⁷ *PRMMH84*: 5'-CTGGAGTCAAGCTTGTICACTGCAGATTTTCGTC^{3'}

⁴⁸ Boyce Thompson Institute for Plant Research and Department of Plant Pathology, Cornell University, Ithaca, New York 14853, USA

Die Affinitätsaufreinigung unter nativen Bedingungen erfolgte für MBP-LePTO mit *Amylose-Resin* (New England Biolabs, Frankfurt am Main; 2.2.5.4.) für GST-PTI1(K96N) mit *GST-Bind-Resin* (Novagen/Merck Biosciences, Schwalbach; 2.2.5.5.) sowie mit *Ni-NTA Magnetic Agarose Beads* (QIAGEN, Hilden; 2.2.5.3.) für das ZmPTI1-6His- und das ZmPTI1(K100N)-6His-Fusionsprotein. In einigen Assays wurden zusätzlich Gesamtproteinextrakte aus verschiedenen Maisgeweben verwendet (2.2.5.6.).

3.3.4.2.1. Phosphorylierungsassay des ZmPTI1

Wie bereits erwähnt (3.3.4), zeigten ZHOU *et al.* (1995), dass LePTI1 Autophosphorylierungsaktivität besitzt, welche durch einen Aminosäuretausch in der Kinasesubdomäne II von Lysin⁹⁶ zu Asparagin⁹⁶ verlorengelht. LOH und MARTIN (1995) zeigten in Kinase-Assays mit dieser autophosphorylierungsdefizienten LePTI1(K96N)-Mutante, dass LePTI1 durch LePTO *in vitro* phosphoryliert wird.

Die Experimente wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit mit den, aufgereinigten und immobilisierten rekombinanten Kinasen LePTO und LePTI1(K96N) wiederholt. In diesem Experiment konnten die publizierten Ergebnisse reproduziert und damit die Funktionalität des durchgeführten Assays bestätigt werden (Abb. 3-19). LePTO besitzt Autophosphorylierungsaktivität (Phosphorylierungssignal bei 78 kDa, Spur [1]). Dagegen phosphoryliert sich das modifizierte LePTI1(K96N) nicht (kein Phosphorylierungssignal bei 70 kDa, Spur [2]). Ferner ist LePTO in der Lage, die modifizierte Variante bei einer Co-Inkubation von LePTO und LePTI1(K96N) zu phosphorylieren (Spur [3]).

Wie aufgrund der theoretischen Proteinanalyse zu erwarten, besitzt das ZmPTI1-6His Autophosphorylierungsaktivität (Phosphorylierungssignal bei 41 kDa, Spur [4]). Diese Aktivität geht durch den Austausch des Lysin¹⁰⁰ gegen ein Asparagin im mutierten ZmPTI1(K100N)-6His, wie postuliert, verloren (Spur [5]).

Durch Co-Inkubation des mutierten ZmPTI1(K100N)-6His mit LePTO bzw. des phosphorylierungsaktiven ZmPTI1 mit modifiziertem LePTI1(K96N) sollte untersucht werden, ob *in vitro* eine wechselseitige Phosphorylierung der Kinasen aus Mais und Tomate erfolgt. Es konnte nur die Autophosphorylierungsaktivitäten der Proteine gezeigt werden (Spuren [6] + [7]). Unter den gewählten Bedingungen ist weder LePTO in der Lage das LePTI1-homologe ZmPTI1(K100N) zu phosphorylieren, noch findet eine Phosphorylierung von PTI1 aus Tomate durch ZmPTI1 statt.

Trotz der sehr großen Ähnlichkeit der beiden PTI1-homologen Kinasen aus Tomate und Mais auf Aminosäureebene (Abb. 3-6) besitzen beide eine hohe Substratspezifität. Eine hohe Phosphorylierungsspezifität ist auch für LePTO festzustellen. Dies ist insbesondere deshalb hervorzuheben, da es sich hierbei um einen *in vitro* Ansatz handelt.

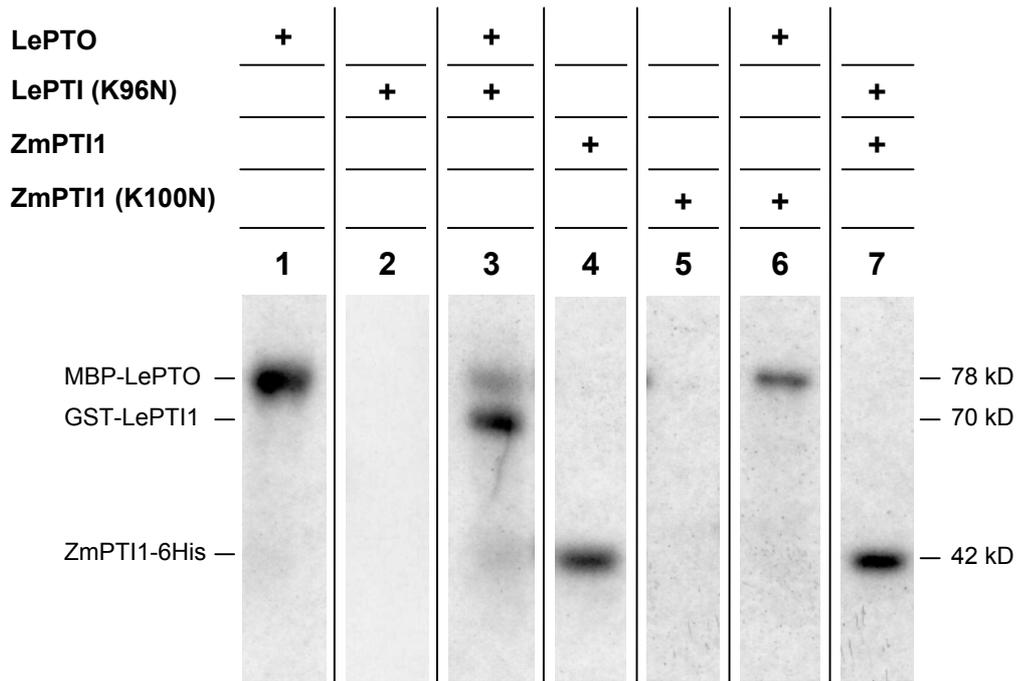


Abb. 3-19: Kinase Assay mit rekombinanten Mais- und Tomate-Kinasen

In *E. coli* exprimierte, durch native Affinitätsaufreinigung immobilisierte Tomate- und Mais-Kinasen wurden einzeln oder zusammen mit radioaktiv markiertem γ - ^{32}P ATP (1 μCi) bei RT inkubiert. Die an den Affinitätsmatrizen gebundenen Proteine wurden in der SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt. Das abgebildete Autoradiogramm zeigt die phosphorylierten Proteine. Größen der phosphorylierten Proteine sind angegeben.

3.3.4.2.2. Phosphorylierungsassay des ZmPTI1 mit Gesamtproteinextrakten

Um die mögliche Existenz von ZmPTI1-Kinase-Kinasen nachzuweisen, wurden Phosphorylierungsassays mit dem autophosphorylierungsdefizienten ZmPTI1(K100N)-6His in Gegenwart von nativen Gesamtproteinextrakten (2.2.5.6.) unterschiedlicher Gewebe durchgeführt. Zur Detektion von *trans*-Phosphorylierungen des ZmPTI1 wurde affinitätschromatografisch aufgereinigtes, an Ni-NTA-Matrix immobilisiertes ZmPTI1(K100N)-6His (2.2.5.3.1.) mit nativem Gesamtprotein unterschiedlicher Gewebe in Gegenwart von radioaktiv markiertem γ - ^{32}P -ATP inkubiert. Nach dem Entfernen aller ungebundenen Proteine aus der Lösung wurden die an ZmPTI1(K100N)-6His bzw. an der Matrix gebundenen Proteine per SDS-PAGE und Autoradiografie analysiert (2.2.5.11.1.).

Neben Gesamtproteinen aus reifem Pollen und Seide sowie aus sieben Tage alten Keimlingen fanden Proteinextrakte aus jungen Wurzeln, gekeimten Körnern (je 7 Tage alt) sowie adulten Blättern Verwendung. Die für die Präparationen verwendeten Maisgewebe waren vom *Wildtyp*-Genotyp⁴⁹. Die resultierenden Autoradiogramme sind in Abb. 3-20 dargestellt.

⁴⁹ *Wildtyp*-Genotyp: *C₂/c₂whp/whp* bzw. *C₂/C₂whp/whp*

Zum Nachweis der Existenz von ZmPTI1-phosphorylierenden Kinasen in Pollen, Seide und jungen Keimlingen wurden jeweils drei parallele Ansätze durchgeführt (Spuren [a], [b] und [c]). Alle drei Parallelansätze enthielten jeweils 30 µg des entsprechenden Gesamtproteins und setzen sich ansonsten wie folgt zusammen:

- [a] Immobilisiertes, autophosphorylierungsaktives ZmPTI1 mit Gesamtprotein: Phosphorylierung des ZmPTI1 in diesem Ansatz können auf der Autophosphorylierung des ZmPTI1 und/oder auf einer *trans*-Phosphorylierung durch unbekannte Kinasen basieren.
- [b] Immobilisiertes autophosphorylierungsdefizientes ZmPTI1-(K100N)-6His mit Gesamtprotein: Die detektierte Phosphorylierung des ZmPTI1 resultiert aus *trans*-Phosphorylierungen des ZmPTI1 durch Kinasen aus dem jeweiligen Gewebe.
- [c] Kontrolle: unbeladene Ni-NTA-Aufreinigungsmatrix zugesetzt mit Gesamtprotein: *unspezifisch* an die Matrix gebundene, phosphorylierte Proteine dienen zur Bestimmung des Hintergrunds in den Ansätzen [a] und [b].

Als Positivkontrolle diente autophosphoryliertes ZmPTI1-6His ohne Zusatz von Gesamtproteinen [Spur 1].

Bei der Inkubation von Pollenprotein mit ZmPTI1 [Spur 2a] bzw. ZmPTI1(K100N) [Spur 2b] wird jeweils phosphoryliertes Protein in der Größe des ZmPTI1 detektiert. Dieses Phosphorylierungssignal fehlt bei Abwesenheit eines rekombinanten ZmPTI1 [Spur 2c]. Hieraus kann geschlossen werden, dass das immobilisierte rekombinante ZmPTI1(K100N) durch Pollenproteine *trans*-phosphoryliert werden kann. Auffallend ist eine im Vergleich zur Autophosphorylierung des ZmPTI1-6His in der Positivkontrolle [Spur 1] wesentlich schwächere Phosphorylierung desselben Proteins in Gegenwart von Pollenprotein [Spur 2a]. Dies könnte durch Interaktion des ZmPTI1-6His mit autophosphorylierungsinhibierenden Proteinen, durch die unvollständige Hemmung von Phosphatasen im Reaktionsansatz oder durch eine erhöhte Konkurrenz zwischen dem ZmPTI1 und anderen Pollenproteinen um das ATP hervorgerufen werden. Es ist offensichtlich, dass eine Reihe weiterer phosphorylierbarer Proteine unspezifisch an die Aufreinigungsmatrix binden [Spur 2c].

Mit Gesamtprotein aus Seide wurden die gleichen Resultate wie mit Pollenprotein erzielt: Immobilisiertes, autophosphorylierungsdefizientes ZmPTI1(K100N)-6His wird von Kinasen aus dem Extrakt der Seide phosphoryliert [Spur 3b]. Wie auch in Anwesenheit von Pollenproteinen ist die Autophosphorylierungsaktivität von ZmPTI1-6His [Spur 1] in Gegenwart von Gesamtproteinen aus Seide reduziert [Spur 3a].

Die Ergebnisse bei der *trans*-Phosphorylierung von ZmPTI1 in Gegenwart von Keimlingsgesamtprotein [4] fallen weniger deutlich aus. Der Hintergrund an unspezifisch an die Affinitätsmatrix bindenden, phosphorylierten Proteinen des Keimlingsextrakts ist recht hoch. Dies könnte z.B. darauf zurückzuführen sein, dass im Proteinextrakt aus Keimlingen der Anteil phosphorylierbarer Proteine größer ist, als in Extrakten der anderen Gewebe. Somit könnte nach dem Waschen wesentlich mehr phosphoryliertes Protein an der Matrix verblieben sein. Da auch in Abwesenheit von rekombinantem ZmPTI1 phosphoryliertes Protein vergleichbarer Größe vorhanden ist [Spur 4c], ist eine verlässliche Aussage über die *trans*-Phosphorylierung des ZmPTI1 durch Kinasen im Keimlingsgesamtprotein nicht zu treffen [Spur 4a+b]. In einem identischen Assay konnte eine sehr geringe Phosphorylierung des ZmPTI1(K100N) gefunden werden (Daten nicht gezeigt).

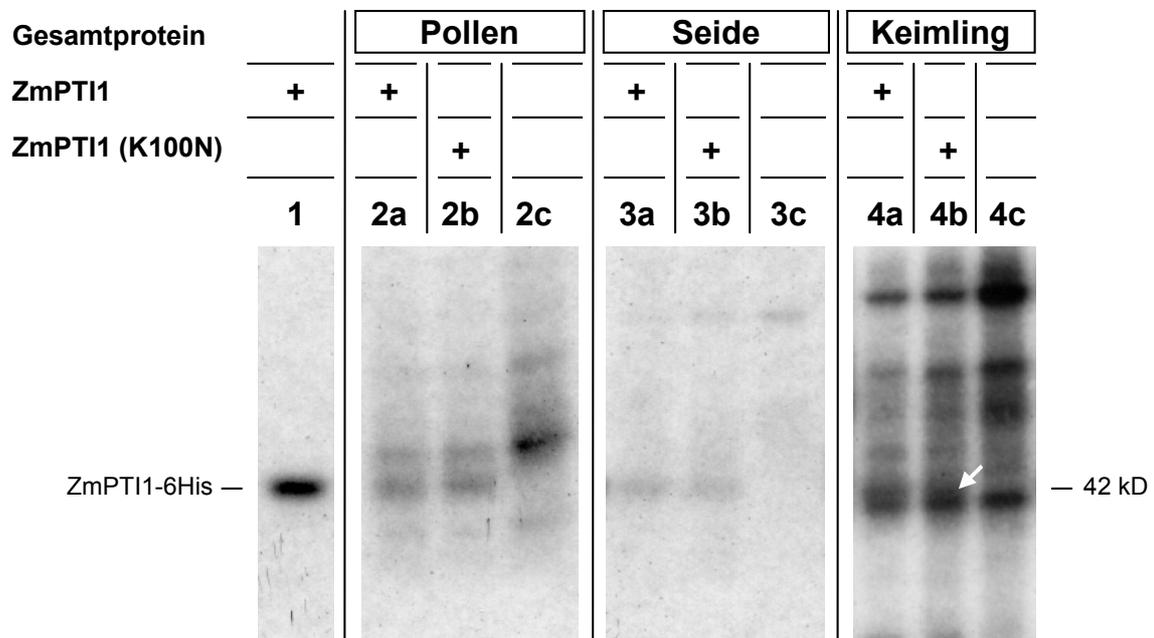


Abb. 3-20: Kinase Assays der rekombinanten ZmPTI1-Kinasen mit Gesamtproteinextrakten

In *E. coli* exprimierte und durch native Affinitätsaufreinigung immobilisiertes ZmPTI1 wurde mit je 30 µg Gesamtprotein der angegebenen Gewebe versetzt und nach Zugabe von radioaktiv markiertem γ - 32 P]ATP (1µCi) inkubiert. Spuren [a] ZmPTI1-6His mit Autophosphorylierungsaktivität; Spuren [b] ZmPTI1(K100N)-6His ohne Autophosphorylierungsaktivität. Matrixgebundenen Proteine wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt.

Die abgebildeten Autoradiogramme zeigen die *in vitro* phosphorylierten aufgereinigten Proteine. Rekombinantes ZmPTI1-6His in Spur [1] wurde ohne Zusatz von Gesamtproteinextrakten als Positivkontrolle *in vitro* autophosphoryliert und dient als ZmPTI1-Größenreferenz. Die Spuren [c] zeigen den Hintergrund der Pflanzenproteine, die durch Zugabe unbeladener Ni-NTA-Aufreinigungsmatrix gebunden und unspezifisch aufgereinigt wurden. Phosphorylierungssignale des ZmPTI1, die in den Spuren [a] auftreten repräsentieren autophosphoryliertes ZmPTI1-6His oder durch Proteinkinasen des jeweiligen Extraktes *trans*-phosphoryliertes ZmPTI1-6His. Phosphorylierungssignale des ZmPTI1(K100N)-6His in den Spuren [b] repräsentieren durch Proteinkinasen *trans*-phosphoryliertes ZmPTI1.

ZmPTI1 *in vitro* phosphorylierende Kinasen existieren in Pollen [2b] und Seide [3b]. Relativ schwache Kinaseaktivität ist in sieben Tage alten Keimlingen detektierbar [Pfeil, 4b].

Kinase-Assays mit Proteinextrakten aus jungen Wurzeln, gekeimten Körnern und adulten Blättern konnten bislang keine eindeutigen Ergebnisse liefern und bedürfen weiterer Experimente (Daten nicht gezeigt).

Die Kinase-Assays in Anwesenheit von Proteinextrakten unterschiedlicher Gewebe deuten auf die Existenz von ZmPTI1-*trans*-phosphorylierenden Kinasen in Pollen und Seide. Eingeschränkt gilt diese Aussage auch für Extrakte aus jungen Keimlingen, deren relative ZmPTI1-Phosphorylierungsaktivität jedoch deutlich geringer ist. Dass in Anwesenheit von Pollenge-samtprotein eine *trans*-Phosphorylierung des immobilisierten ZmPTI1(K100N)-6His auftritt, ist nicht unerwartet, da natürlich vorkommendes ZmPTI1 Protein in Maispollen nachgewiesen werden konnte (3.3.3.3.; Abb. 3-17/3-18) und das Substrat phosphorylieren kann. Die Daten zeigen auch, dass in Seide eine Kinase vorhanden ist, deren *in vitro* Substrat ZmPTI1 ist.

Inwieweit den nachgewiesenen *in vitro* Phosphorylierungsaktivitäten spezifische, feste Interaktionen zwischen den Proteinkinasen des Gewebeextrakts und dem immobilisierten ZmPTI1 vorausgehen, können Kinase-Assays dieses Typs nicht klären. Da während des eigentlichen Assays, also der Anwesenheit von radioaktiv markiertem γ -[³²P]-ATP, alle Proteine des Gesamtproteinextrakts anwesend sind, wären auch relativ unspezifische *trans*-Phosphorylierungen des ZmPTI1 denkbar.

3.3.4.2.3. Interaktions-Kinase-Assay des ZmPTI1 mit verschiedenen Gesamtproteinextrakten

Ob einer *trans*-Phosphorylierung von ZmPTI1 eine spezifische Bindung der phosphorylierenden Kinase-Kinase vorausgeht, wurde in Interaktions-Kinase-Assays (2.2.5.11.2.) bestimmt. Darüber hinaus sollte bei diesem Assay der im Phosphorylierungsassay aufgetretene Hintergrund (Abb. 3-20) durch phosphorylierte Proteine der Gesamtextrakte reduziert sein. Der wesentliche Unterschied zum Phosphorylierungsassay (3.3.4.2.2) ist eine einstündige Präinkubation des aufgereinigten, immobilisierten rekombinanten ZmPTI1 mit den Proteinextrakten der jeweiligen Gewebe. Während dieser Inkubation können Reaktionspartner von ZmPTI1 an immobilisiertes, rekombinantes ZmPTI1 binden. Alle ungebundenen Proteine werden in nachfolgenden stringenten Waschschrinen aus dem Ansatz entfernt. Erst im Anschluss findet die Kinasereaktion mit radioaktiv markiertem γ -[³²P]-ATP statt.

Wie zuvor wurden für die Interaktionsassays je 30 µg Gesamtprotein aus Pollen, Seide und jungen Keimlingen eingesetzt. Die Zusammensetzung der drei für jedes Gewebe durchgeführten Ansätze entsprach denen der Phosphorylierungsassays aus Abschnitt 3.3.4.2.2:

- [a] Immobilisiertes, autophosphorylierbares ZmPTI1-6His und Gesamtprotein
- [b] Immobilisiertes, autophosphorylierungsdefizientes ZmPTI1(K100N)-6His und Gesamtprotein
- [c] Kontrolle: Ni-NTA-Matrix mit Gesamtprotein

Die Autoradiogramme der Interaktions-Kinase-Assays mit Gesamtprotein aus Pollen, Seide und Keimling sind in Abb. 3-21 dargestellt.

Der Hintergrund an *unspezifisch* aufgereinigten phosphorylierten Proteinen aus dem jeweiligen Gesamtprotein ist, aufgrund der Waschschriffe, nahezu komplett eliminiert (vgl. [2a/b], [3a/b] und [4a/b] in Abb. 3-20 und 3-21). Der relativ hohe Hintergrund in den Kontrollen mit Seide- [3c] und Keimlingsgesamtprotein [4c] ist eventuell auf eine unspezifische Präzipitation von Proteinen des Gesamtextrakts zurückzuführen, wenn unbeladene Ni-NTA-Matrix ohne das absättigende ZmPTI1 eingesetzt wurde.

Die Interaktionsassays mit Gesamtprotein aus reifem Pollen [2a-c] und Seide [3a-c] bestätigen die Ergebnisse des Standard-Phosphorylierungsassays (3.3.4.2.2). In Pollen- und Seidegesamtprotein existieren Proteinkinasen, die ZmPTI1(K100N) *in vitro* spezifisch phosphorylieren können (vgl. jeweils [2b] mit [2c] und [3b] mit [3c] in Abb. 3-21).

Durch den Interaktionsassay mit Gesamtprotein aus sieben Tage alten Keimlingen [4a-c] kann die, zuvor vermutete Phosphorylierung des ZmPTI1(K100N) bestätigt werden ([4b] in Abb. 3-21). Die Phosphorylierung des ZmPTI1(K100N) ist jedoch wesentlich geringer als mit Protein aus Pollen und Seide.

Auffällig ist, dass wiederum die Autophosphorylierung des ZmPTI1 nach Inkubation mit Pollen- [2a] und Seideprotein [3a] wesentlich schwächer ist, als in der Positivkontrolle [1]. Die Signalstärke entspricht derjenigen bei der *trans*-Phosphorylierung in den Ansätzen [2b] und [3b]. Im Gegensatz dazu kommt es nach Präzipitation des ZmPTI1 aus Keimlingsextrakt zu keiner Reduktion der Autophosphorylierung. Deshalb ist vorstellbar, dass in Pollen- bzw. Seideprotein neben den phosphorylierenden auch spezifische dephosphorylierende oder die Phosphorylierung inhibierende Komponenten (z.B. ZmPTI1-interagierende Proteine) vorhanden sind, die in Proteinextrakt aus Keimlingen nicht auftreten.

3.3.4.2.4. *in-gel* Kinase Assay

Weitere Untersuchungen zur Identifizierung von Proteinkinasen, deren *in vivo* Substrat ZmPTI1 sein könnte, erfolgten mit einem *in-gel* Kinase Assay nach WOOTEN (2002, 2.2.5.11.3.). Bei dieser Methode werden potentielle Kinasesubstrate in einer SDS-Polyacrylamidgelmatrix co-polymerisiert. Die anschließend elektrophoretisch aufgetrennten Proteine, Enzyme oder Zellysate werden gemeinsam mit dem Substrat renaturiert und mit radioaktiv markiertem γ -[³²P]-ATP inkubiert. Autoradiografie erlaubt die Charakterisierung der Phosphorylierungsaktivität von Proteinkinasen in bezug auf das im Gel eingelagerte Substrat.

Zur Identifizierung von Kinasen, die ZmPTI1 phosphorylieren, wurden je 40 μ g native Proteinextrakte verschiedener Maisgewebe in zwei 13%-igen SDS-Polyacrylamidgelen elektrophoretisch aufgetrennt. Um dabei zwischen der spezifischen Phosphorylierung des Substrats und möglichen Autophosphorylierungen in den zu testenden Proteinextrakten unterscheiden zu können, wurden neben einem Gel mit Substrat (300 μ g/ml ZmPTI1(K100N)-6His) eines ohne Substrat angefertigt. Die in den Gelen eingesetzten nativen Proteinextrakte (2.2.5.3.1.) stammten aus reifem Pollen, reifer und unreifer Seide⁵⁰, sieben Tage gekeimten Körnern, adulten Blättern sowie jungen Keimlingen und Wurzeln (7d). Als Kontrolle wurden je 50 ng des autophosphorylierungsaktiven ZmPTI1-6His und des autophosphorylierungsdefizienten ZmPTI1(K100N)-6His mitaufgetrennt.

Nach dem Entfernen des SDS aus dem Gel, der vollständigen Denaturierung der Proteine sowie deren Renaturierung erfolgte der Kinase Assay mit 120 μ Ci γ -[³²P]-ATP je Gel für zwei Stunden. Nach Waschen und Trocknen der Gele (2.2.5.11.4.) wurden diese autoradiografisch dokumentiert (Abb. 3-22).

In beiden Gelen kann kein Phosphorylierungssignal in der Spur des als Kontrolle eingesetzten rekombinanten ZmPTI1-6His detektiert werden. Dieses kann auf die geringe Menge eingesetzten Proteins von 50 ng zurückzuführen sein oder damit zusammenhängen, dass sich ZmPTI1-6His unter den Reaktionsbedingungen nicht in seine autophosphorylierungsaktive Form zurückfalten kann. Die deutlich höhere Intensität einzelner Phosphorylierungssignale⁵¹ im Gel mit co-polymerisiertem ZmPTI1(K100N)-6His lässt jedoch darauf schließen, dass eine *trans*-Phosphorylierung des Substrat-ZmPTI1 stattfindet und die Phosphorylierbarkeit von einer möglichen nicht funktionellen Rückfaltung des ZmPTI1 nicht beeinflusst wird.

⁵⁰ reife Seide: Narbenfäden aus Kolben, bei denen die Narbenfäden bereits zu 5 cm aus dem Kolben geschoben waren; unreife Seide: Narbenfäden aus Kolben, die ihre Seide noch nicht geschoben haben

⁵¹ abgebildet ist eine 3-Tages-Exposition des Gels ohne Substrat und die 1-Tages-Exposition des Gels mit Substrat

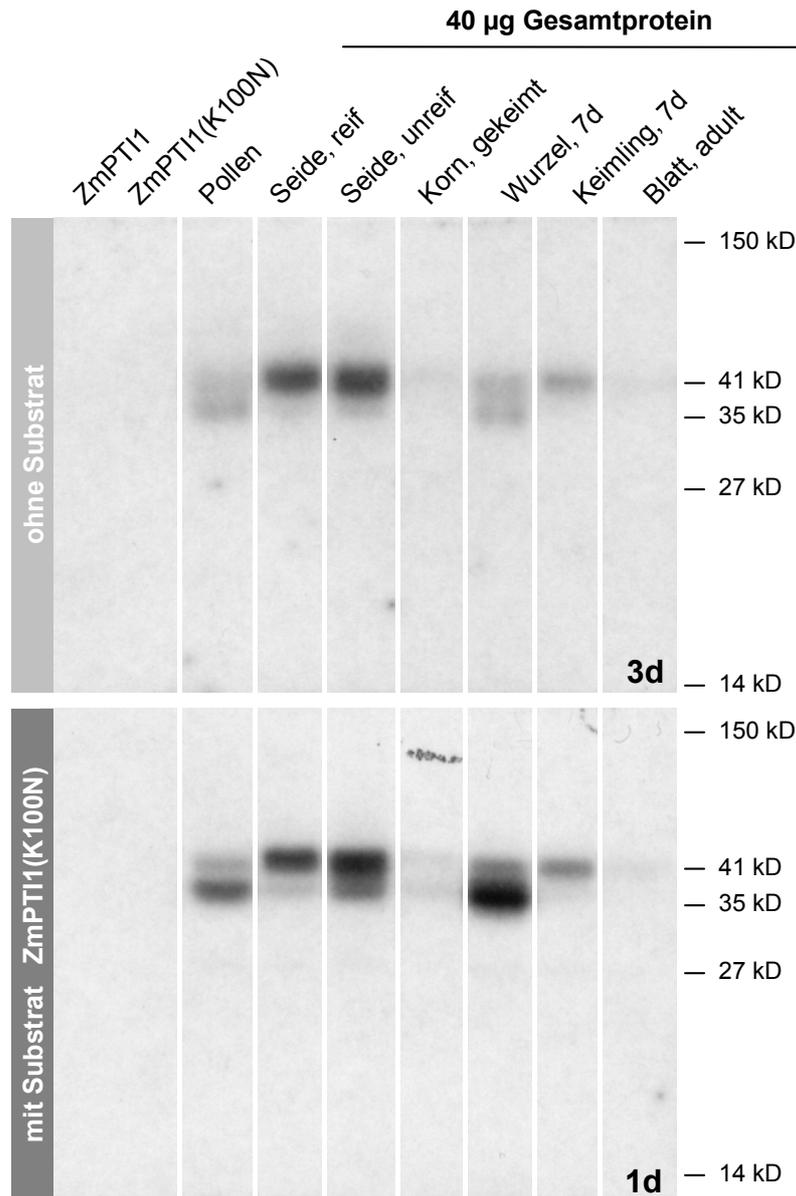


Abb. 3-22: *in-gel* Kinase Assay zur Identifizierung von Kinasen mit ZmPTI1-Phosphorylierungsaktivität

40 µg nativ aufgereinigtes Gesamtprotein aus den angegebenen Geweben wurden in zwei 13%igen SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt. Als Substrat für potentielle Kinasen in den Gesamtproteinen wurden 300 µg/ml autophosphorylierungsdefizientes ZmPTI1(K100N)-6His in einem Gel (unten) co-polymerisiert. Nach elektrophoretischer Auftrennung der Gesamtproteine – das co-polymerisierte Substrat ist ortsfest – und Entfernung des SDS aus beiden Gelen wurden Substrat und die größenfraktionierten Gesamtproteine *in vitro* renaturiert. Im Anschluss an eine zwei-stündige Inkubation der Gele mit radioaktiv markiertem γ -[³²P]-ATP bei 30°C und intensivem Waschen erfolgte die Dokumentation der Phosphorylierungsaktivität durch Autoradiografie der getrockneten Gele. Signifikante Phosphorylierungssignale treten bei Proteingrößen von 41 kD und 35 kD auf. Die Verhältnisse der Signalintensitäten bei 41 kD scheinen in beiden Gelen relativ ähnlich zu sein. Signifikante Unterschiede der Intensitätsverhältnisse sind bei den Phosphorylierungssignalen bei 35 kD vorhanden. Eine detaillierte Auswertung der Verhältnisse der Signalintensitäten liefern die densitometrische Daten in Abb. 3-23.

[ZmPTI1] Positivkontrolle: 50 ng autophosphorylierungsaktives, rekombinantes ZmPTI1-6His. [ZmPTI1(K100N)] Negativkontrolle: 50 ng autophosphorylierungsdefizientes, rekombinantes ZmPTI1(K100N)-6His. Man beachte die unterschiedlichen Expositionszeit der Gele in Tagen [d].

Es können nur wenige aktive Kinasen in den Gesamtproteinen detektiert werden. In beiden *in-gel* Assays werden Phosphorylierungssignale im Bereich von 41 kDa und 35 kDa detektiert, sehr viel schwächere Signale auch im Bereich von 27 kDa. Die Phosphorylierungssignale bei 41 kDa und 35 kDa in Extrakten aus gekeimten Körnern und adulten Blättern sind ebenfalls sehr schwach. Zur vergleichenden Analyse der Phosphorylierungssignale bei 41 kDa und 35 kDa wurden deren Signalintensitäten normalisiert und densitometrisch ausgewertet (Abb. 3-23). Hierzu wurden die Signale der 41 kDa-Bande des Pollenextrakts in beiden Gelen als Referenz gleich 1 und die Signalintensitäten der übrigen Banden zu dieser Referenz ins Verhältnis gesetzt (Abb. 3-23A). Um Veränderungen in der Phosphorylierungsaktivität bei An- und Abwesenheit des Substrats zu bestimmen, wurden die zuvor normalisierten Signalintensitäten paarweise in Relation zueinander gesetzt und verglichen (Abb. 3-23B):

Der Vergleich der normalisierten Phosphorylierungsintensitäten der 41 kDa-Bande in beiden Autoradiogrammen zeigt ein nahezu identisches Phosphorylierungsmuster mit Schwankungsbreiten unter 20% (vgl. die hellgrauen Balken in Abb. 3-23A). Der Quotient aus den Signalintensitäten der 41 kDa Bande im Gel mit Substrat und der 41 kDa Bande im Gel ohne Substrat liegt in allen Geweben im Bereich von 1 (Abb. 3-23B; hellgraue Balken). Nur im Wurzelprotein ist die Intensität im Gel mit ZmPTI1-(K100N)-6His um 55% höher (Quotient 1,55). Daraus ist zu schließen, dass die Phosphorylierungsaktivität bei 41 kDa nicht ausschließlich das ZmPTI1-Substrat verwendet, sondern eine Autophosphorylierungsaktivität vorhanden ist. Gleichwohl deuten die deutlich höheren Intensitäten im substrathaltigen Gel auf eine *trans*-Phosphorylierung des ZmPTI1(K100N)-6His durch die 41 kDa Phosphorylierungsaktivität.

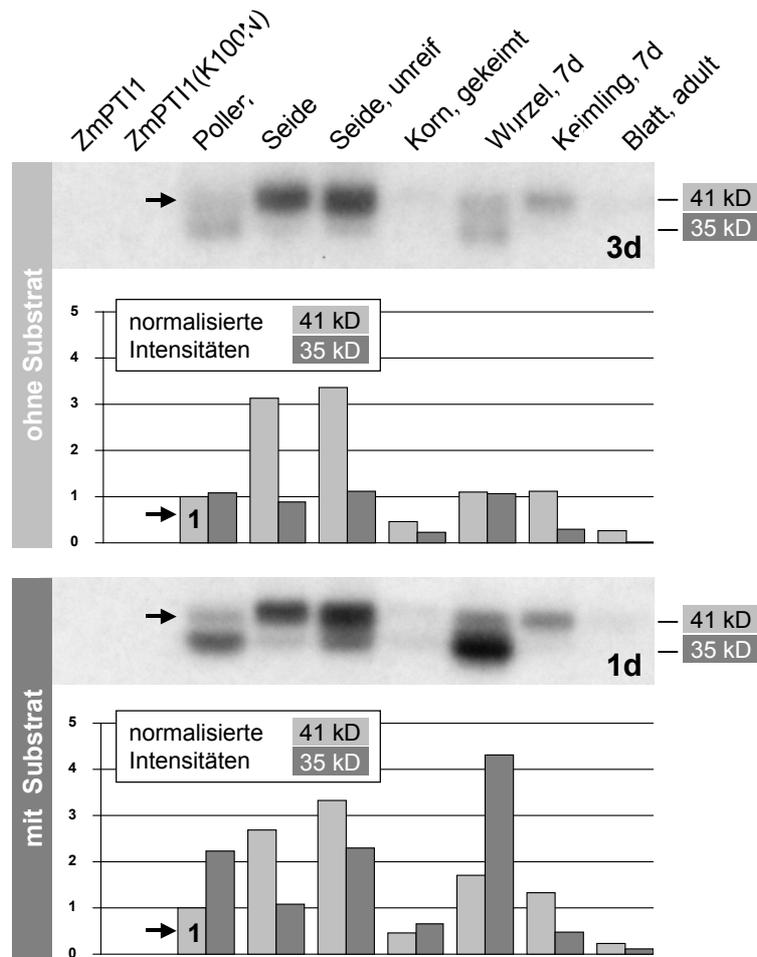
Die Phosphorylierungsintensitäten bei 35 kDa (dunkelgraue Balken in Abb. 3-23A) zeigen hingegen deutliche Unterschiede zwischen beiden Gelen. Im substrathaltigen Gel ist bei allen Geweben ein signifikanter Anstieg des Phosphorylierungssignals, zwischen 22% und mehr als 300%, zu verzeichnen (dunkelgraue Balken in Abb. 3-23B):

Mit Gesamtproteinen aus Pollen bzw. unreifer Seide kommt es in Anwesenheit von ZmPTI1(K100N)-6His zu einer Verdoppelung der Phosphorylierungsintensität (Quotient 2,05, Abb. 3-23B). Im Ansatz mit Gesamtprotein aus sieben Tage alten Wurzeln ist sogar eine Zunahme von +305% festzustellen (Quotient 4,05). Mit Protein aus reifer Seide kommt es nur zu einer 22%igen Zunahme der Signalintensität (Quotient 1,22). Mit Protein aus jungen Keimlingen wurde ein Anstieg der Phosphorylierung um 62% (Quotient 1,62) festgestellt.

Wegen der sehr geringen Intensität der 35 kDa-Signale bei Proteinextrakten aus gekeimten Körnern und adulten Blättern konnte dort keine zuverlässige Quantifizierung erfolgen.

Die durchgeführten Experimente geben Hinweise auf die Existenz von Kinasen in Proteinextrakten verschiedener Gewebe, die ZmPTI1(K100N)-6His zum Ziel haben. Die Phosphorylierungsaktivität ist besonders ausgeprägt bei Protein aus Pollen, unreifer Seide und Wurzeln. Die Größe dieser Kinasen, die offensichtlich auch Autophosphorylierungsaktivität besitzen beträgt circa 35 kDa. Aufgrund der Autophosphorylierung dieser Kinasen kann nicht vollständig ausgeschlossen werden, dass der festgestellte Anstieg der Phosphorylierung allein auf einer effizienteren Autophosphorylierung in Gegenwart des ZmPTI1 basiert.

A



B

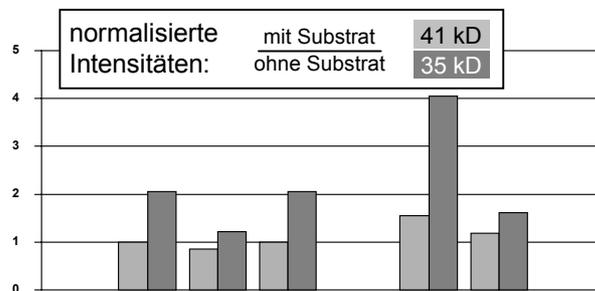


Abb. 3-23: Densitometrische Auswertung der *in-gel* Kinase Assays (aus Abb. 3-22)

A Die densitometrische Auswertung der Phosphorylierungssignale erfolgte nach Normalisierung der Intensitäten. Die Intensitäten des Phosphorylierungssignals bei 41 kD in Pollenextrakten (schwarzer Pfeile) beider Gele wurden gleich 1, die übrigen Signale hierzu ins Verhältnis gesetzt. Die resultierenden normalisierten Intensitäten sind als Balkendiagramm unterhalb des jeweiligen Gelausschnittes dargestellt: Intensitäten der Phosphorylierungssignale bei 41 kD in hellgrau, der Phosphorylierungssignale bei 35 kD in dunkelgrau. Die Expositionszeit beider Gele ist in Tagen [d] angegeben.

B Zum Vergleich der Intensitätsunterschiede zwischen dem *in-gel* Assay ohne Substrat und dem mit co-polymerisiertem ZmPTI1(K100N)-6His wurden die normalisierten Intensitäten der Phosphorylierungssignale beider Gele zueinander in Relation gesetzt: Werte >1 deuten auf eine stärkere Phosphorylierung in Anwesenheit von ZmPTI1, Werte <1 auf eine geringere Phosphorylierungsaktivität. Während die Phosphorylierungen bei 41 kD (hellgrau) nahezu unverändert bleiben (Faktor ~1), nehmen die Phosphorylierungssignale bei 35 kD (dunkelgrau) z.T. signifikant zu. Die Intensitäten für die Gewebe [Korn, gekeimt] und [Blatt, adult] wurden aufgrund der niedrigen Signalniveaus nicht ins Verhältnis gesetzt. Weitere Erläuterungen im Text.

3.3.5. Post-transcriptional Gene Silencing (PTGS)

Die sehr starke Expression des *ZmPti1*-Gens in Pollen (3.3.1.1) und der Nachweis von natürlich vorkommendem ZmPTI1 in reifen und keimenden Pollen (3.3.3.3) könnte auf eine Funktion dieser Kinase bei der Pollenentwicklung und -keimung bzw. während der Interaktion von Pollen bzw. Pollenschlauch und dem Narbenfaden hindeuten. Um dieser Hypothese nachzugehen, wurde ein experimenteller Ansatz zum *in vivo* Ausschalten des *ZmPti1*-Gens verfolgt: das posttranskriptionelle Gen *Silencing* (PTGS). Ein durch PTGS induzierter veränderter Phänotyp könnte Schlüsse auf die Bedeutung des *ZmPti1* für die Pflanze zulassen.

Gen *Silencing* Prozesse werden in Eukaryoten durch doppelsträngige RNA-Moleküle (dsRNA) induziert. Diese können epigenetische Prozesse einleiten, die zum Abbau von dsRNA-homologer messenger-RNAs (mRNAs) führen können. Die hemmende Wirkung der an diesem Prozess beteiligten Enzymkomplexe erfolgt in einigen Tieren – hier spricht man von *RNA interference* (RNAi) – nicht nur auf der posttranskriptionellen Ebene, sondern auch auf der Translationsebene. Neue Erkenntnisse deuten darauf hin, dass dsRNAs an der Formation der Chromatinstruktur und an genomischen DNA-Modifikationen mitbeteiligt sein könnten (CERUTTI, 2003). Die durch dsRNA eingeleiteten Prozesse zum Abbau von homologen RNAs sind in Abb. 3-24 grafisch dargestellt.

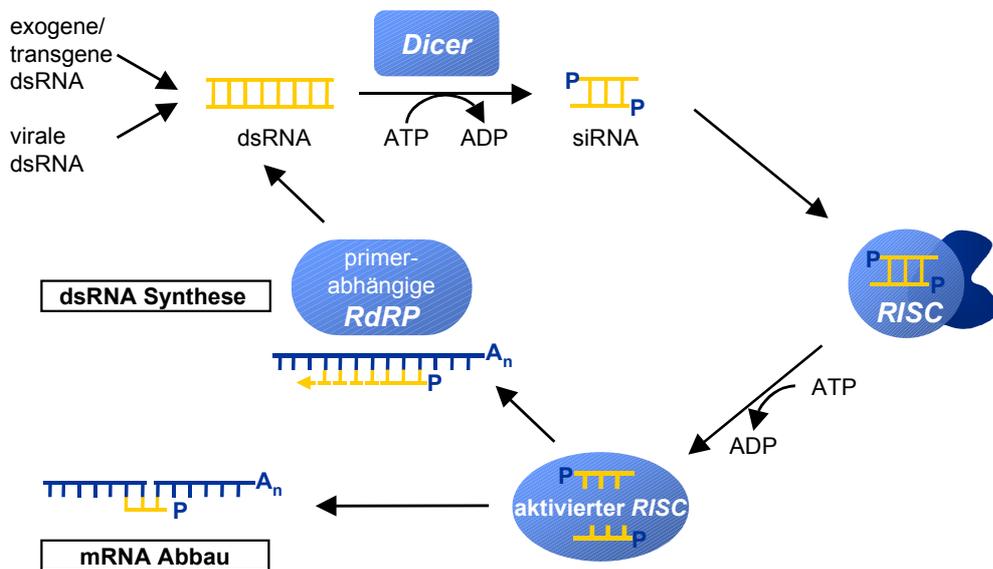


Abb. 3-24: Modell des post-transcriptional gene silencings (PTGS)

Schematische Darstellung der am PTGS beteiligten Proteine und Proteinkomplexe [blau] und RNA-Moleküle. Doppelsträngige RNA [dsRNA] transgenen oder viralen Ursprungs [gelb] wird durch ein Dicer-homologes Protein in einem ATP-abhängigen Schritt in eine 21-23 bp lange doppelsträngige *small interference RNA* [siRNA] überführt. siRNA-Moleküle werden in den *RNA-induced-silencing-complex* [RISC] aufgenommen und in einem ATP-abhängigen Schritt in Einzelstränge getrennt. Der aktivierte RISC nutzt die einzelsträngigen siRNAs zum Auffinden homologer mRNAs [blau]. Der resultierende siRNA-mRNA Komplex wird im doppelsträngigen Bereich durch eine Endonuklease geschnitten und anschließend abgebaut. In einem Nebenweg dient der siRNA-mRNA-Komplex einer primerabhängigen, RNA-abhängigen RNA-Polymerase [RdRP] zur Synthese doppelsträngiger RNA-Moleküle, die in den Dicer/RISC Kreislauf eingebracht werden und erhöht den *Silencing*-Effekt. [Zeichnung ausschnittsweise nach CERUTTI (2003)]

Viele Untersuchungsergebnisse sprechen für eine cytoplasmatische Lokalisation der an dem PTGS beteiligten Proteine und Proteinkomplexe. In Pflanzen sind Transgene bezüglich ihres *Silencing*-Effekts sehr viel effizienter, wenn ihr Transkript eine dsRNA-Haarnadelstruktur bilden kann und ein Polyadenylierungssignal enthält. Die Ausbildung einer Haarnadelstruktur aus doppelsträngigem RNA-Stamm und einzelsträngiger Schleife wird durch die invertiert-komplementäre Anordnung zweier codogener Genbereiche ermöglicht, die durch ein Intron voneinander getrennt sind (Abb. 3-25). Pflanzen mit Transgenen ohne Intron und Polyadenylierungssignal zeigen wesentlich schwächere RNA-Degradationseffekte, da deren Transkripte vermutlich im Nucleus verbleiben und der cytoplasmatischen PTGS-Maschinerie nicht zugänglich sind. (MATZKE *et al.*, 2001; METTE *et al.*, 2001).

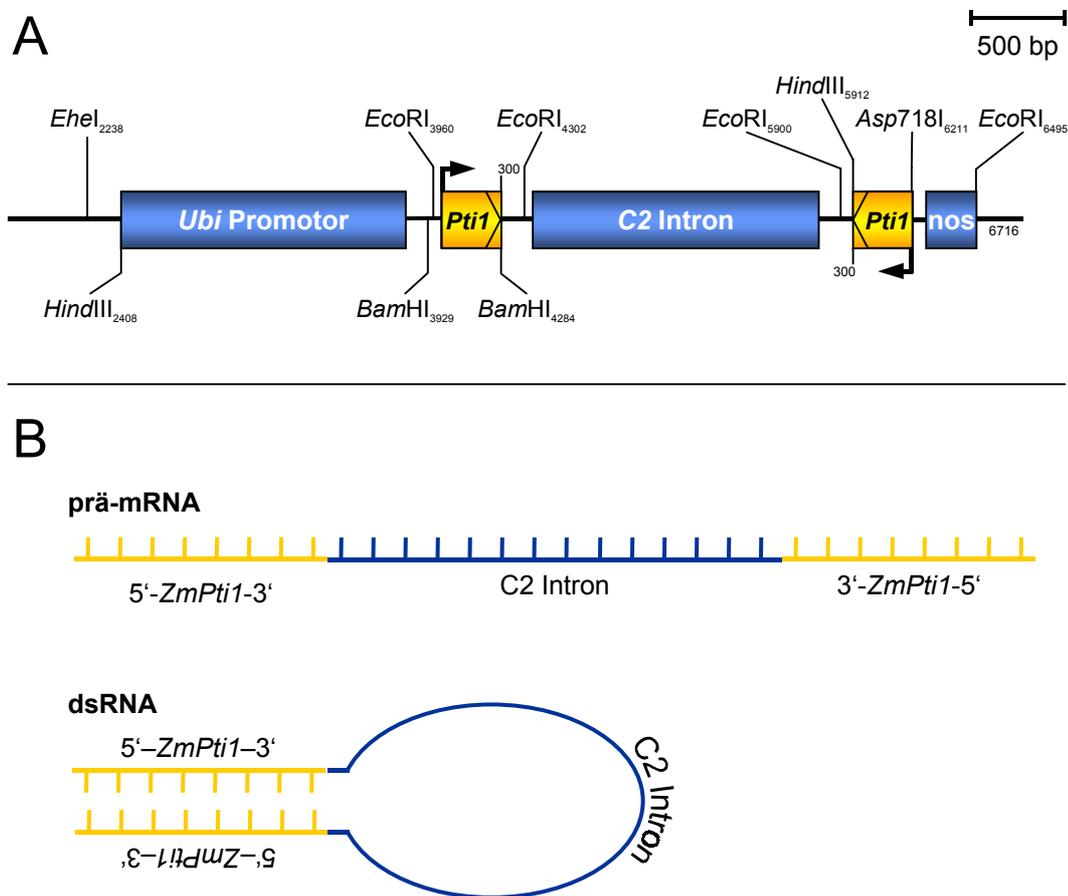


Abb. 3-25: Der PTGS-Vektor pUbi:5'-ZmPti1-3':C2 Intron:3'-ZmPti1-5':nos

A Der für die funktionelle Inaktivierung des *ZmPti1*-Gens in Mais eingesetzte Vektor wurde stabil in Pflanzen transformiert. Die zwei invers komplementär zueinander klonierten Bereiche des 5'*ZmPti1*-Gens [5'-*ZmPti1*-3' und 3'-*ZmPti1*-5'] umfassen die ersten 300 Basenpaare vom Startcodon (gewinkelter Pfeil) an. Das dazwischen inserierte Intron des Chalconsynthese-Gens C2 ermöglicht die bessere Ausbildung einer Haarnadelstruktur des resultierenden Transkripts [prä-mRNA und dsRNA in **B**]. Das Konstrukt ist unter Kontrolle des konstitutiv exprimierenden *Ubiquitin*-Promotors [*Ubi*-Promotor]. [*nos*] *Nopal*in *Synthetase* Polyadenylierungs-Terminator. Restriktionsschnittstellen einiger Endonukleasen sind angegeben.

B Schematische Darstellung des PTGS-Transkripts [prä-mRNA] und der sich putativ bildenden Haarnadelstruktur mit Bereichen doppelsträngiger RNA [dsRNA].

Neben den cytoplasmatisch auftretenden RNAi- bzw. PTGS-Effekten gibt es nucleäre Prozesse die ebenfalls durch das Auftreten von dsRNA-Molekülen zu einem *Silencing* führen (LACHNER und JENUWEIN, 2002; ROUNTREE und SELKER, 1997; DALMAY *et al.*, 2000; VAISTIJ *et al.*, 2002).

Dicer-homologe oder RISC-homologe Proteine bzw. Proteinkomplexe, wie z.B. das *Drosophila* Protein AGO2 (HAMMOND, *et al.*, 2001), sind in vielen Eukaryoten nachgewiesen worden. Ebenso deuten die Detektion von siRNAs in Pflanzen, Tieren, Pilzen, Protozoen und Algen sowie endonukleolytischer Abbauprodukte von mRNAs in *Homo sapiens* und Tomate (HAN und GRIERSON, 2002) auf eine weite Verbreitung der RNAi/PTGS-Maschinerie hin.

3.3.5.1. Herstellung von *ZmPti1 knock-out* Pflanzen

Zur Herstellung von *ZmPti1 knock-out* Pflanzen wurden 10-12 Tage alte Embryonen⁵² biolistisch mit einem *ZmPti1*-PTGS-Konstrukt (pUbi:5'-*ZmPti1*-3':C2 Intron:3'-*ZmPti1*-5':nos) stabil transformiert (2.2.11.). Um erfolgreich transformierte Embryonen zu selektieren, wurde als Resistenzmarker ein Vektor zur Expression des *pat*-Gens (p35S:pat) co-transformiert. Das bakterielle *pat*-Gen vermittelt Resistenz gegenüber dem blatttherbiziden Wirkstoff Glufonsinat. Die biolistischen Transformationen und die Regeneration von stabil transformierten Pflanzen (2.2.12.1.) wurden freundlicherweise von Dr. Reinhold Brettschneider, Katja Müller und Dagmar Stang⁵³ durchgeführt.

Der für das PTGS eingesetzte Vektor ist in Abb. 3-25A dargestellt. Unter Kontrolle des konstitutiv exprimierenden *Ubiquitin* Promotors (CHRISTENSEN *et al.*, 1992) stehen zwei zueinander invers komplementär angeordnete, für die ersten 100 Aminosäuren codierende Abschnitte des *ZmPti1*-Gens. Diese werden durch das Intron des Chalconsynthase-Gens *C2* (FRANKEN *et al.*, 1991) voneinander getrennt, wodurch die Ausbildung einer Haarnadelstruktur des resultierenden PTGS-Transkripts ermöglicht wird (Abb. 3-25B). Als Terminator dient der 3' nicht-translatierte Bereich des *Nopalinsynthetase*-Gens aus *Agrobacterium tumefaciens* (*nos*-Terminator; DEPICKER *et al.*, 1982). Die Klonierungsstrategie ist in Tab. 3-7 zusammenfassend dargestellt. Die für die Klonierungen genutzten molekularbiologischen Standardmethoden sind in Kapitel 2.2. dokumentiert.

Über die, durch das *pat*-Gen vermittelte Glufonsinat-Resistenz konnten aus 20 selektierten Kalli insgesamt 36 Regenerate der F₀-Generation erhalten werden, die eine stabile Integration des Resistenzmarkergens trugen. Die zum Teil klonalen Pflanzen wurden im Gewächshaus aufgezogen (2.1.7.) und molekulargenetisch charakterisiert.

⁵² aus der Kreuzung der Maislinien *A188* und *H99*

⁵³ Biozentrum Klein Flottbek und Botanischer Garten, Universität Hamburg

Promotor	5'-ZmPti1-3'	C2 Intron	3'-ZmPti1-5'
	PCR Amplifikation von ZmPti1-cDNA Klon cSHD56 3a mit den Primern PRMMH65 und PRMMH66 → 5'-ZmPti1-3'	TOPO TC2.3 (Dr. Karsten Frenzel ⁵³): Intron mit 16 bzw. 39 bp der Exons 1 und Exon 2 des C2 Gens	PCR Amplifikation von ZmPti1-cDNA Klon cSHD56 3a mit den Primern PRMMH67 und PRMMH68 → 3'-ZmPti1-5'
	Subklonierung in TOPO pCR [®] 2, Überprüfung der 3'→5' Orientierung	EcoRI Restriktion → C2 Intron	Subklonierung in TOPO pCR [®] 2
		Subklonierung in pBluescriptKS, Überprüfung der 5'→3' Orientierung → pBSK:C2Intron	
		<i>KpnI/HindIII</i> Verdau	
pUbi.cas (Dr. Reinhold Brettschneider ⁵³)		Subklonierung 3'-ZmPti1-5' in pBSK:C2Intron → pBSK:C2Intron:3'-ZmPti1-5'	
<i>KpnI/Asp718</i> Verdau		<i>KpnI/Asp718</i> Verdau → C2Intron:3'-ZmPti1-5'	
siehe rechts		Subklonierung in C2Intron:3'-ZmPti1-5' in pUbi.cas → pUbi:C2Intron:3'-ZmPti1-5':nos	
		<i>BamHI</i> Verdau	
	Subklonierung 5'-ZmPti1-3' in pUbi:C2Intron:3'-ZmPti1-5':nos, Überprüfung der 5'→3' Orientierung des 5'-ZmPti1-3' → pUbi:5'-ZmPti1-3':C2Intron:3'-ZmPti1-5':nos		

Tab. 3-7: Klonierungsstrategie zur Herstellung des ZmPti1-PTGS-Konstrukts

Die jeweils aus den einzelnen Schritten resultierenden Fragmente oder Vektoren sind in fett angegeben. Die verwendeten kommerziellen Vektoren TOPO pCR[®]2 und pBluescriptKS/pBS stammen von den Firmen Invitrogen (Karlsruhe) und Stratagene (Heidelberg).

3.3.5.2. Analyse der transgenen *ZmPti1* knock-out Pflanzen

Southern Analysen der transgenen F_0 -Pflanzen

Zum Nachweis der stabilen Integration des PTGS-Konstrukts wurden *Southern* Analysen (2.2.3.5.) mit je einer F_0 -Pflanze der 20 klonalen Linien durchgeführt.

Hierfür wurden je 15 µg genomische DNA der transgenen Pflanzen, der Linien *A188* und *H99* sowie als Kontrolle 50 pg des *ZmPti1*-PTGS-Plasmid mit den Endonukleasen *Asp718I* und *EheI* geschnitten. Die bei dieser Doppelrestriktion eingesetzten Enzyme schneiden im PTGS-Vektor 5' des *Ubiquitin*-Promotors und am 3' Ende vor dem *nos*-Terminator (Abb 3-25A). Der Nachweis des resultierenden 4,0 kb großen Fragments im *Southern* zeigt, in welcher der transgenen Pflanzen mindestens eine vollständige Kopie des Transgens, und damit die Voraussetzung für die funktionelle Transkription des PTGS-Konstrukts, gegeben ist. Zusätzliche Hybridisierungssignale, die nicht in den genomischen DNAs der *Wildtyp*-Linien *A188* und *H99* detektiert werden, repräsentieren weitere z.T. partielle Integrationen des Konstrukts. In Abb. 3-26 ist die *Southern* Analyse mit der Digoxigenin-markierten ORF-*Pti1*-Sonde (2.2.3.3.1.) dargestellt.

15 der 20 untersuchten Pflanzen (GH 2984, 2985, 2986, 2987, 2989, 2990, 2991, 2993, 2994, 2995, 2996, 3010, 3011, 3053 und 3054) haben mindestens eine *ZmPti1*-PTGS-Kopie stabil ins Genom integriert und werden als transgen bezüglich des PTGS-Konstrukts bezeichnet. Eine weitere Pflanze (GH 3028) scheint ebenfalls das PTGS-Konstrukt zu enthalten. Die F_0 -Pflanzen GH 2988, 2992, 2997 und 3052 sind nicht transgen.

Identische Bandenmuster verschiedener Pflanzen in der *Southern* Detektion sind in der Regel auf die Vereinzelung mehrerer Regenerate eines Kallus während der Aufzucht zurückzuführen. Diese Pflanzen entstammen höchstwahrscheinlich dem selben Transformationsereignis und können in Gruppen klonaler Pflanzen zusammengefaßt werden: Gruppe 1: GH 2984, 2987, 2991 und 2993; Gruppe 2: GH 2989, 2990 und 2996; Gruppe 3: GH 3010 und 3011 sowie Gruppe 4: GH 3053 und 3054. Demgegenüber sind die transgenen Pflanzen GH 2985, 2986, 2994, 2995 und 3028 Vertreter jeweils eines unabhängigen Transformationsereignisses.

Northern Analysen von RNAs aus adulten Blättern der transgenen F₀-Pflanzen

Zum Nachweis der Transkription des transgenen Konstrukts, wurde im ersten Schritt untersucht, ob das unter der Kontrolle des konstitutiv exprimierenden *Ubiquitin*-Promotors stehende Transgen in somatischen Geweben funktionell exprimiert wird. Hierzu wurde aus adulten Blättern von 15 der 16 transgenen F₀-Pflanzen Gesamt-RNA präpariert (2.2.4.1.) und nach Gelelektrophorese auf eine Membran transferiert (2.2.4.3.). Als Negativkontrolle wurde Gesamt-RNA aus zwei, nach der *Southern* Analyse nicht-transgenen F₀-Pflanzen (GH 2988 und 2992) eingesetzt (2.2.4.3.; Abb 3-26). Die Membran wurde sukzessive mit den radioaktiv markierten Sonden (2.2.3.3.2.) ORF-*Pti1* und C2-Intron⁵⁴ hybridisiert.

Das Autoradiogramm der *Northern* Analyse mit der Sonde ORF-*Pti1* zeigt in allen transgenen Pflanzen ein komplexes Detektionsmuster *ZmPti1*-homologer Transkripte in einem Größenbereich von 0,2 kb bis 3,4 kb (Abb. 3-27). In den Blättern der nicht-transgenen Kontrollpflanze GH 2992 sowie in den Blättern der Linien *A188*, *H99*, des *Wildtyps* und der *whp*-Mutante werden diese Transkripte nicht nachgewiesen. In den als Positivkontrolle eingesetzten RNAs aus Pollen des *Wildtyps* und der *whp*-Mutante wird das endogene *ZmPti1*-Transkript in einer Größe von etwa 1,7 kb detektiert. Die Anwesenheit *ZmPti1*-homologer Transkripte in Blättern transgener Pflanzen, bei gleichzeitiger Abwesenheit dieser Transkripte in nicht-transgenen Pflanze und Blättern der Linien *A188*, *H99*, *Wildtyp* und *whp*, ist der Beweis für die aktive Transkription des PTGS-Konstrukts unter Kontrolle des *Ubiquitin*-Promotors in allen getesteten transgenen Pflanzen.

Bei dem 3,2 kb-langen Transkript⁵⁵ könnte es sich um die nicht-prozessierte prä-mRNA des PTGS-Transgens handeln. Bei dem ebenfalls mit der *Pti1* ORF Sonde detektierten 2,6 kb-Transkript handelt es sich unter Umständen um ein teilprozessiertes, um das *Ubiquitin*-Intron reduziertes, Transkript aus beiden invers-wiederholten *ZmPti1*-Teilen und dem C2-Intron⁵⁶. Die zusätzlich detektierten, kleineren RNAs repräsentieren weitere Spleißprodukte (z.B. ohne C2 Intron) bzw. durch einsetzende PTGS-Effekte (3.3.5) auftretende nukleolytische Abbauprodukte der primären Transkripte oder durch die RNA-abhängigen RNA-Polymerasen (RdRP) teilamplifizierte sekundäre RNAs.

⁵⁴ Sonde **C2-Intron**: ein, das gesamte C2-Intron umfassendes, *EcoRI*-Fragment aus dem TOPO pCR2 Klon TC2.3 von Dr. Karsten Frenzel, Biozentrum Klein Flottbek und Botanischer Garten, Universität Hamburg.

⁵⁵ Das Primärtranskript vom *ZmPti1*-PTGS-Konstrukt umfaßt den *Ubiquitin*-Transkriptionsstart inklusive *Ubiquitin*-Intron mit ~600 bp sowie den 2,6 kb-langen Bereich aus 5'-*ZmPti1*-3':C2 Intron:3'-*ZmPti1*-5' und *nos*-Terminator.

⁵⁶ Das 2,6 kb-Transkript wird mit der C2-Sonde ebenfalls detektiert (siehe weiter unten)

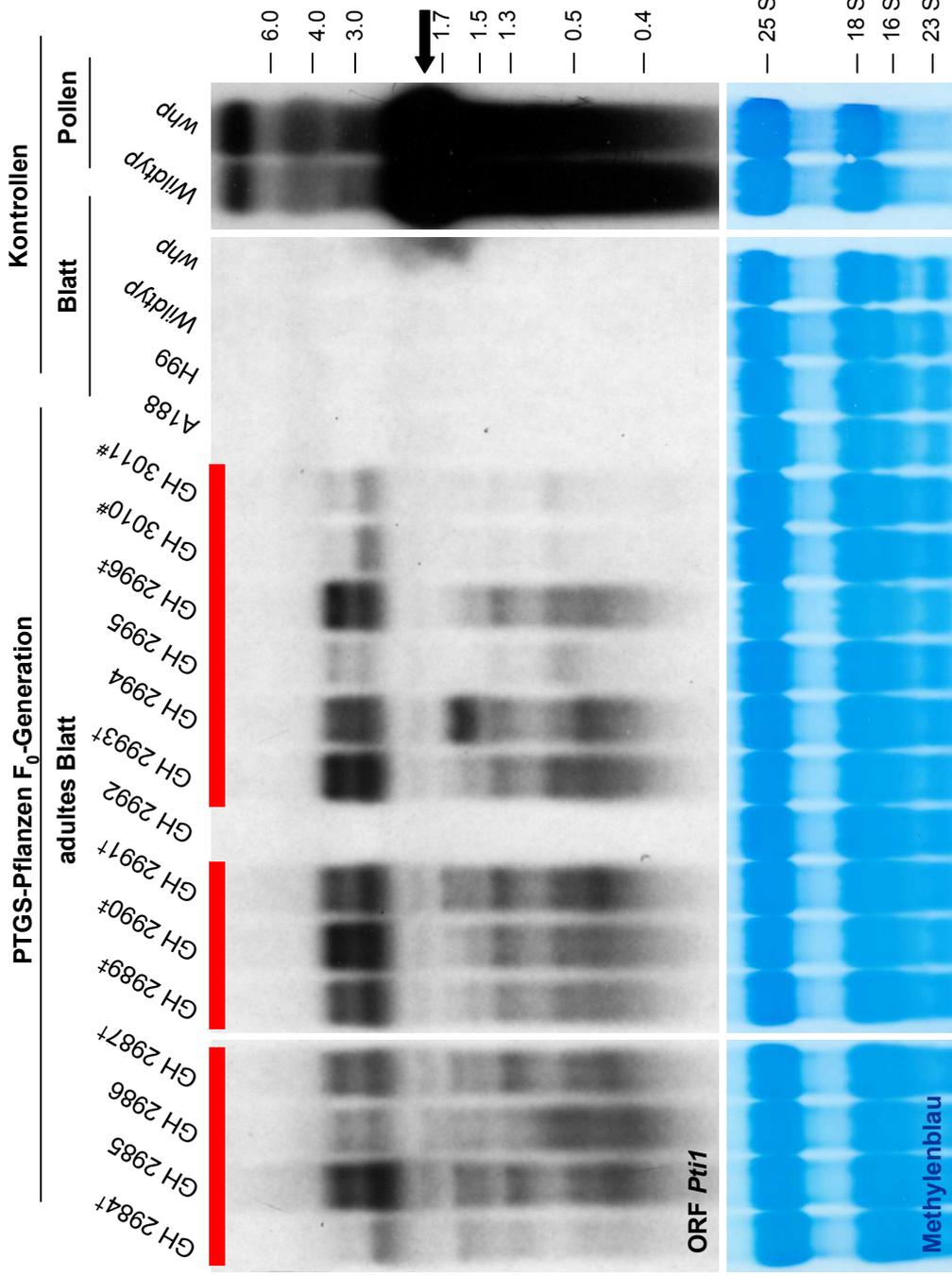


Abb. 3-27: Northern Detektion ZmPti1-homologer RNAs in adulten Blättern von ZmPti1-PTGS-transformierten F₀-Pflanzen
 Gesamt-RNA von adulten Blättern PTGS-transgener F₀-Pflanzen: **roter** Balken. In Blättern der nicht transgenen Pflanze GH 2992 (s. Abb. 3-26) sowie in Blättern der Linien [A188], [H99], des Wildtyps und der [whp]-Mutante werden keine PTGS-Transkripte nachgewiesen. In Pollen-RNAs des Wildtyps und der whp-Mutante wird das endogene ZmPti1-Transkript detektiert (Pfeil). Als Sonde diente der radioaktiv markierte ORF des ZmPti1. Die Expositionsdauer der Autoradiogramme betrug: 16 h [links und mitte] bzw. 4 h [rechts]. Die gleichmäßige Beladung des 2%-igen Agarosegels mit je 20 µg Gesamt-RNA zeigt die Methylenblau-gefärbte Membran. [23S**] Kleines Fragment der 23S rRNA. Pflanzen mit einem identischen Hybridisierungsmuster in der Southern Analyse (s. Abb. 3-26) sind mit einem gemeinsamen Symbol gekennzeichnet [† ‡ # und *].

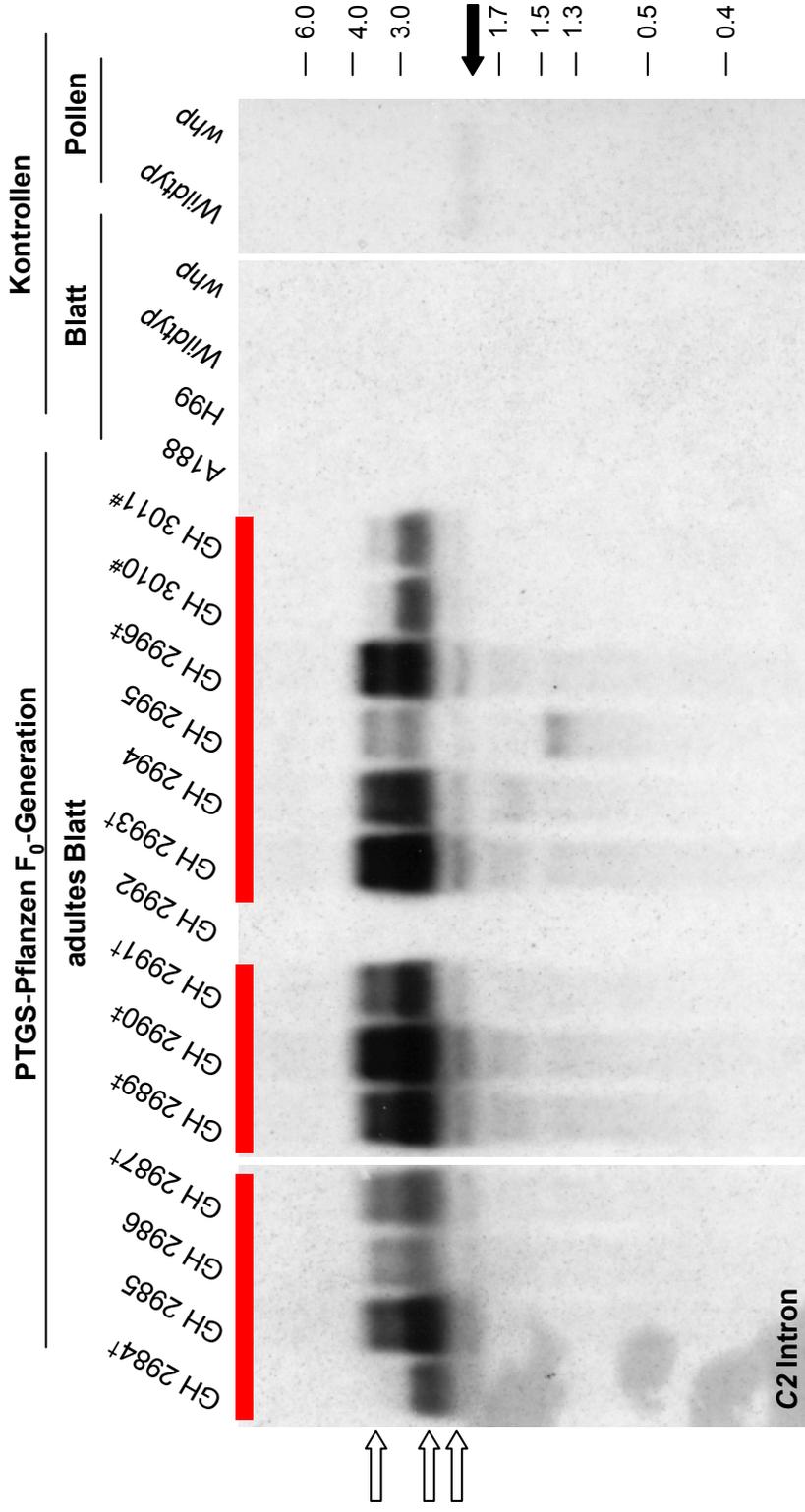


Abb. 3-28: Northern Detektion C2-Intron-homologer RNAs in adulten Blättern ZmPti1-PTGS-transformierter F₀-Pflanzen

Gesamt-RNA von adulten Blättern PTGS-transgener F₀-Pflanzen: **roter** Balken. In Blättern der nicht-transgenen Pflanze GH 2992 (s. Abb. 3-26) sowie in Blättern der Linien [A188], [H99], des Wildtyps und der [whp]-Mutante werden keine Transkripte nachgewiesen. Als Sonde diente das radioaktiv markierte Intron des Chalconsynthase-Gens C2.

Die 1,9 kb-, 2,6 kb- und 3,2 kb-großen Transkripte (weiße Pfeile) sind deckungsgleich mit denen, die mit der ORF-Pti1-Sonde in Abb. 3-27 nachgewiesen wurden.

Abb. 3-27 nachgewiesen wurden. Die hybridisierte Membran ist identisch mit der aus Abb. 3-27. Beladung s. Abb. 3-27. Das schwache Detektionssignal bei Pollen des Wildtyps und der whp-Mutante (schwarzer Pfeil) resultiert von der zuvor auf dieser Membran verwendeten ORF-Pti1-Sonde und entspricht dem endogenen ZmPti1-Transkript (Expositionsdauer hier 2 Tage). Pflanzen mit einem identischen Hybridisierungsmuster in der Southern Analyse (s. Abb. 3-26) sind mit einem gemeinsamen Symbol gekennzeichnet [† # und *].

Um zu bestätigen, dass es sich bei den mit der ORF-*Pti1*-Sonde nachgewiesenen Transkripten, um Transkripte des Transgens handelt, wurde derselbe *Northern* mit der C2-Intron-Sonde hybridisiert (Abb. 3-28). In dieser Hybridisierung werden ebenfalls die beiden, mit der Sonde ORF-*Pti1* detektierten Transkripte der Größen 3,2 kb und 2,6 kb detektiert. Die Deckungsgleichheit der Autoradiografiesignale mit beiden Sonden beweist, dass es sich dabei um die *ZmPti1*-C2-Intron-homologen Transkripte des Transgens handelt. Bei dem 1,9 kb großen Transkript, das mit der ORF-*Pti1*-Sonde ein relativ schwaches Signal zeigt, könnte es sich um ein Spleißprodukt aus dem C2-Intron und einem der beiden flankierenden codogenen *ZmPti1*-Bereiche handeln.

Unterschiede in der Stärke der Detektionssignale deuten – bei annähernd gleichmäßiger Beladung der Membran – auf individuell auftretende Schwankungen in der Expression des Transgens hin.

Northern Analysen von RNAs aus reifem Pollen der transgenen F₀-Pflanzen

Nach dem derzeitigen Stand der Wissenschaft ist für die Auslösung eines PTGS-Effekts neben der Expression eines entsprechenden Konstrukts auch die Anwesenheit der korrespondierenden endogenen Ziel-RNAs erforderlich. Da im Pollen eine starke Expression des endogenen *ZmPti1* (vgl. Abb. 3-9, 3.3.1.1) nachgewiesen werden konnte, sollte überprüft werden, ob auch in diesem Zielgewebe das PTGS-Konstrukt transkribiert wird und möglicherweise schon in der F₀ eine Reduktion der *ZmPti1*-Transkriptmenge beobachtet werden kann. Aufgrund recht unterschiedlicher Blütenentwicklung standen für die *Northern* Untersuchungen nicht von allen transgenen F₀-Pflanzen Pollen zur Verfügung.

Die *Northern* Analyse der Pollen-RNAs aus zehn transgenen⁵⁷ und drei nicht-transgenen⁵⁸ Pflanzen mit der radioaktiv markierten C2-Intron Sonde ist in Abb. 3-29 dargestellt:

Wie in adulten Blättern auch werden in Pollen hauptsächlich die drei 3,2 kb, 2,6 kb und 1,9 kb langen Transkripte nachgewiesen (vgl. Abb. 3-28). Das PTGS-Konstrukt unter Kontrolle des *Ubiquitin* Promotors wird also in Pollen exprimiert. Die in den Pollen-RNAs der Linien *A188*, *H99* und der *whp*-Mutante sehr schwach hybridisierenden Transkripte sind auf die teilweise Vermischung der RNAs von GH 3054 und *A188* während der Gelbeladung zurückzuführen.

⁵⁷ GH 2987, 2989, 2990, 2991, 2993, 2996, 3010, 3011, 3053 und 3054

⁵⁸ GH 2988, 2993 und 2997

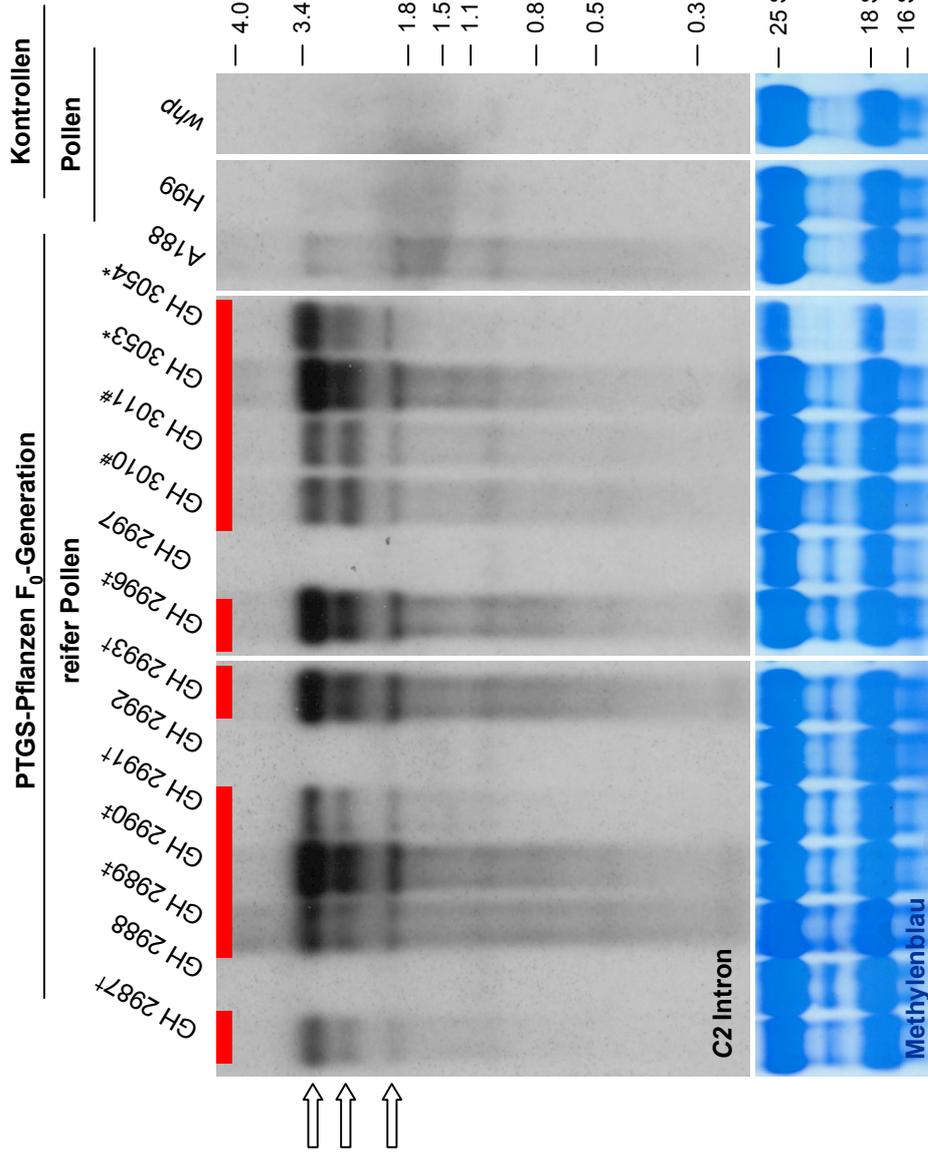


Abb. 3-29: Northern Detektion C2-Intron-homologer RNAs in Pollen *ZmPti1*-PTGS-transformierter F₀-Pflanzen

Gesamt-RNA aus Pollen PTGS-transgener F₀-Pflanzen: **roter** Balken. In Pollen der nicht-transgenen Pflanzen GH 2988, 2992 und 2997 (s. Abb. 3-26) sowie in Pollen der Linien [A188], [H99] und der [whp]-Mutante werden keine Transkripte nachgewiesen. Als Sonde diente das radioaktiv markierte Intron des Chalconsynthasegens C2. Die 1,9 kb-, 2,6 kb- und 3,2 kb-großen Transkripte (weiße Pfeile) repräsentieren die in adulten Blättern mit der ORF-*Pti1*- und der C2-Intron-Sonde (Abb. 3-27 und 3-28) nachgewiesenen Transkripte. Expositionsdauer: 3 Tage. Die gleichmäßige Beladung des 2%-igen Agarosegels mit je 15 µg Gesamt-RNA zeigt die Methylenblau-gefärbte Membran. Pflanzen mit einem identischen Hybridisierungsmuster in der Southern Analyse (s. Abb. 3-26) sind mit einem gemeinsamen Symbol gekennzeichnet [† # und *].

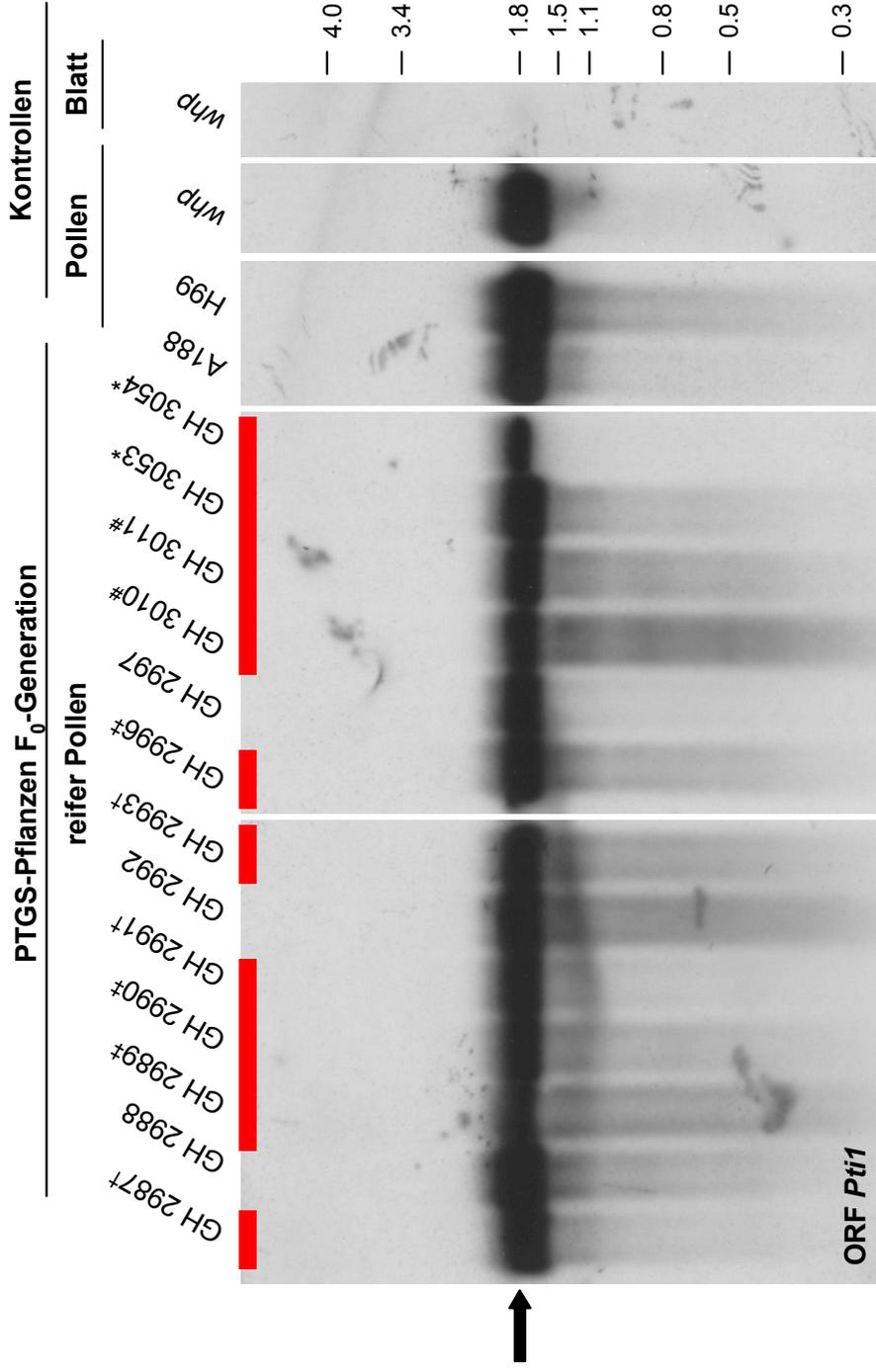


Abb. 3-30: Northern Detektion *ZmPti1*-ORF-homologer RNAs in Pollen *ZmPti1*-PTGS-transformierter F_0 -Pflanzen
 Gesamt-RNA aus Pollen PTGS-transgener F_0 -Pflanzen: **roter Balken**. In allen Pollen-RNAs wird das endogene *ZmPti1*-Transkript (Pfeil) nachgewiesen, eine signifikante Reduktion der *ZmPti1*-Transkriptmenge in transgenen, das PTGS-Konstrukt exprimierenden Pflanzen (vgl. die nicht-transgenen GH 2988/2990/2997 mit transgenen) ist nicht erkennbar. Das schwächere Detektionssignal in RNAs von GH 3054 ist auf geringere Beladung zurückzuführen (s. Abb. 3-29). In den als Nullkontrolle eingesetzten Blättern der [*whp*] Mutante wird erwartungsgemäß kein *ZmPti1*-Transkript nachgewiesen. Aufgrund der sehr kurzen Expositionszeit (2 h) sind die *ZmPti1*-homologen PTGS-Transkripte nicht sichtbar. Nach längerer Expositionszeit konnten die in Abb. 3-29 detektierten Transkripte auch nachgewiesen werden. Die hybridisierte Membran ist identisch mit der aus Abb. 3-29. Beladung s. Abb. 3-29. Pflanzen mit einem identischen Hybridisierungsmuster in der Southern Analyse (s. Abb. 3-26) sind mit einem gemeinsamen Symbol gekennzeichnet [† # und *].

Um zu untersuchen, inwieweit sich die Expression des Transgens im Pollen auf die *ZmPti1*-Transkriptmenge auswirkt, wurde dieselbe RNA-Membran mit der radioaktiv markierten ORF-*Pti1* Sonde hybridisiert (Abb. 3-30). In allen F₀-Pflanzen können endogene, 1,7 kb-lange *ZmPti1*-Transkripte nachgewiesen werden. Signifikanten Unterschiede zwischen den *ZmPti1*-Transkriptmengen im Pollen transgener und nicht-transgener Pflanzen sind nicht festzustellen. Unter Berücksichtigung der Gelbeladung (vgl. Abb. 3-29) scheint jedoch in den meisten transgenen F₀-Pflanzen die Menge an *ZmPti1*-Transkript etwas niedriger zu sein als in den nicht-transgenen Pflanzen GH 2988, A188 und H99. Diese Unterschiede sind jedoch nicht beim Vergleich der transgenen mit den beiden anderen nicht-transgenen Pflanzen GH 2992 und GH 2997 zu erkennen.

Western Analysen der ZmPTI1-Menge in reifem Pollen der transgenen F₀-Pflanzen

Auf Transkriptionsebene konnte molekularbiologisch kein PTGS-Effekt nachgewiesen werden. Zusätzlich wurde in *Western* Analysen überprüft, ob ein *Silencing* Effekt auf Proteinebene feststellbar ist (Abb. 3-31). Hierzu wurden ZmPTI1-Mengen mit dem polyklonalen ZmPTI1-Antikörper (3.3.3.2) in Pollen von zehn transgenen und drei nicht-transgenen F₀-Pflanzen sowie Pflanzen der Kontroll-Linien (A188, H99, Wildtyp, *whp*-Mutante) bestimmt. Wesentliche Unterschiede in der ZmPTI1-Menge transgener und nicht-transgener F₀-Pflanzen konnten nicht nachgewiesen werden.

In *Northern* Analysen wurde gezeigt, dass das stabil transformierte *ZmPti1*-PTGS-Konstrukt in adulten Blättern und reifem Pollen transkribiert wird. Eindeutige Hinweise auf einen *Silencing* Effekt konnte in Pflanzen der F₀-Generation nicht gefunden werden. Es ist jedoch zu bedenken, dass es wegen der Segregation des Transgens während der Pollenmeiose zu einer 1:1 Aufspaltung in transgenen und nicht-transgenen F₀-Pollen kommt. Ein potentiell auftretendes *Silencing* ist somit nur in der Hälfte der Pollen zu erwarten, was einen molekularbiologischen Nachweis in *Northern* oder *Western* Analysen erschweren könnte.

Das Auftreten eines PTGS-Effekts könnte sich, unabhängig von seiner molekularen Nachweisbarkeit, in einem veränderten Phänotyp der Nachkommen transgener F₀-Pflanzen zeigen. Vorstellbar wäre z.B., dass sich der *Silencing*-Effekt auf die Fertilität des transgenen Pollens auswirkt. Um dieses zu untersuchen, wurden detaillierte Kreuzungsexperimenten mit F₀- und *Wildtyp*-Pflanzen durchgeführt (3.3.5.3).

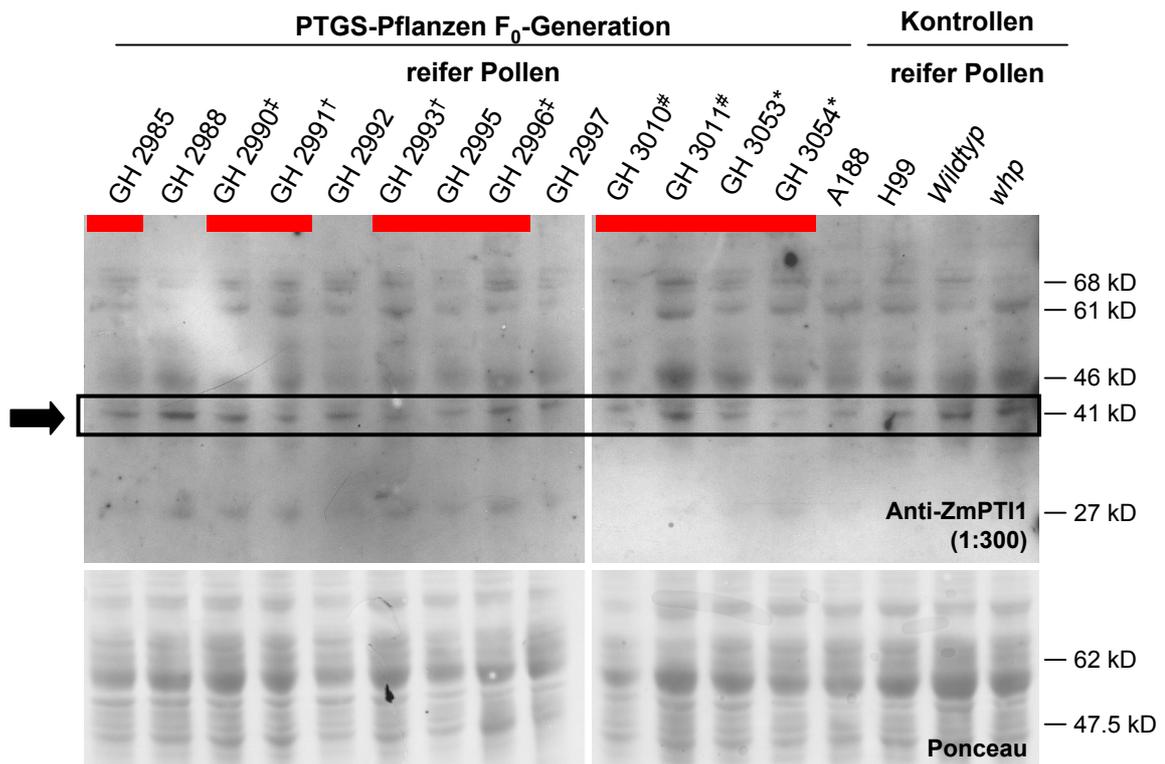


Abb. 3-31: Western Detektion von ZmPTI1 in reifem Pollen von PTGS-transformierten F₀-Pflanzen

Western Detektion des natürlich vorkommenden ZmPTI1 (Pfeil und Box) in reifem Pollen *ZmPti1*-PTGS-transgener (roter Balken) und nicht-transgenen Pflanzen mit dem polyklonalen ZmPTI1-Antikörper. Signifikante Unterschiede in der ZmPTI1-Proteinmenge zwischen transgenen und nicht transgenen F₀-Pflanzen sind nicht vorhanden.

Die durch Regression ermittelten Größen einiger Proteine sind angegeben. Die zuvor auf der Membran angefärbten Proteine [Ponceau] zeigen annähernd gleichmäßige Beladung der Spuren mit je 40 µg Pollen-Gesamtprotein.

3.3.5.3. Unterschiede in der Fertilität des transgenen Pollens

Insgesamt 180 Nachkommen der F₁-Generation von neun korrespondierenden Hin- und Rückkreuzungen⁵⁹ wurden ausgesät und analysiert. Die Keimungsraten der Körner waren in beiden Fällen nahezu identisch und lagen für die Nachkommen der Kreuzung *A188 x transgen* bei 92,6%, für die Nachkommen der Kreuzung *transgen x A188* bei 94,8%. Bei der reziproken Kreuzung *GH 2994 x A188* fiel eine sehr niedrige Keimrate von nur 50% bei nur vier Körner auf. Die Ergebnisse sind in Tab. 3-8 zusammengefaßt.

Kreuzung	AC Nr.	Keimungsrate	F1-Nachkommen		
			transgen	nicht transgen	transgen in %
2985 x A188	3725	7/8	2	5	28,57%
2989 x A188	3767	12/12	10	2	83,33%
2990 x A188	3741	11/12	5	6	45,45%
2991 x 2991	3720	11/12	9	3	75,00%
2991 x A188	3738	12/12	5	7	41,67%
2994 x A188	3768	2/4	2	0	100,00%
2995 x A188	3740	12/12	1	11	8,33%
2996 x A188	3760	12/12	7	5	58,33%
3010 x A188	3777	12/12	5	7	41,67%
transgen x A188*		95,24%	37	43	46,25%
A188 x 2985	3719	10/12	5	5	50,00%
A188 x 2986	3734	10/12	6	4	60,00%
A188 x 2989	3729	11/12	2	9	18,18%
A188 x 2990	3733	12/12	3	9	25,00%
A188 x 2991	3721	11/12	3	8	27,27%
A188 x 2994	3759	12/12	1	11	8,33%
A188 x 2995	3730	12/12	3	9	25,00%
A188 x 2996	3770	10/12	2	8	20,00%
A188 x 3010	3778	12/12	1	11	8,33%
A188 x transgen		92,59%	26	74	26,00%

Tab. 3-8: Auswertung der Kreuzungen mit transgenen F₀-Pflanzen

Ergebnisse der Kreuzungen (*transgen x A188*) und reziproke Kreuzungen (*A188 x transgen*) der *ZmPti1*-PTGS- transgenen Pflanzen der F₀-Generation. Die [Keimungsrate] gibt das Verhältnis gekeimter zu ausgesäten Körnern in Prozent an. Die Anzahl der [F₁-Nachkommen] mit Glufosinat-Resistenz [transgen] und denen ohne Resistenz [nicht transgen] ist angegeben. *In der zusammenfassenden Auswertung *transgen x A188* sind die F₁-Nachkommen der Selbstung GH 2991 (grau hinterlegt) nicht enthalten. [AC Nr.] AC-Nummern der F₁-Kolben

⁵⁹ A188 Samenanlage x transgener Pollen bzw. transgene Samenanlage x A188 Pollen

Durch wiederholtes Besprühen der Keimlinge mit Glufosinat (2.2.12.1.) wurde der Anteil an herbizidresistenten Nachkommen der F₁-Generation bestimmt. Bei Co-Transformationen kann mit einer über 80%-igen Wahrscheinlichkeit davon ausgegangen werden, dass das Transgen mit dem Resistenzmarker co-segregiert (FROMM *et al.*, 1990, SPENCER *et al.*, 1992, GORDON-KAMM *et al.*, 1990). So kann mit einiger Sicherheit von der Glufosinat-Resistenz auch auf die Anwesenheit des PTGS-Genkonstrukts rückgeschlossen werden. Dieses wurde in *Southern* Analysen mit 77 Glufosinat-resistenten F₁-Nachkommen (nicht gezeigt) bestätigt: 72 (93,5%) von ihnen trugen neben dem Resistenzmarker auch das *ZmPti1*-PTGS-Konstrukts.

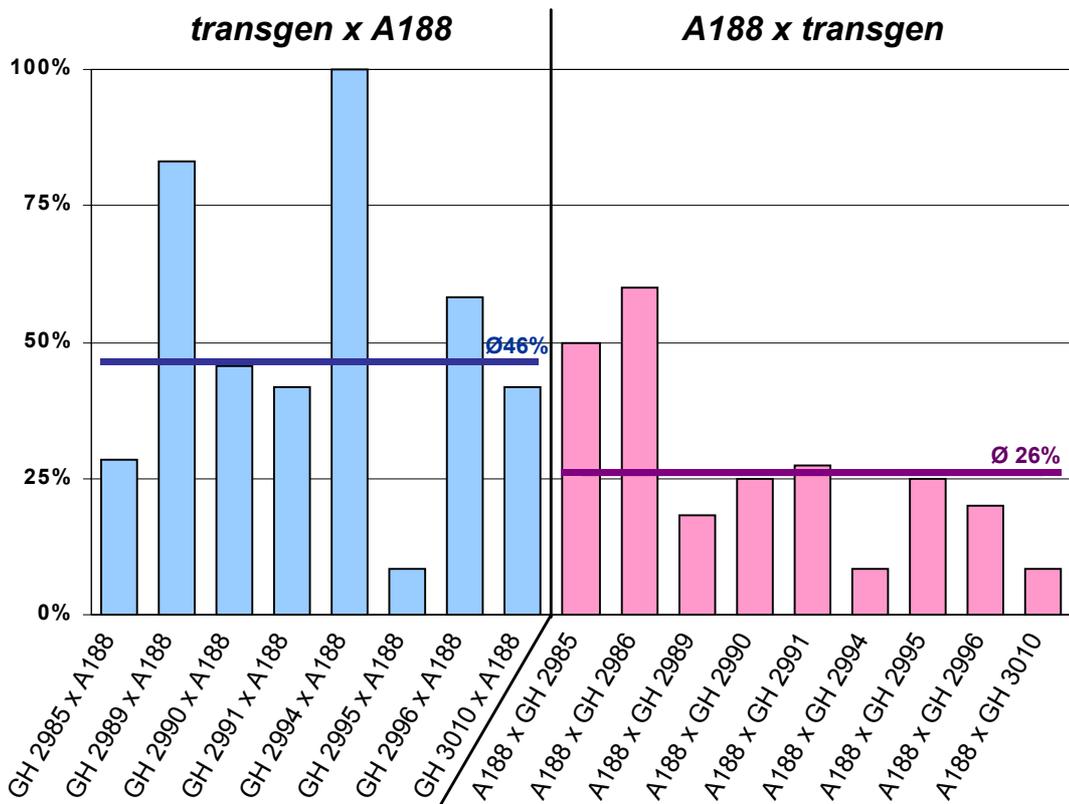


Abb. 3-32: Aufspaltung in transgene und nicht-transgene F₁-Nachkommen der reziproken Kreuzungen *ZmPti1*-PTGS-transgener F₀-Pflanzen mit der Linie A188

Die Glufosinat-Selektion von insgesamt 180 F₁-Nachkommen zeigt für die Kreuzung zwischen transgener F₀-Mutterpflanze und Pollen der Linie A188 [*transgen* x A188] etwa eine 1:1 Aufspaltung in transgene [46%] und nicht transgene [54%] F₁-Nachkommen. Für die reziproke Kreuzung zwischen A188-Mutterpflanze und transgenem Pollen [A188 x *transgen*] erfolgt eine Aufspaltung von 1:3 in transgene [26%] und nicht transgene F₁-Pflanzen [74%].

Die prozentualen Anteile transgener F₁-Nachkommen der jeweiligen Kreuzung des Typs *transgen* x A188 sind als blaue Balken, die der reziproken Kreuzung A188 x *transgen* als rote Balken angeben. Der durchschnittliche Anteil transgener F₁-Nachkommen des jeweiligen Kreuzungstyps ist als waagerechte Linie eingezeichnet. Pro Kreuzungsexperiment einer Linie wurden zwischen 2 und 12 Pflanzen ausgewertet (s. Tab. 3-8).

Die Glufosinat-Selektion junger F_1 -Keimling zeigte ein überraschendes Ergebnis (Abb. 3-32): Durchschnittlich 46% der F_1 -Nachkommen aus der Bestäubung der Samenanlagen transgener F_0 -Pflanzen mit Pollen der Linie *A188* (*transgen* \times *A188*) zeigten Herbizidresistenz. Dies entspricht ziemlich genau der erwarteten 1:1 Aufspaltung. Bei der reziproken Kreuzung zwischen der Samenanlage von Pflanzen der Linie *A188* und Pollen transgener Pflanzen (*A188* \times *transgen*) zeigten hingegen nur 26% der F_1 -Nachkommen Glufosinat-Resistenz. Dieses entspricht einer 3:1 Aufspaltung zugunsten des nicht-transgenen Merkmals.

Geht man von einer 1:1-Segregation des Transgens während der Bildung der haploiden Fortpflanzungsgewebe aus, wäre bei der reziproken Kreuzung (*A188* \times *transgen*) ebenfalls eine 1:1 Aufspaltung der F_1 -Nachkommen bezüglich der Resistenz zu erwarten gewesen. Da jedoch nur ein Viertel der Nachkommen der reziproken Kreuzung transgen sind, muss angenommen werden, dass der transgene Pollen in seiner Fertilität bzw. seinen Befruchtungseigenschaften gegenüber dem nicht-transgenen Pollen eingeschränkt ist.

Weder in *Northern* noch in *Western* Analysen (3.3.5.2) konnte ein *Silencing*-Effekt auf molekular nachgewiesen werden. Die Ergebnisse der Kreuzungsanalysen deuten jedoch auf die Existenz eines PTGS-Effekts hin, der ganz offensichtlich zu einer verminderten Fertilität führt. Welche Ebenen des Befruchtungsvorgangs dabei betroffen sind, müssen die weiteren Untersuchungen an den nachfolgenden Pflanzengenerationen und mit *in vitro* und *in vivo* keimenden Pollen zeigen. In diesem Zusammenhang durchgeführte zusätzliche *Western* Analysen mit F_1 -Pollen werden in der Diskussion angesprochen (4.3.).

4. Diskussion

Um das Verständnis der Vorgänge bei der sexuellen Fortpflanzung von Samenpflanzen zu vertiefen, sollten in der vorliegenden Arbeit neue Erkenntnisse über die molekularen Grundlagen und Regulationsmechanismen bei der Pollenkeimung und dem Pollenschlauchwachstum gesammelt werden. Hierzu sollten neue Gene identifiziert werden, die an diesen biologischen Prozessen bei Mais beteiligt und für die Pollenfertilität essentiell sind. Einen Ansatz dafür bietet die vergleichende Analyse von Genexpressionsmustern fertiler und steriler Maispollen durch subtraktive Hybridisierungen (3.1.1.).

4.1. Subtraktive Hybridisierungen zur Identifizierung von Genen, die an der Pollenentwicklung und -fertilität beteiligt sind

Zwei Subtraktionsmethoden zwischen *in vitro* gekeimten Pollen des fertilen *Wildtyp* und der männlich sterilen *whp*-Mutante (1.3.) wurden in dieser Arbeit angewendet: die subtraktive Hybridisierung nach BUCHANAN-WOLLASTON und AINSWORTH und eine suppressive subtraktive Hybridisierung nach BD BIOSCIENCES. Mit beiden Methoden konnten keine Gene gefunden werden, die auf RNA-Ebene im *Wildtyp* und der *whp*-Mutante unterschiedlich exprimiert sind.

Aus der Subtraktion nach BUCHANAN-WOLLASTON und AINSWORTH (3.1.2.) wurden durch *Dot Blot* Analysen insgesamt 13 Subtraktionsklone als potentiell differentiell exprimiert identifiziert. Acht dieser Klone repräsentierten drei unterschiedliche Bereiche der gleichen cDNA. Das aus dieser cDNA abgeleitete Protein besitzt eine hohe Homologie zur Proteinkinase LePT11, die mit der Pathogenabwehr in Tomate assoziiert ist (ZHOU *et al.*, 1995; 3.1.2.2.). Für den exemplarisch analysierten *Pti1*-homologen Subtraktionsklon D56 konnte auf RNA-Ebene jedoch wider Erwarten keine differentielle Expression des zugehörigen Gens zwischen *Wildtyp* und *whp*-Mutante nachgewiesen werden. Die daraufhin durchgeführte Überprüfung der für die Subtraktion eingesetzten cDNA-Populationen zeigte, dass in den *driver*-cDNAs keine D56-homologen Sequenzen vorhanden waren, obwohl diese in der zugrunde liegenden RNA-Population durch *Northern* Analyse gefunden wurden. Zusätzlich waren in den *driver*-cDNAs Fragmente kürzer als 250 bp unterrepräsentiert (3.1.2.3.). *In silico* Analysen der in der Subtraktion isolierten zehn *Pti1*-homologen Subtraktionsfragmente zeigten, dass diese nur die kürzeren (<230 bp) *AluI/RsaI*-Restriktionsfragmente⁶² der zugehörigen *ZmPti1*-cDNA repräsentieren. Zwei längere, potentiell ebenfalls existierende Restriktions-

⁶² die Endonukleasen *AluI* und *RsaI* wurden verwendet, um vollständige cDNAs für die Synthese der *driver*- und *tester*-cDNA-Populationen vorzubereiten

fragmente der *ZmPti1*-cDNA (236 und 513 bp), konnten hingegen nicht aus der Subtraktion kloniert werden. Diese längeren Fragmente wurden mit großer Wahrscheinlichkeit während der Subtraktion abgereichert. Zusammengenommen zeigen diese Ergebnisse, dass in der durchgeführten Subtraktion kürzere cDNA-Fragmente der *tester*-Population unabhängig von der zugrunde liegenden Genexpression angereichert wurden, weil entsprechende Fragmente in der *driver*-cDNA nicht vorhanden waren. Es ist möglich, dass die entsprechenden *driver*-Sequenzen bei der Abtrennung nicht eingebauter *driver*-Adaptoren aus der *driver*-cDNA-Population entfernt wurden (2.2.7.1.).

Auch aus den circa 200 Subtraktionsklonen, die nach differentieller Durchmusterung aus der suppressiven subtraktiven Hybridisierung (SSH) isoliert wurden (3.1.3.), konnten keine Klone identifiziert werden, die differentiell exprimierte Gene repräsentierten.

Erfahrungen aus SSH mit tumorbildenden und gesunden Geweben haben gezeigt, dass manchmal zwischen 300 und 500 (DESAI *et al.*, in Vorbereitung; MUELLER *et al.*, 1997) oder sogar mehr Einzelklone (VON STEIN *et al.*, 1997) getestet werden müssen, um nachzuweisen, ob eine Subtraktion erfolgreich verlaufen ist und differentiell exprimierte Gene vorhanden sind. Diese Erfahrungswerte beruhen auf SSH in Geweben, in denen aufgrund der Tumorbildung signifikante Unterschiede im Expressionsmuster zu erwarten sind. Es ist zu vermuten, dass die Unterschiede zwischen den Expressionsmustern der in dieser Arbeit eingesetzten Gewebe hierzu vergleichbar oder sogar geringer sind. Da mit der Abnahme von quantitativen Unterschieden eine Zunahme des Hintergrunds an nicht differentiell exprimierten cDNAs einhergeht (BD BIOSCIENCES, 2000), hätte wohl die Analyse einer noch weitaus größeren Zahl von Einzelklonen die Identifizierung von differentiell exprimierten Genen erlaubt. Die in dieser Arbeit angewendeten Methoden waren auf solche sehr umfangreichen Analysen nicht ausgelegt.

Die vermutlich geringen Unterschiede im Genexpressionsmuster der eingesetzten Gewebe sind grundsätzlich ein herausforderndes Problem für molekulare Subtraktionen. Zusätzlich kann nicht genau bestimmt werden, zu welchem Zeitpunkt und ob sich die Flavonoldefizienz in der *whp*-Mutante auf der Ebene der Transkription auswirkt. Bei *whp*-Pollen keimt der Pollenschlauch ohne Zugabe von Flavonolen aus und wächst bis zu 12 h normal, bevor er platzt (MO *et al.*, 1992; MODENA, 1982; POLLAK *et al.*, 1995). Die geringe Beeinträchtigung des anfänglichen Pollenschlauchwachstums des *whp*-Pollen bietet gegenüber vollständig sterilem Pollen zwar ein besonders differenziertes experimentelles System, lässt aber auch daran zweifeln, ob es zum Zeitpunkt der Pollenreife oder kurz nach dem Einsetzen der Keimung Unterschiede zwischen *whp*- und *Wildtyp*-Pollen gibt, die mit den angewendeten Methoden nachweisbar sind. Eine veränderte Genexpression im *whp*-Pollen könnte sich erst zu einem

wesentlich späteren Zeitpunkt z.B. kurz vor Einstellung des Schlauchwachstums manifestieren. Andererseits erfolgt die Einlagerung der Flavonole und die Bildung vieler pollenspezifischer mRNAs bereits relativ früh während der Mikrosporogenese. Von GUYON *et al.* (2000) konnten mehrerer Gene identifiziert werden, deren Expression stark von der Anwesenheit von Flavonolen abhängig ist. Die von GUYON *et al.* (2000) durchgeführte Subtraktion erfolgte in einem CMF-System mit transgener *Petunie hybrida*. In den keimungsunfähigen Pollen dieser flavonoldefizienten Petunien kann die Keimfähigkeit und Fertilität durch Flavonolzugabe unmittelbar wiederhergestellt werden (MO *et al.*, 1992). In diesem System bleiben diese sehr kurzfristigen Veränderungen nicht ohne Wirkung auf die Genexpression, so daß auch bei Mais bei einem Fehlen der Flavonole Veränderungen auf der Transkriptionsebene vermutet werden können.

Die durchgeführten Experimente deuten jedoch darauf hin, dass sich Pollen der *whp*-Mutante des Mais auf Transkriptionsebene vermutlich nur sehr wenig von Pollen des *Wildtyps* unterscheidet. Denkbar ist, dass es nicht zu einem vollständigen Ausfall einzelner Genexpressionen kommt, sondern nur kleinere Veränderungen in Transkriptmengen einzelner Gene auftreten. Möglicherweise ist der durch den Flavonolmangel hervorgerufene Phänotyp auch eher eine Folge von Veränderungen auf der Ebene der posttranskriptionellen Regulation. Dabei könnte das verminderte Pollenschlauchwachstum z.B. auf Fehlfunktionen von Signaltransduktionen, des Vesikeltransports oder von Ionengradienten zurückzuführen sein.

Die isolierten *Pti1*-homologen Sequenzen erschienen, aufgrund der extrem starken und pollenspezifischen Expression des korrespondierenden Gens in Mais (3.1.2.3. und 3.3.1.1.), als ein besonders interessantes Ziel weiterer Untersuchungen.

4.2. Charakterisierung der PTI1-homologen Proteinkinase ZmPTI1

Obwohl alle bis *dato* identifizierten Mitglieder der *Pti1*-Genfamilie anderer Pflanzen mit der Pathogenabwehr in grünen Geweben assoziiert sind (1.4. und 3.2.), scheint eine vergleichbare Funktion des homologen Gens in Maispollen relativ unwahrscheinlich zu sein. Denkbar ist, dass die Identifizierung einer *Pti1*-homologen Kinase in Pollen ein weiteres Indiz zur Bestätigung des gemeinsamen Ursprungs der molekularen Prozesse bei der Pathogenabwehr und der Pollinierung liefern könnte (siehe Einleitung). Mit dem Ziel, die Bedeutung des *Pti1*-homologen Genproduktes für die Pollenentwicklung und Pollenfertilität zu untersuchen, wurde im Verlauf dieser Arbeit eine umfassende Charakterisierung dieses Gens auf Nukleinsäure-, auf Protein- und auf funktioneller Ebene durchgeführt.

ZmPti1 wird sehr stark und pollenspezifisch exprimiert

Die *ZmPti1*-Expression ist in der *Wildtyp*- und *whp*-Linie vergleichbar und steigt in den Antheren im Verlaufe der Pollenentwicklung stark an. Die größte mRNA-Menge wurde in reifem Pollen und in *in vitro* gekeimtem Pollen nachgewiesen. In allen anderen untersuchten Geweben – Seide, Körner, Wurzeln, Keimling und Blatt – konnten *ZmPti1*-Transkripte nicht nachgewiesen werden (3.3.1.1.).

Durch einen *PCR*-Ansatz (3.3.1.2.) konnte die *ZmPti1*-Expression zusätzlich in Zelltypen des weiblichen Gametophyten, in Embryonen, im Endosperm und in jungen Blättern nachgewiesen werden. Dieser wesentlich sensitivere Nachweis läßt vermuten, daß neben der starken *ZmPti1*-Expression in Pollen auch eine basale, nicht durch *Northern* Analysen (3.3.1.1.) detektierbare Expression in anderen Geweben vorhanden ist.

In Übereinstimmung mit den Expressionsdaten konnten in *in silico* Studien des *ZmPti1*-Promotors neben den Grundelementen von Promotoren protein-codierender Gene auch Sequenzmotive identifiziert werden, die mit der Regulation einer pollenspezifischen Expression in Verbindung stehen (3.3.2.).

Zahlreiche Pollen Boxen I (PBI) liegen im Bereich von -700 bis +1. PBI-Motive sind in Assoziation mit der seltener in diesem Promotorbereich vorkommenden GAAA-Sequenzen für die pollenspezifische Expression verantwortlich. Ein *Enhancer* dieser Expression (BATE und TWELL, 1998) fehlt im *ZmPti1*-Promotor. Eine *Quantitative-Box* ist im *ZmPti1*-Promotor an Position -201 lokalisiert. Diese ist für die Expressionsstärke des Pollengens *Zm13* (HAMILTON *et al.*, 1998) sowie anderer pollenspezifisch exprimierter Gene aus Tomate (*lat52*, *lat59*; BATE und TWELL, 1998) und Tabak (*ntp303*; HULZINK *et al.*, 2002) verantwortlich. Zwischen -282 und -231 befinden sich im *ZmPti1*-Promotor die Sequenzmotive Box I und Box II, die

aus den Promotoren der SLG⁶³-Gene aus *Brassica* bekannt sind. Kombiniert mit zwei weiteren *Silencer*-Elementen reduzieren diese im transienten Assay in Tabakpollen die Expression des Reportergens um den Faktor 13 (DZELZKALNS *et al.*, 1993).

Die Wirkung der, in den zitierten Studien beschriebenen *cis*-Elemente, wurde über die Aktivität von Reporter-Gen-Produkten bestimmt. Eine direkte Korrelation von identifizierten *Enhancer* und *Silencer* Motiven im *ZmPti1*-Promotor mit der *ZmPti1*-Transkriptmenge ist daher nicht möglich.

Eine experimentelle Möglichkeit, um die regulativ wirkenden DNA-Sequenzen im *ZmPti1*-Promotorbereich grob einzugrenzen, boten transiente Expressionsanalysen mit Promotor-Reporter-Gen-Konstrukten. Dabei wurde das *uidA*-Gen unter Kontrolle drei verschieden langer Abschnitte des *ZmPti1*-Promotors (pA1, pA2 und pA3) eingesetzt (3.3.2.2.).

Der histochemische β -Glucuronidase-Nachweis (GUS) mit transformierten Pollen der Linie A188 und zehn Tage alten Maisembryonen (Linie A188 x H99) zeigte, dass alle drei *ZmPti1*-Promotorfragmente in Pollen aktiv sind. In Embryonen konnte mit den längeren Promotorfragmenten pA1 und pA2 dagegen nur eine sehr schwache GUS-Aktivität nachgewiesen werden. Unter Kontrolle des kürzesten Promotorfragments A3 war die GUS-Aktivität in Embryonen deutlich höher. Insgesamt konnte deshalb eine Abnahme der Gewebespezifität der drei *ZmPti1*-Promotorbereiche mit zunehmender Verkürzung des 5' Promotorbereiches festgestellt werden. Das deutet darauf hin, dass die Pollenspezifität des Promotors von relativ weit 5' liegenden *cis*-Elemente positiv beeinflusst wird.

In Pollen wurden die Aktivitäten der drei *ZmPti1*-Promotorbereiche A1, A2 und A3 durch Enzymassays quantifiziert (3.3.2.2.). Im Vergleich zur Aktivität des *Ubiquitin*-Promotors konnten mit den drei *ZmPti1*-Promotorfragmenten nur relativ geringe GUS-Aktivitäten (\emptyset A1: 8,15%; A2: 12,05%; A3: 6,88%) festgestellt werden, die nur wenig über den GUS-Aktivitäten eines promotorlosen Kontrollkonstrukts lagen (\emptyset 3,88%).

Diese Expressionsanalysen scheinen auf eine vergleichsweise geringe Aktivität des *ZmPti1*-Promotors in Verbindung mit dem Reporter-Gen hinzudeuten. Auf den ersten Blick steht dies im Widerspruch zu der sehr hohen Menge an *ZmPti1*-Transkripten im reifen Pollen. (3.3.1.1.). Mögliche Gründe für diese Diskrepanz könnten fehlende regulatorische *cis*- oder *trans*-Elemente im transienten Testsystem sein. Es ist aber auch denkbar, dass die große *ZmPti1*-Transkriptmenge in reifen Pollen auf einer fortlaufenden Akkumulation von relativ stabilen *ZmPti1*-mRNAs im Verlauf der Pollenentwicklung basiert. In diesem Fall würde der

⁶³ S Locus Glycoprotein

ZmPti1-Promoter keine starke Transkription mit einem hohen *turn over* der mRNAs vermitteln, sondern eher zu einem kontinuierlichen Anstieg der Transkriptmenge beitragen.

Weiterhin wäre vorstellbar, dass durch den *ZmPti1*-Promotor eine posttranskriptionelle Regulation der Proteinmenge vermittelt wird, die sich auch im transienten Reportersystem durch eine relativ geringe Menge an β -Glucuronidase manifestiert. Dies ist deshalb denkbar, da die verwendeten Promotorfragmente die vollständige 5' UTR-Sequenz sowie das erste Intron des *ZmPti1*-Gens enthalten. Für eine gewebespezifische Translationskontrolle könnten bisher nicht identifizierte *cis*-Elemente in dieser Region des *ZmPti1*-Gens verantwortlich sein. Es konnte mehrfach gezeigt werden, dass den 5' nicht-translatierten Bereichen anderer Gene eine wichtige Funktion bei der Translationskontrolle zukommt (BATE *et al.*, 1996; BATE und TWELL, 1998; CURIE und MCCORMICK, 1997; DZELZKALNS *et al.*, 1993; HAMILTON *et al.*, 1998; HULZINK *et al.*, 2000; ROGERS *et al.*, 2001).

Die Analyse von Pflanzen, in denen die entsprechenden Konstrukte stabil transformiert wurden (Daten nicht gezeigt), kann zum weiteren Verständnis der *ZmPti1*-Expressionsregulation beitragen. Zur Analyse der Einflüsse möglicher *cis*-regulatorischer Elemente im 5' UTR Bereich des *ZmPti1*-Gens sind weitere Studien mit *ZmPti1*-Reporter-gen-Konstrukten ohne 5' UTR und Intron geplant.

ZmPTI1 ist eine Serin/Threonin-Proteinkinase mit Autophosphorylierungsaktivität

Die, aus dem klonierten *ZmPti1*-cDNA-Klon (3.2.1.; [AY554281]), abgeleitete Aminosäuresequenz des *ZmPti1* codiert für ein 40.840 Da großes Protein aus 374 Aminosäuren. Homologievergleiche auf Aminosäureebene zeigen eine 71%-ige Sequenzidentität des ZmPTI1 mit der Proteinkinase PTO INTERACTOR 1 aus Tomate (LePTI1; ZHOU *et al.*, 1995) und eine 78%-ige Identität mit einer PTI1-ähnlichen Kinase aus Reis (3.2.2.).

Die theoretische Analyse der ZmPTI1-Aminosäuresequenz zeigte, dass es sich bei ZmPTI1, wie bei LePTI1, um ein Familienmitglied der Proteinkinasen mit Serin/Threonin-Spezifität handelt (3.2.2.1.). Es wurde festgestellt, dass 13 der 14 hochkonservierten Aminosäuren sowie die elf charakteristischen Subdomänen, die durch HANKS *et al.* (1988) und HANKS und QUINN (1991) beim Vergleich von mehr als 100 Proteinkinasen identifiziert wurden, in ZmPTI1 ebenfalls vorhanden sind.

Die theoretische Beschreibung von ZmPTI1 als klassische Proteinkinase mit Serin/Threonin-Substratspezifität und ihre hohe Homologie zur Serin/Threonin-Proteinkinase LePTI1 legen nahe, die ZmPTI1-Kinaseaktivität *in vitro* näher zu untersuchen. Dies war insbesondere deshalb wichtig, da allein aufgrund von Strukturanalysen kein Nachweis einer Kinaseaktivität erfolgen kann und z.B. nicht alle LePTI1-homologen Kinasen Autophosphorylierungsaktivität besitzen. In Sojabohne wurden, neben einer autophosphorylierungsaktiven PTI1-homologen Kinase, zwei autophosphorylierungsdefiziente PTI1-Kinasen identifiziert (TIAN *et al.*, 2004; STASWICK, 2000).

In Phosphorylierungsassays mit rekombinantem ZmPTI1-6His konnte gezeigt werden, dass ZmPTI1 *in vitro* Autophosphorylierungsaktivität besitzt. Die Autophosphorylierungsaktivität konnte durch den Austausch des Lysin¹⁰⁰ gegen eine Asparagin in einem modifizierten Fusionsprotein ZmPTI1(K100N)-6His eliminiert werden (3.3.4.2.1.). Der Verlust der Autophosphorylierungsaktivität beim Austausch des hochkonservierten Lysins in der Subdomäne II konnte für zahlreiche Proteinkinasen (HANKS *et al.*, 1988) sowie auch für LePTI1 und LePTO nachgewiesen werden (ZHOU *et al.*, 1995; LOH und MARTIN, 1995).

Ferner konnte in den Experimenten gezeigt werden, dass die Phosphorylierungsaktivität von ZmPTI1, trotz der sehr großen Ähnlichkeit zu LePTI1, spezifisch ist, da ZmPTI1 nicht in der Lage ist, LePTI1 zu phosphorylieren. Außerdem phosphoryliert die *upstream* von LePTI1 gelegene Kinase LePTO zwar ihr Substrat, LePTI1, jedoch nicht die PTI1-Kinase aus Mais (3.3.4.2.1.). Diese Spezifitäten der untersuchten Serin/Threonin-Proteinkinasen sind insbesondere deshalb hervorzuheben, da es sich bei den durchgeführten Assays um *in vitro* Ansätze handelt, in denen die Substratspezifität erfahrungsgemäß geringer sein kann, als in der *in vivo* Situation.

Ein mögliches Ziel der ZmPTI1-Autophosphorylierung und potentieller *trans*-Phosphorylierungen könnte das Threonin²³⁷ (T²³⁷) sein. Dafür sprechen, neben der Lokalisierung von T²³⁷ stromaufwärts der Proteinkinase-Subdomäne VIII (3.2.2.1.) Untersuchungen von SESSA *et al.* (2000). Sie identifizierten in LePTI1 das Threonin²³³ als Ziel der LePTO-vermittelten *trans*-Phosphorylierung und postulieren, dass dieses auch Ziel der LePTI1-Autophosphorylierung ist. Die Gegenüberstellung der Aminosäuresequenzen der PTI1 Sequenzen aus Mais- und Tomate zeigen, dass das ZmPTI1-T²³⁷ vermutlich funktionell dem LePTI1-T²³³ entspricht (3.2.2.). Experimentell könnte dies durch einen tryptischen Verdau und MALDI-MS⁶⁴ des auto- und *trans*-phosphorylierten ZmPTI1 untersucht werden.

⁶⁴ MALDI-MS: *matrix assisted laser desorption/ionization mass spectrometry*

Hinweise auf putative Phosphorylierungspartner von ZmPTI1

In Gesamtprotein aus reifem Pollen und aus Seide konnten Kinase(n) festgestellt werden, die ZmPTI1 *in vitro* phosphorylieren (3.3.4.2.2.). Auch in Gesamtprotein aus sieben Tage alten Keimlingen konnte die Existenz von PTI1-*trans*-phosphorylierenden Kinasen nachgewiesen werden. Die relative Aktivität dieser Kinase(n) erscheint jedoch wesentlich geringer als die vergleichbaren Aktivitäten in Protein aus Pollen bzw. Seide.

In Proteinen des Pollens wäre endogenes ZmPTI1, das auch durch *Western* Analyse in reifem Pollen nachgewiesen werden konnte (3.3.3.3.), ein möglicher Phosphorylierungspartner des ZmPTI1(K100N)-6His.

Neben phosphorylierenden Aktivitäten, konnten in den Assays mit Pollen- und Seideproteinen auch Hinweise auf Komponenten gefunden werden, die eine Autophosphorylierung des ZmPTI1 behindern. Die verminderte Fähigkeit zur Autophosphorylierung war auch noch vorhanden, wenn die Kinasereaktion erst nach der Aufreinigung des ZmPTI1-6His aus dem Gesamtextrakt durchgeführt wurde (Interaktionskinase-Assay, 3.3.4.2.3.). Dies lässt entweder auf eine spezifische Interaktion des ZmPTI1 mit einer inhibierenden Komponente oder auf eine irreversible Hemmung vor der Aufreinigung schließen. Interessanterweise scheinen diese hemmenden Komponenten in Proteinextrakten aus Keimlingen nicht vorzukommen. Dies wird bei einem Vergleich der Phosphorylierungsmuster des Interaktions-Kinase-Assays (3.3.4.2.3., Abb. 3-17 [4a]) und des Phosphorylierungsassays (3.3.4.2.2., Abb. 3-16 [4a]) deutlich. Im Interaktions-Kinase-Assay wurde die Autophosphorylierung des als Kontrolle eingesetzten ZmPTI1-6His nicht behindert. Im Phosphorylierungsassay, bei dem zum Zeitpunkt der Kinasereaktion noch alle Proteine des Gesamtextrakts anwesend waren, trat hingegen eine Hemmung der Phosphorylierung auf. Folglich scheint die im Gesamtprotein aus Keimlingen vorhandene inhibierende ZmPTI1-Aktivität bei der Aufreinigung des ZmPTI1 verloren zu gehen.

Ein weiterer Grund für die herabgesetzte Autophosphorylierung des ZmPTI1-6His könnte die Anwesenheit potentieller ZmPTI1-Substrate sein, die an ZmPTI1 binden und *in vitro trans*-phosphoryliert werden. In den durchgeführten Assays konnte keines dieser möglichen Substrate in den Autoradiogrammen identifiziert werden. Es ist allerdings davon auszugehen, dass die Menge eines PTI1-Substrates unterhalb der Nachweisgrenze liegen würde. Zur Erhöhung der Sensitivität können für den Nachweis in Interaktions-Kinase-Assays während der Präinkubation des rekombinanten ZmPTI1 größere Gesamtproteinmengen der verschiedenen Gewebe eingesetzt werden.

Die Abnahme der Autophosphorylierungsfähigkeit kann nicht auf die Existenz von Phosphatasen und Proteasen in den Extrakten zurückgeführt werden, da verschiedene Phosphatase- und Proteaseinhibitoren zugesetzt wurden.

Weitere Versuche zur Identifizierung von Proteinkinasen, deren *in vivo* Substrat ZmPTI1 sein könnte, erfolgten mit einem *in-gel* Kinase Assay nach WOOTEN (2002; 3.3.4.2.4.).

In allen eingesetzten Proteinextrakten – aus reifem Pollen, reifer und unreifer Seide, gekeimten Körnern, jungen Wurzeln, jungen Keimlingen sowie adulten Blättern – konnten Phosphorylierungsaktivitäten im Bereich von 41 kDa, 35 kDa und wesentlich schwächer bei 27 kDa gefunden werden. Es konnten keine Phosphorylierungen detektiert werden, die ausschließlich im Gel mit ZmPTI1(K100N)-6His-Substrat auftraten. Dies bedeutet, dass in den eingesetzten Gesamtproteinextrakten Kinasen der drei Größen vorhanden sind, die zumindest Autophosphorylierungsaktivität besitzen. Die insgesamt stärkere Intensität der Phosphorylierungssignale bei 35 kDa im Gel mit Substrat deutet jedoch gleichzeitig an, dass wenigstens eine dieser Kinasen ZmPTI1-Substratspezifität zu besitzen scheint.

Der Vergleich der Phosphorylierungsintensitäten der 41 kDa-Bande beider Autoradiogramme zeigt ein nahezu identisches Phosphorylierungsmuster mit Schwankungsbreiten unter 20%, nur bei Proteinen der Wurzel steigt die Intensität im Gel mit Substrat um 55% an. Aus diesen stabilen *Intensitätsverhältnissen* und aufgrund der allgemeinen Intensitätszunahme im Gel mit Substrat ist zu vermuten, dass die bei 41 kDa detektierte Phosphorylierung vermutlich nur auf einer Autophosphorylierung der dort lokalisierten Proteine basiert.

Allerdings ist aufgrund der zu ZmPTI1 vergleichbaren Größe nicht vollständig auszuschließen, dass es sich bei der 41 kDa Aktivität um endogenes ZmPTI1 handelt und dieses durch *trans*-Phosphorylierung des ZmPTI1(K100N)-6His ein stärkeres Phosphorylierungssignal im substrathaltigen Gel hervorruft.

Die Phosphorylierungen bei 35 kDa zeigen deutliche Unterschiede in beiden Gelen. Im Gel mit Substrat ist bei allen Geweben ein signifikanter Anstieg des Phosphorylierungssignals zwischen 22% und mehr als 300% zu verzeichnen. Außerdem treten deutliche Veränderungen der Phosphorylierungsstärke zwischen den einzelnen Geweben auf.

Die Zunahme der Phosphorylierungsaktivität ist besonders mit Protein aus Pollen, unreifer Seide und Wurzeln. Mit Gesamtprotein aus Pollen bzw. unreifer Seide kommt es zu einer Verdoppelung der Phosphorylierungsintensität, mit Proteinen aus sieben Tage alten Wurzeln sogar zu einer Vervierfachung (+305%). In reifer Seide ist nur eine sehr viel geringere Phosphorylierungsaktivität als in unreifer Seide vorhanden. Offensichtlich ist die Phosphorylierungsaktivität in Seide von deren Entwicklungszustand abhängig. Die Aktivität ist in jungen Narbenfäden hoch, in älteren deutlich niedriger.

Insgesamt weist die Auswertung der *in-gel* Assays auf eine – oder mehrere – ZmPTI1-*trans*-phosphorylierende Kinase(n) mit Größen von circa 35 kDa hin. Starke Kinaseaktivität zeigen dabei Gewebe, in denen entweder ZmPTI1 selbst exprimiert wird (Pollen) oder Gewebe das

mit Pollen in Kontakt steht (Seide). Ausserdem scheint eine ZmPTI1-Kinase in Wurzeln vorhanden zu sein. Allen drei Geweben ist die Fähigkeit zu schnellem Längenwachstum gemeinsam. Möglicherweise besteht ein Zusammenhang zwischen der ZmPTI1-Funktion und Prozessen des schnellen Wachstums, wie es sowohl beim Pollenschlauch als auch bei Wurzeln auftritt (HEPLER *et al.*, 2001).

Bei der Interpretation der Ergebnisse des *in-gel* Assays darf nicht außer Acht gelassen werden, dass die gefundenen Unterschiede in der Phosphorylierungsaktivität auch allein auf einer gesteigerten Autophosphorylierungsaktivität der jeweiligen Kinasen in Gegenwart des Substrates zurückzuführen sein könnten. Dieses scheint jedoch für die bei 35 kDa detektierten Proteine wenig wahrscheinlich, da in den verschiedenen Geweben extreme Unterschiede der Phosphorylierung in Gegenwart von ZmPTI1(K100N)-6His auftraten. Stärkere Phosphorylierungen im Gel mit Substrat können nicht auf *trans*-Phosphorylierungen durch das eingesetzte ZmPTI1(K100N)-6His zurückzuführen sein, da der Tausch des hochkonservierten Lysins in der Proteinkinase-Subdomäne II die Phosphatübertragung komplett eliminiert (HANKS *et al.*, 1988).

Ein grundsätzliches Problem stellt die funktionelle Renaturierung der Kinasen aus dem Proteinextrakt sowie deren Aktivität unter den gewählten Assaybedingungen dar. Das Fehlen einer Autophosphorylierung des, als Positivkontrolle eingesetzten ZmPTI1-6His deutet auf Probleme bei der funktionellen Rückfaltung des rekombinanten ZmPTI1-Proteins hin. Sollte die Rückfaltung des ZmPTI1-6His behindert sein, könnte dies auch für endogenes ZmPTI1 aus den Proteinextrakten gelten. Eventuell ist auch aufgrund schlechter Affinitätsaufreinigung nicht genügend ZmPTI1-6His als Kontrolle im *in-gel* Assay eingesetzt worden, da im Anschluß an die Autoradiografie sowohl durch eine Färbung des substratfreien Gels mit Coomassie-Lösung als auch durch eine *Western* Analyse keine adäquate ZmPTI1-6His-Menge nachgewiesen werden konnte (Daten nicht gezeigt).

Da die Gesamtproteine unter denaturierenden Bedingungen aufgetrennt wurden, konnten Phosphorylierungsaktivitäten von multimeren Proteinkomplexen in diesem *in-gel* Assay nicht nachgewiesen werden. Für deren Aktivitätsnachweis sollten Extrakte nativ aufgetrennt werden.

4.3. Bedeutung von ZmPTI1 für die Pollenkeimung

Die Sequenzanalysen auf Aminosäureebene und die Charakterisierungen der Kinaseaktivität konnten zeigen, dass es sich bei dem *ZmPti1*-Genprodukt ZmPTI1 um eine Serin/Threonin-Proteinkinase mit Homologien zur PTI1-Kinase LePTI1 aus Tomate handelt (3.2.2.).

Erste verlässliche Hinweise auf die *in vivo* ZmPTI1-Funktion während der Pollinierung ergaben sich aus der Analyse der F₀- und F₁-Pflanzen des durchgeführten *post-transcriptional gene silencing* Ansatzes (PTGS) zum funktionellen Ausschalten des *ZmPti1*-Gens (3.3.5.).

Bei Analysen von 20 transgenen F₀-Regeneraten konnte keine signifikante Abnahme der *ZmPti1*-Transkript- oder ZmPTI1-Proteinmenge nachgewiesen werden (3.3.5.2.). Phänotypisch konnte jedoch ein PTGS-Effekt bei der Auswertung von Kreuzungsexperimenten zwischen transgenen F₀-Pflanzen und *Wildtyp*-Pflanzen der Linie *A188* gefunden werden (3.3.5.3.). Die Zahl transgener F₁-Nachkommen, die aus der Bestäubung weiblicher *A188*-Blüten mit Pollen transgener F₀-Pflanzen (*A188* x transgene F₀) hervorgegangen waren, lag mit 26% (Aufspaltung 1:3 transgen zu nicht-transgen) wesentlich niedriger als bei F₁-Nachkommen aus der reziproken Kreuzung (transgene F₀ x *A188*). Hier waren 46% der F₁-Nachkommen transgen, was einer erwarteten Aufspaltung von etwa 1:1 für einen Einzellocus-Erbgang entspricht. In weiteren, in dieser Arbeit nicht dokumentierten, Kreuzungsexperimenten wurden bei der Selbstung transgener F₁-Nachkommen für die F₂-Generation Aufspaltungsverhältnisse von 1:1 (transgen zu nicht-transgen) gefunden.

Aufgrund der meiotischen Segregation des Transgens ist im Falle einer Einzellocus-Integration des Transgens nur 50% des Pollens transgen. Für die Nachkommen der Kreuzungen zwischen *Wildtyp* und transgenen F₀-Pflanzen ist für die F₁-Generation theoretisch eine Aufspaltung von 1:1 in transgen und nicht-transgen zu erwarten. Für die Selbstung von transgenen F₁-Pflanzen wäre dann eine Aufspaltung von 3:1 (transgene zu nicht-transgenen F₂-Nachkommen) zu erwarten.

Aus der 1:3 Aufspaltung der F₁-Nachkommen in transgene (26%) und nicht-transgene (74%) bei der Kreuzung *A188* x transgene F₀-Pflanzen kann rückgeschlossen werden, dass der transgene Anteil der Pollen weniger fertil war, als der nicht-transgene Pollen. Die reziproke Kreuzung (transgene F₀ x *A188*) spaltet hingegen wie erwartet 1:1 auf. In dieser reziproken Kreuzung wird das Transgen durch die mütterliche Keimbahn vererbt und aufgrund der Segregation bei der Oogenese auf 50% der Nachkommen übertragen. Offensichtlich ist der mütterliche Vererbungsweg nicht durch das Transgen beeinflusst.

Die Reduktion der Fertilität transgener Pollen zeigte sich noch deutlicher bei der Selbstung von transgenen F₁-Nachkommen. Nur etwa die Hälfte der 96 getesteten Pflanzen der F₂-Nachkommen waren transgen (1:1 Aufspaltung). Bei Selbstung einer heterozygot-trans-

genen Pflanze wäre jedoch eine 3:1 Aufspaltung in transgen und nicht-transgen zu erwarten gewesen. Da aufgrund der vorherigen Kreuzungen ausgeschlossen werden kann, dass die transgenen Eizellen in ihrer Fertilität eingeschränkt sind, kann eine 1:1 Aufspaltung nur erhalten werden, wenn der transgene Pollen steril ist und die Befruchtung ausschließlich durch die übrigen 50% nicht-transgenen Pollen erfolgt. Vitalitätsuntersuchungen mit Fluoreszindi-acetat zeigten jedoch keine Unterschiede zwischen Pollen transgener F_1 -Pflanzen und Pollen der *A188 Wildtyp*-Linie (persönliche Mitteilung Jantjeline Kluth⁶⁵). *Western* Analysen der F_1 -Pollen zeigten allerdings eine signifikante Abnahme der ZmPTI1-Menge um teilweise bis zu 50% (6 Pflanzen: \emptyset -Abnahme: 43%, Standardabweichung 19%). Diese Reduktion entspricht fast dem vollständigen Verlust des endogenen ZmPTI1 in transgenen Pollen. Aufgrund dieser Daten kann vermutet werden, dass transgener Pollen zwar vollständig ausreift und lebensfähig ist, aber nicht in der Lage ist, eine erfolgreiche Pollinierung durchzuführen.

Die Selbstung der transgenen F_1 -Pflanzen, aber auch die Kreuzungsexperimente in der F_0 -Generation deuten stark darauf hin, dass ZmPTI1 während der Pollinierung und/oder Befruchtung eine große biologische Relevanz besitzt. Unabhängig von der relativ geringen Wirkung des PTGS-Effekts auf die Transkript- bzw. Proteinmenge in F_0 -Pollen (3.3.5.2.), ist die phänotypische Auswirkung signifikant. In der F_2 -Generation nimmt die Ausprägung des Phänotyps weiter zu.

Möglicherweise korreliert die unterschiedliche Stärke des PTGS-Effektes mit der Fertilität des transgenen Pollens. Transgener Pollen der F_0 -Pflanzen mit verringerter Fertilität – nur 26% der F_1 -Generation sind transgen – zeigt keine oder nur eine geringe Abnahme des ZmPTI1-Proteins. In der F_1 -Generation kommt es dann zu einer stark reduzierten ZmPTI1-Menge und sterilem Pollen (Aufspaltung der Selbstung 1:1). Denkbar ist, dass der PTGS-Effekt erst mit der F_1 -Generation entfaltet wird und aufgrund von *in vitro* Kultureffekten bei den Regeneraten der F_0 noch nicht voll ausgebildet ist.

Auf welchen molekularen oder anatomischen Veränderungen der beschriebene Phänotyp in den PTGS-transgenen Maispollen beruht, muß in zukünftigen *in vitro* und *in planta* Versuchen mit transgenem Pollen gezeigt werden. Untersuchungen von MUSCHIETTI *et al.* (1994) mit transgenen *antisense*-Pflanzen, bei denen das späte Pollengen *lat52* ausgeschaltet wurde, zeigten in einer Gruppe von transgenen Linien eine veränderte Rehydrierung und ein abnormes, verdrillt-verknotetes Pollenschlauchwachstum. Dies hatte die Sterilität des Pollens zur Folge und führte zu einer 1:1 Aufspaltung in transgene und nicht transgene Nachkommen nach der Selbstung dieser Pflanzen. Eine andere Gruppe von genetisch transgenen Pflanzen zeigte hingegen normal rehydrierende und keimende Pollen und eine 3:1 Aufspal-

⁶⁵ Biozentrum Klein Flottbek und Botanischer Garten, Universität Hamburg

tung in transgene und nicht transgene Nachkommen. Analysen auf RNA- und Proteinebene zeigten in der 3:1-Gruppe kaum Unterschiede im Vergleich zum *Wildtyp*, in den 1:1-Gruppe jedoch eine Abnahmen der *lat52*-Transkript- und Proteinmengen um 50% und mehr. Die Ergebnisse dieser Experimente sind in hohem Maß mit den in dieser Arbeit erhaltenen Daten aus dem *ZmPti1*-PTGS Ansatz vergleichbar. Deshalb kann es sein, dass auch ein Verlust der ZmPTI1-Funktion einen veränderten Phänotyp des Pollenschlauchs hervorruft. Gegenwärtig werden Untersuchungen zur Pollenschlauchmorphologie transgener *ZmPti1*-PTGS-Pflanzen durchgeführt, um diese Theorie zu überprüfen.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente bestätigen die anfängliche Vermutung, dass ZmPTI1, anders als LePTI1 nicht an Prozessen der Pathogenabwehr in Mais beteiligt ist. In Tomate ist die Serin/Threonin-Proteinkinase LePTI1 (PTO INTERACTOR 1; ZHOU *et al.*, 1995) Teil einer Signalkaskade, die an der Resistenzvermittlung gegenüber *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* in Blättern beteiligt ist (ZHOU *et al.*, 1995; CHANDRA *et al.*, 1996). Nach der Erkennung des Avirulenzsignals AvrPto durch die membranständige Serin/Threonin-Proteinkinase LePTO (MARTIN *et al.*, 1993) phosphoryliert diese LePTI1 (SESSA *et al.*, 2000). Im weiteren Verlauf überträgt LePTI1 das Signal auf ein bisher unbekanntes, stromabwärts liegendes Substrat (BOGDANOVE und MARTIN, 2000).

Die hohe Homologie zwischen den beiden PTI1-Proteinkinasen und die in der Einleitung vorgestellten signifikanten Analogien (1.4.) lassen vermuten, dass ZmPTI1 in ein System in Maispollen eingebunden ist, das Ähnlichkeiten zu dem LePTI1/LePTO-Signalweg besitzt. Die Autophosphorylierungsaktivität von ZmPTI1 sowie die Existenz von Kinasen, die ZmPTI1 in Pollen und Seide *trans*-phosphorylieren können (4.2), sind deutliche Indizien für eine Beteiligung von ZmPTI1 an einem Signaltransduktionsweg während der Pollinierung.

Da in *Southern* Analysen (3.2.3.2.) gezeigt werden konnte, dass vermutlich maximal zwei *ZmPti1*-homologe Sequenzen im Maisgenom vorhanden sind, ist die pathogeninduzierte Expression eines zweiten *Pti1*-Gens vorstellbar, aber eher unwahrscheinlich. Auch konnten in den bisher durchgeführten Analysen mit Gesamt-RNAs unterschiedlicher Maisgewebe mit einer ORF-spezifischen Sonde nur *Pti1*-homologe Transkripte in solchen Gewebe identifiziert werden, in denen auch mit einer 3'-UTR-Sonde Signale erhalten wurden (3.3.1.1.). Vermutlich ist das bislang nicht zuzuordnende genomische Fragment Teil eines zweiten *ZmPti1*-Gens, das entweder auf einen allelischen Polymorphismus oder auf die im Zuge der Evolution entstandenen segmentalen Duplikationen des Maisgenoms zurückzuführen ist. Aufgrund dieses teilweisen polyploiden Charakters des Genoms liegen bei Mais zahlreiche Gene in zwei unterschiedlichen Genkopien vor (SETTLES *et al.*, 2001; DA COSTA E SILVA *et al.*, 2004).

Die analogen Mechanismen der Liganden-Rezeptor-Modelle während der Pathogenabwehr in Tomate und im sporophytischen Selbstinkompatibilitätssystem von *Brassica* (SSI) sind überaus deutlich (1.4.). In beiden Fällen führt die Erkennung eines Liganden, dem Avirulenzsignal oder dem männlichen SI-Faktor SCR, durch einen Rezeptor, einem LRR-Rezeptor oder einer SRK-Rezeptorkinase, zur Abwehr des Pathogens bzw. des inkompatiblen Pollens.

Welche Funktionen könnte ZmPTI1 in einem Liganden-Rezeptor-Modell in Maispollen besitzen? Welche Rolle könnte ZmPTI1 bei der Pollenkeimung und bei Pollen-Stylus-Interaktionen spielen?

Neben der schon vorgestellten Selbstinkompatibilität wurde ein weiteres, direkt an der Pollenkeimung beteiligtes Ligand-Rezeptor-System mit der Identifizierung der drei LRR-Rezeptorkinasen LePRK1, LePRK2 (MUSCHIETTI *et al.*, 1998) und LePRK3 (KIM *et al.*, 2002) bei Tomate entdeckt. LePRK1 und LePRK2 bilden einen 400 kD-großen, in der Pollenmembran oder -wand lokalisierten Komplex, der in Gegenwart eines aus Stylusextrakten stammenden 3-10 kD großen Liganden dissoziiert. Ein weiterer Ligand der LRR-Domäne der LePRK2 ist LAT52 (MUSCHIETTI *et al.*, 1994), das für eine erfolgreiche Rehydrierung von Tomatenpollen essentiell ist und mit einsetzender Pollenkeimung die Fähigkeit verliert, an die extrazelluläre Domäne zu binden (TANG *et al.*, 2002). WENGIER *et al.* (2002) postulieren, dass das LAT52 im LePRK-Komplex nach erfolgreicher Rehydrierung des Pollens und mit Beginn der Keimung durch einen Liganden aus dem Stylus ersetzt wird. Die durch die Bindung des bisher unbekanntes Stylusliganden induzierte Dephosphorylierung der LePRK2 führt zur Dissoziation des Komplexes und setzt eine Signalkaskade mit unbekannter Funktion in Gang. Wie zuvor erwähnt, führt ein Fehlen des LAT52 zu einem Verlust der Pollenfertilität und einem stark veränderten Pollenschlauchwachstum (MUSCHIETTI *et al.*, 1994). Darum kann spekuliert werden, ob auch ZmPTI1 Teil einer vergleichbaren Signalkaskade ist und ein aktivierender Faktor dieser Signalkaskade ein extrazelluläres, z.B. durch den Stylus sekretiertes, Protein ist.

Neben LAT52 wurden weitere Liganden identifiziert, die unabhängig von Vorgängen der Selbstinkompatibilität an Signalkaskaden während der Erkennung, Rehydrierung und Keimung des Pollens beteiligt sind.

Eine erfolgreiche Adhäsion und Rehydrierung (1.2.) von Pollen auf trockenen Stigmata in *Arabidopsis* unterbleibt, wenn in der Pollenkornwand z.B. das eingelagerte Oleosinprotein GRP17-1 fehlt (MAYFIELD und PREUSS, 2000). In der Mangelmutante *Cer6-2*, die keine langkettigen Fettsäuren bilden kann, bleibt die Rehydrierung unvollständig (FIEBIG *et al.*, 2000). Die unvollständige oder unterbundene Rehydrierung erinnert an Vorgänge der Pathogenab-

wehr in *Hordeum*, bei denen die Wasserversorgung des Pathogens in der Wirtszelle unterbunden wird (SARGENT und GAY, 1977).

Neben diesen pollenexprimierten Liganden sind stylusexprimierte Elemente bekannt, die die Pollenschlauchleitung bzw. Interaktionen zwischen Stylus und Pollenschlauch ermöglichen. Das 9 kD-große *stigma/stylar cystein-rich adhesin* (SCA) aus Lilie ist in der extrazellulären Matrix (ECM) des Stylus lokalisiert und wirkt chemotropisch auf den Pollenschlauch (1.2.; PARK *et al.*, 2000). Außerdem ermöglicht es die Adhäsion des Pollenschlauchs über die Quervernetzung von Pectinpolysacchariden in der Pollenschlauch- und Stylus-ECM (MOLLET *et al.*, 2000). Vergleichbare Funktionen übernimmt das *Arabinogalactanprotein TTS (transmitting tract specific glycoprotein)* im Tabakstylus, wo es chemotropisch auf den Pollenschlauch wirkt, aber auch als Quelle von Strukturmolekülen dient.

Einige der angesprochenen stylus- und pollenexprimierten *Elicitoren* zeigen auch Homologien zu Proteinen, die direkt an der Pathogenabwehr beteiligt sind. Defensine, die bei Vertebraten die angeborene Immunabwehr bilden, treten in Pflanzen als heterogene Gruppe cysteinreicher basischer Proteine von 2-9 kDa auf. Pflanzliche Defensine besitzen eine sehr kompakte Struktur und weisen antimikrobielle Wirkungen auf (GARCIA-OLMEDO *et al.*, 1998). Zu ihnen zählen z.B. das LPT⁶⁶-ähnliche SCA, der defensin-ähnliche SI-Faktor SCR sowie das ebenfalls in der Pollenkornwand eingelagerte, am SI-System beteiligte *S-Locus assoziierten Glycoproteine*⁶⁷ SLR (HISCOCK *et al.*, 1995; LORD, 2003).

Da ZmPTI1, ebenso wie LePTI1, selbst keine membranständige Rezeptordomäne besitzt, kann angenommen werden, dass ZmPTI1 ein *downstream* Phosphorylierungsakzeptor eines *trans*-phosphorylierenden Interaktionspartners ist. Dieser muß nicht automatisch eine Rezeptorkinase sein, sondern könnte selbst ebenfalls stromabwärts einer solchen liegen. Die Ähnlichkeiten zum LePTO/LePTI1-Resistenzmodell aus Tomate (Abb. 1-1) lassen jedoch vermuten, dass oberhalb des ZmPTI1 eine Rezeptorkinase mit Substratspezifität für ZmPTI1 angesiedelt sein könnte.

Zur Identifizierung einer möglichen *upstream* Rezeptorkinase konnte mit Hilfe computergestützter Recherchen und einer LePTO-homologen EST-Sequenz eine vollständige, 3,2 kb lange, cDNA eines *Pto*-homologen Gens aus Mais kloniert werden (*ZmPto*; Melanie Rose⁶⁸, unveröffentlicht). Homologievergleiche zwischen dem abgeleiteten ZmPTO-Protein und Ki-

⁶⁶ *lipid transfer protein*

⁶⁷ *S-Locus related glycoprotein*

⁶⁸ Biozentrum Klein Flottbek und Botanischer Garten, Universität Hamburg

nasen der PTO-Familie zeigen, dass ZmPTO eine zusätzliche N-terminale Domäne aus ca. 460 Aminosäuren besitzt, die in LePTO, nicht enthalten ist. Analysen der Primär- und Sekundärstruktur lassen vermuten, dass diese ein bis zwei Domäne transmembrane Helices enthält und es sich bei ZmPTO möglicherweise um eine membranständige Rezeptorkinase handeln könnte. Nach Vergleich mit ca. 200 PTO-homologen Kinasen aus Pflanzen wurde desweiteren festgestellt, dass PTO-ähnliche Kinasen *ohne* N-terminale Extension nur in der Familie der *Solanaceae* vorzukommen scheinen. Möglicherweise resultieren daraus auch Unterschiede zwischen der Funktion von PTO/PTI1 in *Solanaceae* und in anderen Pflanzenfamilien (René Lorbiecke⁶⁸, persönliche Mitteilung). In *Solanaceae* könnten PTO-assoziierte Rezeptorkinasen, wie z.B. PRF bei Tomate, Funktionen der Ligandenerkennung und -bindung übernehmen, während in anderen Pflanzenfamilien diese Aufgaben von einer PTO-eigenen Rezeptordomäne übernommen werden könnten.

Die *ZmPto*-Expression wurde mit einem in dieser Arbeit erstellten *Northern Blot* (3.3.1.1.) untersucht. *ZmPto*-Transkripte konnten in allen Geweben, außer in Pollen und adulten Blättern nachgewiesen werden. Größte *ZmPto*-Transkriptmengen wurden in Seide detektiert. Die für die Phosphorylierungsaktivitäten im *in-gel* Assay bestimmte Größe von 35 kDa (3.3.4.2.4.) korreliert nicht mit der Größe des abgeleiteten ZmPTO-Proteins von 96 kDa. Da außerdem auch in Pollenprotein diese 35 kDa-Aktivität nachgewiesen wurde, muß davon ausgegangen werden, dass ein oder mehrere weitere Phosphorylierungspartner von ZmPTI1 existieren und das klonierte ZmPTO höchstens mittelbar mit der Phosphorylierung von ZmPTI1 in Verbindung steht. Dies ist insbesondere deshalb anzunehmen, weil die aus *Northern* Analysen abgeleitete die Lokalisation von ZmPTI1 (3.3.3.3.) und der putativen ZmPTO nicht übereinstimmt. Ob es trotzdem *in vitro* bzw. *in vivo* eine funktionelle Interaktion zwischen ZmPTI und der von M. Rose klonierten ZmPTO gibt, ist Fragestellung von gegenwärtig durchgeführten Experimenten.

Im *in-gel* Assay wurden neben Kinaseaktivitäten in Pollen und Seide auch Hinweise auf eine ZmPTI1-phosphorylierende Kinaseaktivität in Gesamtprotein aus sieben Tage alten Wurzeln gefunden. Es ist deshalb denkbar, dass sich die ZmPTI1 Funktion nicht nur auf Pollen, sondern auch auf Wurzeln erstreckt. Dieses könnte z.B, eine Funktion des ZmPTI1 beim generellen Wachstumsprozessen sein. Zwar konnten in kompletten jungen Wurzeln weder *ZmPti1*-homologe Transkripte (3.3.1.1.) noch ZmPTI1-Proteine (3.3.3.3.) nachgewiesen werden, dies könnte jedoch an einer nur auf die meristematische oder Elongations-Zone beschränkten ZmPTI-Expression liegen.

Anhaltspunkte für weitere Prozesse, an denen ZmPTI1 beteiligt sein könnte, sind im Zusammenhang mit Calcium als *second messenger* im Pollen und Pollenschlauch zu sehen.

Eine lokal begrenzte Erhöhung der Calciumkonzentration im Bereich der Penetrationsstelle des Stigmas (ELLEMANN und DICKINSON, 1999) zeigt Parallelen zu einer Akkumulation von Calcium in Folge eines Pathogenbefalls. Diese ist Voraussetzung für die Einleitung einer Pathogenabwehr (NÜRNBERGER und SCHEEL, 2001). Außerdem sind Hinweise auf die Beteiligung von calciumabhängigen Rezeptorkinasen an der Reorientierung des wachsenden Pollenschlauchs und der Regulation seiner Wachstumsgeschwindigkeit gefunden worden (PIERSON *et al.*, 1996; MALHÓ und TREWAVAS, 1996).

In der vorliegenden Arbeit erfolgte eine erste Charakterisierung der ZmPTI1-Kinase. Die tatsächliche Funktion und Bedeutung dieses Proteins für die Pollenkeimung ist immer noch unklar. Weiterführende zukünftige Experimente müssen deshalb zeigen, für welche Prozesse ZmPTI1 in Mais und PTI1-Kinasen allgemein notwendig sind.

4.4. Ausblick

Die transgenen PTGS-Pflanzen sind ein gutes System zur weiteren Charakterisierung der ZmPTI1-Funktion. Neben *in vitro* Untersuchungen an transgenen Pollen bieten sie die Möglichkeit, das Pollenschlauchwachstum und die Befruchtung *in planta* zu analysieren.

Wertvolle Hinweise auf Signaltransduktionsprozesse, an denen ZmPTI1 beteiligt ist, könnten Lokalisationsstudien in keimenden Pollen liefern, die mit einem ZmPTI1-GFP-Fusionskonstrukt transient transformiert wurden.

Weitere Anhaltspunkte zu Interaktions- und Phosphorylierungspartnern von ZmPTI1 könnten durch quantitative Co-Immunpräzipitation mit Proteinen erhalten werden, die aus Pollen, Seide oder Wurzeln isoliert wurden. In diesem Zusammenhang bieten sich auch Experimente an, die auf dem *Two Hybrid* System basieren.

Möglicherweise könnte ZmPTI1 auch am Wachstum von Wurzeln beteiligt sein. Deshalb wäre es interessant, detaillierter nach einer ZmPTI1 Expression in Wurzeln zu suchen.

Trotz der in dieser Arbeit präsentierten Ergebnisse zur Bedeutung des *ZmPti* für die Pollinierung sollte bei zukünftigen Experimenten nicht vollständig außer Acht gelassen werden, dass *ZmPti1* oder ein dazu ähnliches Gen auch in pathogenabhängigen Signalwegen des Mais eine Rolle spielen könnte.

Ferner könnten weitere Promotorstudien Fragen hinsichtlich der starken Expression des *ZmPti1*-Gens in Pollen beantworten und klären, ob die großen Transkriptmengen auf hohe RNA-Stabilität und geringen *turnover* zurückzuführen sind. Weitere Hinweise auf die Regulation der Expression könnten auch *Western* Analysen mit *in vitro* und *in planta* keimenden Pollen liefern.

5. Zusammenfassung

In dieser Arbeit sollten Gene aus Mais identifiziert und charakterisiert werden, die für die Pollenfertilität essentiell und an Prozessen der Pollinierung beteiligt sind. Die hieraus gewonnenen Erkenntnisse sollen das Verständnis der molekularen Vorgänge und Regulationsmechanismen bei der sexuellen Fortpflanzung von Samenpflanzen vertiefen.

Mit dem Ziel solche Gene zu identifizieren, wurden durch verschiedene subtraktive Hybridisierungen die Genexpressionsmuster der aufgrund defekter Flavonolbiosynthese männlich sterilen Maismutante *white pollen* (*whp*) und eines fertilen *Wildtyps* miteinander verglichen. Dabei konnten jedoch keine differentiell exprimierte Gene gefunden werden. Dieses läßt vermuten, dass ein Verlust der Flavonolbiosynthese in der *whp*-Mutante nicht zu dramatischen Änderungen des Expressionsmusters pollenspezifischer Gene führt. Allerdings konnte im Zuge dieser Experimente eine cDNA-Sequenz identifiziert werden, die ein sehr stark pollenspezifisch exprimiertes Gen mit hoher Homologie zum *Pti1*-Gen aus Tomate (*Pto Interactor 1; LePti1*) repräsentiert. Das *LePti1* aus Tomate codiert für eine Serin/Threonin-Proteinkinase, die Teil einer Signaltransduktionskette ist. Diese vermittelt die Resistenz gegenüber dem Pathogen *Pseudomonas syringae* in grünen Geweben. Ausgehend von der These, dass grundsätzliche Parallelen zwischen Vorgängen der Pathogenabwehr und Prozessen der Pollinierung bestehen, wurde das *Pti1*-homologe Maisgen (*ZmPti1*) und seine Funktion im Pollen weiter untersucht.

Das in dieser Arbeit vollständig sequenzierte *ZmPti1*-Gen ([AY554283]) ist die erste in Mais gefundene PTI1-ähnliche Kinase und liegt als Einzelkopie, maximal in zwei Genkopien im Maisgenom vor. In transienten Studien mit unterschiedlichen Bereichen des *ZmPti1*-Promotors konnte eine hohe pollenspezifische Präferenz der Genexpression gefunden werden. In *Northern* Analysen wurde diese sehr starke und gewebespezifische Expression des *ZmPti1*-Gens mit einem Anstieg der *ZmPti1*-Transkriptmenge im Verlaufe der Pollenentwicklung bis hin zur Reife bestätigt. Mit einem gegen ZmPTI1 gerichteten polyklonalen Antikörper konnte das *ZmPti1*-Genprodukt dementsprechend ausschließlich in Pollen nachgewiesen werden.

Die von zwei isolierten kompletten *ZmPti1*-cDNAs ([AY554281], [AY554282]) abgeleitete Aminosäuresequenz weist die charakteristischen Sequenzmerkmale der Proteinkinase-Familie mit Serin/Threonin-Spezifität auf und zeigt Homologien zu zahlreichen anderen PTI1-Homologen aus Pflanzen.

In Kinase Assays mit rekombinant überexprimiertem ZmPTI1 konnte gezeigt werden, dass ZmPTI1 Autophosphorylierungsaktivität besitzt, die durch den Austausch des hochkonser-

vierten Lysin¹⁰⁰ gegen Asparagin verloren geht. In Kinase Assays mit überexprimiertem ZmPTI1 wurden durch Co-Präzipitation aus Gesamtprotein Hinweise auf die Existenz von ZmPTI1-phosphorylierenden Kinasen in Pollen- und Seideprotein erhalten. In *in-gel* Assays konnten ebenfalls ZmPTI1-phosphorylierende Aktivitäten in Pollen- und Seideprotein gefunden werden. Zusätzlich wurde eine solche Aktivität in Wurzelprotein nachgewiesen.

In *post-transcriptional gene silencing* (PTGS) Ansätzen zum funktionellen Ausschalten des *ZmPti1*-Gens wurden 20 stabil transformierte *knock out* Linien erhalten, deren Pollenfertilität eingeschränkt ist. Dieses konnte durch Kreuzungsversuche und Analyse der Nachkommen bewiesen werden. Die Auswertung von 180 F₁-Nachkommen zeigte, dass der PTGS-transgene F₀-Pollen in seiner Fertilität stark beeinträchtigt war, da das Transgen über den Pollen nur vermindert an die nachfolgende Generation weitergegeben wurde. Die Analyse von 96 F₂-Nachkommen läßt darauf schließen, dass der PTGS-Effekt in Pollen der F₁-Generation zu einem nahezu vollständigen Verlust der Pollenfertilität führte. Der dem Verlust der Pollenfunktion zugrunde liegende Mechanismus ist noch unklar.

Die durchgeführten Analysen deuten jedoch darauf hin, dass *ZmPti1* eine essentielle Funktion bei der Ausbildung fertilen Pollens und/oder während der Pollinierung besitzt. Die hohe Homologie von ZmPTI1 zu LePTI1, einer Komponente eines Signaltransduktionswegs zur Pathogenabwehr in Tomate, macht eine Funktion von ZmPTI1 in einer vergleichbaren Signalkaskade im Pollen wahrscheinlich. Auf Grundlage der in der Literatur diskutierten Ligand-Rezeptor-Modelle und der Analogie zwischen Prozessen der Interaktion zwischen Pathogen und Wirt und den Vorgängen bei der Pollinierung, könnte die Erkennung eines extrazellulären Liganden durch eine *upstream* von ZmPTI1 stehende Rezeptorkinase oder einen Rezeptorkomplex zur Phosphorylierung von ZmPTI1 führen. Anhaltspunkte für die Existenz von Kinasen, die ZmPTI1 *trans*-phosphorylieren, konnten in der vorliegenden Arbeit gefunden werden. Da die ZmPTI1 phosphorylierenden Kinaseaktivitäten nicht nur in Pollen, sondern auch in Seide und Wurzel gefunden wurde, wäre z.B. auch eine Funktion von ZmPTI1 bei der generellen Regulation von Prozessen des Streckungswachstums oder des polaren Spitzenwachstums vorstellbar.

In dieser Arbeit konnte erstmals in Mais eine Serin/Threonin-Proteinkinase der PTI1-Familie identifiziert werden. Im Gegensatz zu den bisher bekannten Funktionen dieser Genfamilie in anderen Pflanzen scheint ZmPTI1 in Mais für die Fertilität des Pollens von großer Bedeutung zu sein. Weitere Analysen im Hinblick auf die Isolierung von *upstream* und *downstream* Phosphorylierungspartnern, die Lokalisation von ZmPTI1 sowie *in vitro* und *in vivo* Untersuchung von PTGS-transgenen Pollen können zukünftig dazu beitragen die Mechanismen, an denen ZmPTI1 beteiligt ist, weiter aufzuklären.

6. Literaturverzeichnis

- Allan, R.L., Lonsdale, D.M. (1993): Molecular characterization of one of the maize polygalacturonase gene family members which are expressed during late pollen development. *Plant J.* 3: 261-271.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J. (1990): Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215: 403-410.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J. (1997): Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucl. Acids. Res.* 25: 3.389-3.402. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>.
- Astrom, H., Sorri, O., Raudaskoski, M. (1995): Role of microtubules in the movement of the vegetative nucleus and the generative cell in tobacco pollen tubes. *Sex. Plant Reprod.* 8: 61-69.
- Bashe, D., Mascarenhas, J.P. (1985): Changes in potassium ion concentration during pollen dehydration and germination in relation to protein synthesis. *Plant Sci. Lett.* 35: 55-60.
- Bate, N., Spurr, C., Foster, G.D., Twell, D. (1996): Maturation-specific translational enhancement mediated by the 5'-UTR of a late pollen transcript. *Plant J.* 10: 613-623.
- Bate, N., Twell, D. (1998): Functional architecture of a late pollen promoter: pollen-specific transcription developmentally regulated by multiple stage-specific and co-dependent activator elements. *Plant Mol. Biol.* 37: 859-869.
- Bateman, A.J. (1955): Self-incompatibility systems in angiosperms, III. Cruciferae. *Heredity* 9: 52-68.
- BD Biosciences (2000): CLONTECH PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit User Manual, PT1117-1 (PR06687), Catalog: #K1804-1.
- BD Biosciences (2001^a): PCR-Select Differential Screening Kit User Manual, PT3138-1 (PR19389), Catalog: #K1808-1.
- BD Biosciences (2001^b): SMART™ cDNA Library Construction Kit User Manual, PT3000-1 (PR15738), Catalog: #K1051-1.
- BD Clontech (2001^c): SMART™ PCR cDNA Synthesis Kit User Manual, PT3041-1 (PR144594), Catalog: #K1052-1.
- Becker, D., Brettschneider, R., Lörz, H. (1994): Fertile transgenic wheat from microprojectile bombardment of scutellar tissue. *Plant J.* 5, 299-307.
- Benkert, R., Obermeyer, G., Bentrup, F.W. (1997): The turgor pressure of growing lily pollen tubes. *Protoplasma* 198: 1-8.
- Bih, F.Y., Wu, S.H.H., Ratnayake, C., Walling, L.L., Nothnagel, E.A., Huang, A.H.C. (1999): The predominant protein on the surface of maize pollen is an endoxylanase synthesized by a tapetum mRNA with long 5' leader. *J. of Biol. Chemistry* 274: 22.884-22.894.
- Bogdanove, A.J., Martin, G.B. (2000): AvrPto-dependent Pto-interaction proteins and AvrPto-interaction proteins in tomato. *PNAS* 97: 8.836-8.840.
- Bosch, M., Sommer-Knudsen, J., Derksen, J., Mariani, C. (2001): Class III pisti-specific extensin-like proteins from tobacco have characteristics of arabinogalactan proteins. *Plant Physiology* 125: 2.180-2.188.
- Boyes, D.C. (1997): The self-incompatibility (S) haplotypes of *Brassica* contain highly divergent and rearranged sequences of ancient origin. *Plant Cell* 9: 237-247.
- Brace, J., King, G.J., Ockendon, D.J. (1994): A molecular approach to the identification of S-alleles in *Brassica oleracea*. *Sex. Plant Reprod.* 7: 203-208.
- Bradford, M.M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Bramson, H.N., Thomas, N., Matsueda, R., Nelson, N.C., Taylos, S.S., Kaiser, E.T. (1982): Modification of the catalytic subunit of bovine heart cAMP-dependent protein kinase with affinity labels related to peptide substrates. *J. Biol. Chem.* 257:10.575-10.581.
- Brenner, S. (1987): Phosphotransferase sequence homology. *Nature* 329: 21

- Brettschneider, R., Becker, D., Lörz, H. (1997): Efficient transformation of scutellar tissue of immature maize embryos. *Theor. Appl. Genet.* 94: 737-748.
- Brugière, N., Cui, Y., Rothstein, S.J. (2000): Molecular mechanisms of self-recognition in *Brassica* self-incompatibility. *Trends in Plant Science* 5: 432-438.
- Bryant, D., Parsons, J.T. (1983): Site-directed point mutation in the src gene of rous sarcoma virus results in an inactive src gene product. *J. Virol.* 45: 1.211-1.216.
- Buchanan-Wollaston, V., Ainsworth, C. (1997): Leaf senescence in *Brassica napus*: Cloning of senescence related genes by subtractive hybridisation. *Plant Mol. Biol.* 33: 821-834.
- Buitink, J., Walters-Vertucci, C., Hoekstra, F.A., Leprince O. (1996): Calorimetric properties of dehydrating in pollen. *Plant Physiol.* 111: 235-242.
- Cabrillac, D., Cock, J.M., Dumas, C., Gaude, T. (2001): The S-locus receptor kinase is inhibited by thioeredoxins and activated by pollen coat proteins. *Nature* 410: 220-223.
- Cai, G., Mocatelli, A., Del Casino, C., Cresti, M. (1996): Cytoplasmic motors and pollen tube growth. *Sex. Plant. Reprod.* 9: 59-64.
- Capkova, V., Hrabetova, E., Tupy, J. (1988): Protein synthesis in pollen tubes: preferential formation of new species independent of transcription. *Sex. Plant Reprod.* 1: 150-155.
- Cerutti, H. (2003): RNA interference: traveling in the cell and gaining functions. *Trends un Genetics* 19: 39-46.
- Ceska, O., Styles, E.D. (1984): Flavonoids from *Zea mays* pollen. *Phytochemistry* 23: 1.822-1.823.
- Chandra, S., Martin, G.B., Low, P.S. (1996): The Pto kinase mediates a signaling pathway leading to the oxidative burst in tomato. *PNAS* 93: 13.393-13.397.
- Chang, C., Schaller, G.E., Patterson, S.E., Meyerowitz, E.M., Bleecker, A.B. (1992): The TMK1 gene from *arabidopsis* codes for a protein with structural and biochemical characteristics of a receptor protein kinase. *Plant Cell* 4: 1.263-1.271.
- Chaubal, R., Reger, B.J. (1992): Calcium in the synergid cells and other regions of peark millet ovaries. *Sex. Plant Reprod.* 5: 34-46.
- Chen, W.S., Lazar, C.S., Poenie, M., Tsien, R.Y., Gill, G.N., Rosenfeld, M.G. (1987): Requirement for intrinsic protein tyrosine kinase in the immediate and late actions of the EGF receptor. *Nature* 328: 820-823.
- Cheung, A.Y. (1996): Pollen-pistil interactions during pollen-tube growth. *Trens in Plant Science* 1: 45-51.
- Cheung, A.Y., Wang, H., Wu, H. (1995): A floral transmitting tissue-specific glycoprotein attracts pollen tubes and stimulates their growth. *Cell* 82: 383-393.
- Christensen, A.H., Sharrock, R.A., Quail, P.H. (1992): Maize polyubiquitin genes: structure, thermal perturbation of expression and transcript splicing, and promotor activity following transfer to protoplasts by electroporation. *Plant Mol. Biol.* 18: 675-689.
- Clarke, A.E., Currie, G., Gilson, P., Mai, S.L., Oxley, D., Schultz, C.J., Sommer-Knudsen, J., Bacic, A. (2000): Arabinogalactan-proteins in reproductive tissues of flowering plants. In: Nothnagel, E.A., Bacic, A., Clarke, A.E., eds. *Cell and developmental biology of arabinogalactan-proteins*. News York, NY: Kluwer Academic, 121-131.
- Coe, E.H., McCormick, S.M., Modena, S.A. (1981): White pollen in maize. *J. Hered.* 72: 318-320.
- Cui, Y., Brugière, N., Jackmann, N., Bi, Y.M., Rothstein, S.J., (1999): Structural and transcriptional analysis of the S locus regions in two self-incompatible *Brassica napus* lines. *Plant Cell* 11: 2.217-2.231.
- Curie, C., McCormick, S. (1997): A strong inhibitor of gene expression in the 5' untranslated region of the pollen-specific LAT59 gene of tomato. *Plant Cell* 9: 2.025-2.036.
- D'Halluin, K., Bonne, E., Bossut, M., De Beuckeleer, M., Leemans, J. (1992): Transgenic maize plants by tissue electroporation. *Plant Cell* 4, 1.495-1.505.
- da Costa e Silva, O., Lorbiecke, R., Garg, P., Müller, L., Waßmann, M., Lauert, P., Scanlon, M., Hsia, A.-P., Schnable, P.S., Krupinska, K., Wienand, U. (2004): The *Etched1* gene of *Zea mays* (L.) encodes a zinc ribbon protein similar to the transcription factor TFIIS and belonging to the transcriptionally active chromosome (TAC) of plastids. *Plant J. (angenommen)*.

- Dalmay, T., Hamilton, A., Rudd, S., Angell, S., Baulcombe, D.C. (2000): An RNA-dependent RNA polymerase gene in *Arabidopsis* is required for posttranscriptional gene silencing mediated by a transgene but not by a virus. *Cell* 101: 543-553.
- Dangl, J.L. (1994): The enigmatic avirulence genes of phytopathogenic bacteria. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 192: 99-118.
- de Nettancourt, D. (1977): *Incompatibility in Angiosperms*, Springer Verlag.
- Dearnaley, J.D.W., Daggard, G.A. (2001): Expression of a polygalacturonase enzyme in germinating pollen of *Brassica napus*. *Sex. Plant. Reprod.* 13: 265-271.
- Dellaporta, S. L., Wood, J., Hicks, J. B. (1983): A Plant DNA Miniprep: Version II. *Plant. Mol. Biol. Rep.* 1: 19-21.
- Depicker A., Stachel, S., Dhaese, P., Zambryski, P., Goodman, H.M. (1982): Nopaline synthase: transcript mapping and DNA sequence. *J. Mol. Appl. Genet.* 1: 561-73.
- Derksen, J., Rutten, T., van Amstel, T., de Win, A., Doris, F., Steer, M. (1995): Regulation of pollen tube growth. *Acta. Bot. Neerl.* 44: 93-119.
- Desai, S., Hill, S., Trelogan, S., Diatchenko, L., Siebert, P.D. (in Vorbereitung): Identification of differentially expressed genes by suppression subtractive hybridization (SSH).
- Dickinson, H. (1995): Dry stigmas, water and self-incompatibility. *Sex. Plant Reprod.* 8: 1-10.
- Doblin, M.S., De Melis, L., Newbigin, E., Bacic, A., Read, S.M. (2001): Pollen of *Nicotiana glauca* express two genes from different β -glucan synthase families. *Plant Physiology* 125: 2.040-2.052.
- Dzelzalns, V.A., Thorsness, M.K., Dwyer, K.G., Baxter, J.S., Balent, M.A., Nasrallah, M.E., Nasrallah, J.B. (1993): Distinct *cis*-acting elements direct pistil-specific and pollen-specific activity in Brassica S locus glycoprotein gene promoter. *Plant Cell* 5: 855-863.
- Elbashir, S.M., Lendeckel, W., Tuschl, T. (2001): RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev.* 15: 188-200.
- Ellemann, C.J., Dickinson, H.G. (1999): Commonalities between pollen/stigma and host/pathogen interactions: calcium accumulation during stigmatic penetration by *Brassica oleracea* pollen tubes. *Sex. Plant Reprod.* 12: 194-202.
- Ellemann, C.J., Franklin-Tong, V., Dickinson, H.G. (1992): Pollination in species with dry stigmas: the nature of the early stigmatic response and the pathway taken by pollen tubes. *New Phytol.* 121: 413-424.
- Estruch J.J., Kadwell, S., Merlin, E., Crossland, L. (1994): Cloning and characterization of a maize pollen-specific calcium-dependent calmodulin-independent protein kinase. *PNAS* 91: 8.837-8.841.
- Fiebig, A., Mayfield, J.A., Miley, N.L., Chau, S., Fischer, R.L., Preuss, D. (2000): Alterations in *CER6*, a gene identical to *CUT1*, differentially affect long-chain lipid content on the surface of pollen and stems. *Plant Cell* 12: 2.001-2.008.
- Franken, P., Niesbach-Kloesgen, U., Weydemann, U., Marechal-Drouard, L., Saedler, H., Wienand, U. (1991): The duplicated chalcone synthase genes *C2* and *Whp* (white pollen) of *Zea mays* are independently regulated; evidence for translational control of *Whp* expression by the anthocyanin intensifying gene in. *EMBO J.* 10: 2.605-2.612.
- Franklin-Tong, V.E., Frankling, F.C.H. (2003): Gametophytic self-incompatibility inhibits pollen tube growth using different mechanisms. *Trends in Plant Science* 12: 598-605.
- Franklin-Tong, V.E., Frankling, F.C.H. (2003): The different mechanism of gametophytic self-incompatibility. *Philos. Trans. R. Soc. London Ser. B Biol. Sci.* 358: 1.025-1.032.
- Fromm, M.E., Morrish, F., Armstrong, C., Williams, R., Thomas, J., Klein, T.M. (1990): Inheritance and expression of chimeric genes in progeny of transgenic maize plants. *Bio/Technol.* 8: 833-839.
- Fu, Y., Wu, G., Yang, Z. (2001): The Rop GTPase-dependent dynamics of tip-localized F-actin controls tip growth in pollen tubes. *J. of Cell Biology* 152: 1.019-1.032.
- Fuhrmann, M., Ferbitz, L., Hausherr, A., Schödl, T., Hegemann, P. (2003): Monitoring expression of nuclear genes in *Chlamydomonas reinhardtii* by using a synthetic luciferase reporter gene. In Vorbereitung.
- Galan, J.E., Collmer, A. (1999): Typ III secretion machine: bacterial devices for protein delivery into host cells. *Science* 284: 365-391.

- Garcia-Olmedo, F., *et al.* (1998): Plant defense peptides. *Biopolymers* 47: 479-491.
- Gasteiger E., Gattiker A., Hoogland C., Ivanyi I., Appel R.D., Bairoch A. (2003): ExPASy: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic Acids Res.* 31:3.784-3.788.
- Gibbon, B.C., Kovar, D.R., Staiger, C.J. (1999): Latrunculin B has different effects on pollen germination and tube growth. *Plant Cell.* 11: 2.349-2.363.
- Gilissen, L.J.W. (1977): The influence of relative humidity on the swelling of pollen grain *in vitro*. *Planta* 137: 299-301.
- Giranton, J.L., Dumas, C., Cock, J.M., Gaude, T. (2000): The integral membrane S-locus receptor kinase of *Brassica* has serine/threonine kinase activity in a membranous environment and spontaneously forms oligomers in plants. *PNAS* 97: 3.759-3.764.
- Gordon-Kamm, W.J., Spencer, T.M., Mangano, M.L., Adams, T.R., Daines, R.J., Start, W.G., O'Brian, J.V., Chambers S.A., Adams, J.W.R., Willets, N.G., Rice, T.B., Mackey, C.J., Krueger, W., Kausch, A.P., Lemaux, P.G. (1990): Transformation of maize cells and regeneration of fertile transgenic plants. *Plant Cell* 2: 603-618.
- Green, C.E., Philips, R.L. (1975): Plant regeneration from tissue cultures of maize. *Crop Science* 15: 417-421.
- Gu, T., Mazzurco, M., Sulaman, W., Matias, D.D., Goring, D.R. (1998): Binding of an arm repeat protein to the kinase domain of the s-locus receptor kinase. *PNAS* 95: 382-387.
- Gu, Y., Vernoud, V., Fu, S., Yang, Z. (2003): ROP GTPase regulation of tube growth through the dynamics of tip-localized F-actin. *J. Exp. Bot.* 54: 93-101.
- Gu, Y.Q., Wildermuth, M.C., Chakravarthy, S., Loh, Y.T., Yang, C. (2002): Tomato transcription factors Pti4, Pti5 and Pti6 activate defense response when expressed in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 14: 817-831.
- Gu, Y.Q., Yang, C., Thara, V.K., Zhou, J., Martin, G.M. (2000): *Pti4* is induced by the ethylene and salicylic acid, and its products is phosphorylated by the Pto kinase. *Plant Cell* 12: 771-785.
- Guan, K.L., Dixon, J.E. (1991): Eukaryotic proteins expressed in *Escherichia coli*: an improved thrombin cleavage and purification procedure of fusion proteins with glutathione S-transferase. *Anal. Biochem.* 192: 262-267.
- Hamilton, D.A., Schwarz, Y.H., Mascarenhas, J.P. (1998): A monocot pollen-specific promoter contains separable pollen-specific quantitative elements. *Plant Mol. Biol.* 38: 663-669.
- Hammond, S.M., Bernstein, E., Beach, D., Hannon, G.J. (2000): An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature* 404: 293-296.
- Hammond, S.M., Boettcher, S., Caudy, A.A., Kobayashi, R., Hannon, G.J. (2001): Argonaute2, a link between genetic and biochemical analysis of RNAi. *Science* 293: 1.146-1.150.
- Han, Y., Grierson, D. (2002): Relationship between small antisense RNAs and aberrant RNAs associated with sense transgene mediated gene silencing in tomato. *Plant J.* 29: 509-519.
- Hanks, S.K., Quinn, A.M. (1991): Protein kinase catalytic domain sequence database: identification of conserved features of primary structure and classification of family members. *Methods in Enzymology* 200: 32-62.
- Hanks, S.K., Quinn, A.M., Hunter, T. (1988): The Protein Kinase Family: Conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science* 241: 42-52.
- Hansen, K., Taylor, L.P. (1982) Pollen tube growth in the white pollen mutant. Pullman, Wahington, Washington State University.
- Harry, D. (2002): Lambda DNA Miniprep. Institute of Forest Genetics, USDA Forest Services. http://www.protocol-online.org/prot/Molecular_Biology/Phage/Lambda/
- Hartl, D.L., Ochmann, H. (1996): Inverse polymerase chain reaction. *Methods Mol Biol.* 58: 293-301.
- Hedgecock, E.M., Norris, C.R. (1997): Netrins evoke mixed reactions in motile cells. *Trends Genet.* 13: 251-253.
- Hepler, P.K., Vidali, L., Cheung, A.Y. (2001): Polarized cell growth in higher plants. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 17: 159-87.
- Heslop-Harrison, J. (1987): Pollen germination and pollen tube growth. In: *Pollen: Cytology and Development*, ed. GH Bourne, KW Jeon, M Friedlander: 1-78. New York: Academic.
- Higashiyama, T., Kuroiwa, H., Kawano, S., Kuroiwa, R. (1998): Guidance *in vitro* of the pollen tube to the naked embryo sac of *torenia fournieri*. *Plant Cell* 10: 2.019-2.031.

- Higashiyama, T., Yabe, S., Sasaki, N., Nishimura, Y., Miyagishima, S., Kuroiwa, H., Kuroiwa, T. (2001): Pollen tube attraction by the synergid cell. *Science* 293: 1.480-1.483.
- Hiscock, S.J., Dewey, F.M., Coleman, J.O.D., Dickinson, H.G. (1994): Identification and localization of an active cutinase in the pollen of *Brassica napus* L. *Plant* 193: 377-384.
- Hiscock, S.J., Doughty, J., Willis, AC, Dickinson, HG (1995): A 7-kDa pollen coating-borne peptide from *Brassica napus* interacts with S-locus-related glycoprotein. *Plant* 196: 367-374.
- Hiscock, S.J., McInnis, S.M. (2003): Pollen recognition and rejection during the sporophytic self-incompatibility response: *Brassica* and beyond. *Trends in Plant Science* 12: 606-613.
- Hodgin T. (1988): Recognition in flowering plants: a comparison of the *Brassica* self-incompatibility system and plant-pathogen interactions. *New Phytol.* 110: 557-569.
- Hoekstra, F.A., Crowe, L.M., Crowe, J.H. (1989): Differential desiccation sensitivity of corn and *Pennisetum* pollen linked to their sucrose contents. *Plant Cell Environ.* 12: 83-91.
- Hofmann, K., Bucher, P., Falquet, L., Bairoch, A. (1999): The PROSITE database, its status in 1999. *Nucleic Acids Res.* 27: 215-219. <http://www.expasy.ch/prosite/>
- Holt III, B.F., Mackey, D., Dangl, J.L. (2000) Recognition of pathogens by plants. *Current Biol.* 10: R5-R7.
- Holt, B.F. (2000): Recognition of pathogens in plants. *Curr. Biol.* 10: R5-R7.
- Hulzink, R.J.M., de Groot, P.F.M., Croes, .F., Quaadvlieg, W., Twell, D., Wullems, G.J., van Herpen, M.M.A. (2002): The 5'-untranslated region of the *ntp303* gene strongly enhances translation during pollen tube growth, but not during pollen maturation. *Plant Physiology* 129: 342-353.
- Ikeda, S., Nasrallah, J.B., Dixit, R., Preiss, S., Nasrallah, M.E. (1997): An aquaporin-like gene required for *Brassica* self-incompatibility response. *Science* 276: 1.564-1.566
- Inoue, H., Nojima, H., Okayama, H. (1990): High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 96: 23-28.
- Jefferson, R.A., Kavanagh, T.A., Bevan, M.W. (1987): GUS fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J.* 6: 3.901-3.907
- Jia, Y., Loh, Y.T., Martin, G.B. (1997): Alleles of Pto occur in bacterial speck-susceptible and Fenthion-insensitive tomato cultivars and encode active protein kinases. *Plant Cell* 9: 61-73.
- Johnson, M.A., Preuss, D. (2003): On your mark, get setm GROW! LePRK2-LAT52 interactions regulate pollen tube growth. *TRENDS in Plant Science* 8: 97-99
- Joos, U., van Aken, J., Kristen. U. (1994): Microtubules are involved in maintaining the the cellular polarity in pollen tubes of *Nicotiana sylvestris*. *Protoplasma* 179: 5-15.
- Kamps, M.P., Sefton, B.M. (1986): Neither arginine nor histidine can carry out the function of lysine-295 in the ATP-binding site of p60src. *Mol Cell Biol.* 6:751-757.
- Kamps, M.P., Taylor, S.S., Sefton, B.M. (1984): Direct evidence that oncogenic tyrosine kinases and cyclic AMP-dependent protein kinase have homologous ATP-binding sites. *Nature* 310: 589-592.
- Keen, N.T. (1990): Gene-for-gene complementarity in plant-pathogen interactions. *Annu. Rev. Genet.* 24: 447-463.
- Kerhoas, C., Gay, G., Dumas, C. (1987): A multidisciplinary approach to study the plasma membrane of *Zea mays* pollen during controlled dehydration. *Plant* 171: 1-10.
- Kermicle, J. (1995) Gene flow among maize landraces, improved maize varieties, and teosinte: implications for transgenic maize. In: Proceedings of a forum, eds Serratos, J.A., Willcox, M.C. Castillo, F; INIFAP, IMMY CNBA. 40-43.
- Kim, H.U., Cotter, R., Johnson, S., Senda, M., Dodds, P., Kulikauskas, R., Tang, W., Ezcurra, I., Herzmark, P., McCormick, S. (2002): New pollen-specific receptor kinases identified in tomato, maize and *Arabidopsis*: the tomato kinases show overlapping but distinct localization patterns on pollen tubes.
- Knöfel, H.D., Sembdner, G. (1995): Jasmonates from pine pollen. *Phytochemistry* 38: 569-571.
- Knox, R.B. (1984): Pollen-pistil interaction. In: *Encyclopedia of Plant Physiology (17)*, eds. H.F. Linskens, J. Heslop-Harrison: 508-608. Springer Verlag.

- Köhne, S. (1998): Molekulargenetische Analyse der Ursache für die temperaturinduzierte Instabilität der Transgenexpression in *Nicotiana tabacum*. Dissertation, Universität Bielefeld.
- Kohno, T., Shimmen, T. (1988): Mechanism of Ca²⁺ inhibition of cytoplasmic streaming in lily pollen tubes. *J. Cell Sci.* 95: 501-509.
- Kost, B., Lemichez, E., Spielhofer, P., Hong, Y., Tolia, K., Carpenter, C., Chua, N.H. (1999): Rac homologues and compartmentalized phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate act in a common pathway to regulate polar pollen tube growth. *J. Cell Biol.* 145: 317-330.
- Kost, B., Mathur, J., Mathur, J., Chuan, N.H. (1999): Cytoskeleton in plant development. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2: 462-470.
- Kost, B., Spielhofer, P., Chua, N.H. (1998): A GFP-mouse talin fusion protein labels plant actin filaments in vivo and visualizes the actin cytoskeleton in growing pollen tubes. *Plant J.* 3: 393-401.
- Kotake, T., Li, Y.Q., Takahashi, M., Sakurai, N. (2000): Characterization and function of wall-bound exo- β -glucanases of *Lilium longiflorum* pollen tubes. *Sex. Plant Reprod.* 13: 1-9.
- Kranz, E., Lörz, H. (1993): *In vitro* fertilization with isolated, single gametes results in zygotic embryogenesis and fertile maize plants. *Plant Cell* 5: 739-746.
- Kranz, E., Bautor, J., Lörz, H. (1991): *In vitro* fertilization of single, isolated gametes of maize mediated by electrofusion. *Sex. Plant Reprod.* 4: 12-16.
- Kranz, E., von Wiegen, P., Quader, H., Lörz, H. (1998): Endosperm development after fusion of isolated, single maize sperm and central cells *in vitro*. *Plant Cell* 10: 511-524.
- Kyozuka, J., Olive, M., Peacock, W.J., Dennis, E.S., Shimamoto, K. (1994): Promotor elements required for developmental expression of the maize *Adh1* in transgenic rice. *Plant Cell* 6: 799-810.
- Lai, Z., Ma, W., Han, B., Liang, L., Zhang, Y., Hong, G., Xue, Y. (2002): An F-box gene linked to self-incompatibility (S) locus of *Anthirrhinum* is expressed specifically in pollen and tapetum. *Plant Mol. Biol.* 50: 29-42.
- Lancelle, S.A., Cresti, M., Hepler, P.K. (1997): Growth inhibition and recovery in freeze-substituted *Lilium longiflorum* pollen tubes: structural effects in caffeine. *Protoplasma* 196: 21-33.
- Lancelle, S.A., Hepler, P.K. (1991): Association of actin with corical microtubules revealed by immunogold localization in *Nicotiana* pollen tubes. *Protoplasma* 165: 167-172.
- Leammler, U.K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Lee, H.S., Karunanandaa, B., McCubbin, A., Gilroy, S., Kao, T.H. (1996): Prk1, a receptor-like kinase of *Petunia inflata*, is essential for postmeiotic development of pollen.
- Lee, S.H., Clark, J.B. (1997) High-yield method for isolation of λ DNA. *BioTechniques* 23: 598-600.
- Lenartowska, M., Rodriguez-Garcia, M.I., Bednarska, E. (2001): Immunocytochemical localization of esterified and unesterified pectins in unpollinated and pollinated styles of *Petunia hybrida* Hort. *Planta* 213: 182-191.
- Lennon, K.A., Lord, E.M. (2000): *In vivo* pollen tube cell of *Arabidopsis thaliana* L. Tube cell cytoplasm and wall. *Protoplasma* 214: 45-56.
- Li, H., Lin, Y., Heath, R.M., Zhu, M.X., Yang, Z. (1999): Control of pollen tube tip growth by a rop GTPase-dependent pathway that leads to tip-localized calcium influx. *Plant Cell* 11: 1.731-1.742.
- Li, P., Chan, H.C., He, B., So, S.C., Chung, Y.W., Shang, Q., Zhang, Y.D., Zhang, Y.L. (2001): An antimicrobial peptide gene found in the male reproductive system of rats. *Science* 291: 1.783-1.785.
- Li, Y.Q., Moscatelli, A., Cai, G., Cresti, M. (1997): Functional interactions among cytoskeleton, membranes, and cell wall in the pollen tube of flowering plants. *Int Rev Cytol.* 176: 133-99.
- Lin, J.J., Dickinson, D.B. (1984): Ability of pollen to germinate prior to anthesis and effect of desiccation on germination. *Plant Physiol.* 74: 746-748.
- Lin, J.J., Dickinson, D.B., Ho, T.H.D. (1987): Phytic acid metabolism in lily (*Lilium longiflorum* Thunb.) pollen. *Plant Physiol.* 83: 408-413.
- Loh, Y.T., Martin, G.B. (1995): The *Pto* bacterial resistance gene and the *Fen* insecticide sensitivity gene encode functional protein kinases with serine/threonine specificity. *Plant Physiol.* 108: 1.735-1.739.

- Long, S.R. (1989): Rhizobium-legume nodulation: life together in the underground. *Cell* 56: 203-214.
- Lopez, I., Antony, R., Maciver, S.K., Jiang, C.J., Khan, S., Weeds, A.G., Hussesy, P.J. (1996): Pollens pecific expression of maize genes encoding actin depolymerizing factor-like proteins. *PNAS* 93: 7.415-7.420.
- Lorbiecke, R., Kukula, J., Paul, C., Wienand, U. (2001): Identification of genes induced during early kernel development in *Zea mays* (L.). *Maize Gen. Coop. Newsletters* 75: 20-21.
- Lorbiecke, R., Sauter, M. (2002): Comparative analysis of PSK peptide growth factor precursor homologs. *Plant Science* 163: 321-332.
- Lord, E. (2000): Adhesion and cell movement during pollination: cherchez la femme. *TRENDS in Plant Science* 5: 368-373.
- Lord, E. (2003): Adhesion and guidance in compatible pollination. *Journal if Experimental Botany* 54: 47-54.
- Lord, E.M., Walling, L.L., Jauh, G.Y. (1996): Cell adhesion in plants and ist role in pollination. In *Membranes: Specialized Functions in Plants* (Smallwood, M. *et al.*, eds.): 21-37. Bios Scientific Publishers, Oxford, UK.
- Main, C.V., Riggs, P.D., Grandea, A.G., Slatko, B.E., Moran, L.S., Tagliamonte, J.A., McReynold, L.A. Guan, C. (1988): An *Escherichia coli* vector to express and purify foreign proteins by fusion to and seperation from maltose-binding protein. *Gene* 74: 365-373.
- Malhó, R., Trewavas, A.J. (1996): Localized apical increases of cytosolic calcium in reorientation of pollen tube growth. *Plant Cell* 8: 1.935-1.949.
- Martin, G.B., Bogdanove, A.J., Sessa, G. (2003): Understanding the functions of plant disease resistance proteins. *Annu. Rev. Plant Biol.* 54: 23-61.
- Martin, G.B., Brommonschenkel, S.H., Chunwongse, J., Frary, A., Ganai, M.W., Spivey, R., Wu, T., Earle, E.D., Tanksley, D.S. (1993): Map-based cloning of a protein kinase gene conferring disease resistance in tomato. *Science* 262: 1.432-1.436.
- Martinez, J., Patkaniowska, A., Urlaub, H., Luhrmann, R., Tuschl, T. (2002): Single-stranded antisense siRNAs guide target RNA cleavage in RNAi. *Cell* 110: 563-574.
- Mascarenhas, J.P. (1990): Gene activity during pollen development. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 41: 317-338.
- Mascarenhas, J.P. (1993): Molecular machnisms of pollen tube growth and differentiation. *Plant Cell* 5: 1.303-1.314.
- Mascarenhas, J.P., Mermelstein, J. (1981): Messenger RNAs: their utilization and degradation during pollen germination and tube growth. *Acat Soc. Bot. Pol.* 50: 13-20.
- Mascarenhas, N.T., Bashe, D., Eisenberg, A., Wiling, R.P., Xiao, C.M., Mascarenhas, J.P. (1984): Messenger RNAs in in corn pollen and protein synthesis during germination and pollen tube growth. *Theor. Appl. Genet.* 68: 323-326.
- Matze, M., Matzke, A.J., Kooter, J.M. (2001): RNA: guiding gene silencing. *Science* 293: 1.080-1.083.
- Mayfield, J.A., Fiebig, A., Johnstone, S.E., Preuss, D. (2001): Gene families known from *Arabidopsis thaliana* pollen coat proteome. *Science* 292: 2.482-2.485.
- Mayfield, J.A., Preuss, D. (2000): Rapid initiation of *Arabidopsis* pollination requires the oleosin-domain protein GRP17. *Nature Cell Biology* 2: 128-130.
- Mazzuco, M., Sulaman, W., Elina, H., Cock, J.M., Goring, D.R. (2001): Further analysis of the interaction between the *Brassica* S receptor kinase and three interacting proteins (ARC1, THL1 and THL2) in the yeast two-hybrid system. *Plant Mol. Biol.* 45: 365-376.
- McCabe, D.E., Swain, W.F. Martinelli, B.J., Christou, P. (1988): Stable transformation of Soybean (*Glycine max*) by particle acceleration. *Bio/Technology* 6, 923-926.
- Mette, M.F. , Matzke A.J., Matzke, M.A. (2001): Resistance of RNA-mediated TGS to HC-Pro, a viral supressor of PTGS, suggests alternative pathways for dsRNA processing. *Curr. Biol.* 11: 1.119-1.123.
- Mo, Y., Nagel, C., Taylor, L.P. (1992): Biochemical complementation of chalcone synthase mutants defines a role for flavonols in functional pollen. *PNAS* 89: 7.213-7.217.
- Modena, S.A. (1982): Examination of the white pollen sterility effect. *Maize Genet. Coop. News Lett.* 56: 48-49.

- Mollet, J.C., Park, S.K., Nothnagel, E.A., Lord, E.M. (2000): Pollen tube development and competitive ability are impaired by disruption of a Shaker K⁺ channel in *Arabidopsis*. *Genes and Development* 16: 339-350.
- Mu J.H., Stains, J.P., Kao, T.H. (1994): Characterization of a pollen-expressed gene encoding a putative pectin esterase of *Petunia inflata*. *Plant Mol. Biol.* 25: 539-544.
- Mueller, C.G., Rissoan, M.C., Salinas, B., Ait-Yahia, S., Ravel, P., Bridon, J.M., Briere, F., Lebecqew, S., Lio, Y.J. (1997): Polymerase chain reaction selects a novel disintegrin proteinase from CD40-activated germinal center dendritic cells. *J Exp Med.* 186:655-63.
- Muschietti, J., Dircks, L., Vancannet G., McCormick, S. (1994): LAT52 protein is essential for tomato pollen development: pollen expressing antisense LAT52 RNA hydrates and germinates abnormally and cannot achieve fertilization. *Plant J.* 6: 321-338.
- Muschietti, J., Eyal, Y., McCormick, S. (1998): Pollen tube localization implies a role in pollen-pistil interactions for the tomato receptor-like protein kinases LePRK1 and LePRK2. *Plant Cell* 10: 319-330.
- Nasrallah, J.B., Nasrallah, M.E. (1993): Pollen-stigma signaling in the sporophytic self-incompatibility response. *Plant Cell* 5: 1.325-1.335.
- Nasrallah, J.B., Stein, J.C., Kandasami, M.K., Nasrallah, M.E. (1994): Signaling the arrest of pollen tube development in self-incompatible plants. *Science* 266: 1.505-1.508.
- New England Biolabs (2001): pMAL™ Protein fusion and Purification System. Version 5.01.
- Newbigin, E., Anderson, M.A., Clarke, A.E. (1993): Gametophytic Self-Incompatibility Systems. *Plant Cell* 5: 1.315-1.324.
- Nicholas, K.B., Nicholas, H.B. (1997): GeneDoc: a tool for editing and annotating multiple sequence alignments. <http://www.psc.edu/biomed/genedoc>
- Nielsen, H., Brunak, S., von Heijne, G. (1999): Machine learning approaches to the prediction of signal peptides and other protein sorting signals. *Protein Engineering* 12: 3-9 <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>
- Nou, I.S., Watanabe, M., Isogai, A., Hinata, K. (1993): Comparison of S-alleles and S-glycoproteins between two wild-type populations of *Brassica campestris* in Turkey and Japan. *Sex. Plant Reprod.* 6: 79-86.
- Novagen/Merck Biosciences (2001): His-Tag® Monoclonal Antibody. Protocol TB283 05/01.
- Novagen/Merck Biosciences (2002^a): pET System Manual. 10th Edition.
- Novagen/Merck Biosciences (2002^b): GST-Bind™ Kits. Protocol TB235 Rev. C 1002.
- Nürnberg, T., Scheel, D. (2001): Signal transmission in the plant immune response. *Trends in Plant Science* 6: 372-379.
- Nykänen, A., Haley, B., Zamore, P.D. (2001): ATP requirements and small interfering RNA structure in the RNA interference pathway. *Cell* 107: 309-321.
- Olson, J.H., Xiang, X., Ziegert, T., Kittelson, A., Rawls, A., Bieber, A.L., Chandler, D.E. (2001): Allurin, a 21 kDA sperm chemoattractant from *Xenopus* egg jelly, is related to mammalian sperm-binding proteins. *PNAS* 98: 11.205-11.210.
- Ow, D.W., Wood, K.V., DeLuca, M., DeWet, J.R., Helinski, D.R., Howell, S.H. (1986): Transient and stable expression of the firefly luciferase gene in plant cells and transgenic plants. *Science* 234: 856-859.
- Pantaloni, D., Le Clairche, C., Carlier, M.F. (2001): Mechanism of actin-based motility. *Science* 292: 1.502-1.506.
- Park S.Y., Jauh, G.Y., Mollet, J.C., Eckard, K.J., Nothnagel, E.A., Walling, L.L., Lord, E.M. (2000): A lipid transfer-like protein is necessary for lily pollen tube adhesion to an *in vitro* stylar matrix. *Plant Cell* 12: 151-163.
- Pedley, K.F., Martin, G.B. (2003): Molecular basis of Pto-mediated resistance to bacterial speck disease in tomato. *Annu. Rev. Phytopathol.* 41: 215-243.
- Pierson, E.S., Cresti, M. (1992): Cytoskeleton and cytoplasmic organization of pollen and pollen tubes. *Int. Rev. Cytol.* 140: 73-125.
- Pierson, E.S., Miller, D.D., Callahan, D.A., van Aken, J., Hackett, G., Hepler, P.K. (1996): Tip localized calcium entry fluctuates during pollen tube growth. *Dev. Biol.* 174: 160-173.
- Plasterk, R.H.A. (2002) RNA silencing: the genome's immune system. *Science* 296: 1-263-1.265.

- Pollak, P.E., Hansen, K., Astwood, J.D., Taylor, L.P. (1995): Conditional male fertility in maize. *Sex. Plant Reprod.* 8: 231-241.
- Pollak, P.E., Vogt, T., Mo, Y., Taylor, L.P. (1993): Chalcone synthase and flavonol accumulation in stigmas and anthers of *Petunia hybrida*. *Plant Physiol.* 102: 925-932.
- QIAGEN (2001): Ni-NTA Magnetic Agarose Beads Handbook. 2nd Edition.
- QIAGEN (2002): The QIAexpressionist: A handbook for high-level expression and purification of 6xHis-tagged proteins. 5th Edition.
- Rathjen, J.P., Chang, J.H., Staskawicz, B.J., Michelmore, R.W. (1999): Constitutively active Pto induces a Prf-dependent hypersensitive response in the absence of AvrPto. *EMBO J.* 18: 3.232-3.240.
- Reese, M.G. (2000): Computational prediction of gene structure and regulation in the genome of *Drosophila melanogaster*. Dissertation, UC Berkeley/University of Hohenheim. http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html
- Rogers, H.J., Bate, N., Combe, J., Sullivan, J., Sweetmann, J., Swan, C., Lonsdale, D.M., Twell, D. (2001): Functional analysis of *cis*-regulatory elements within the promoter of the tobacco late pollen gene *g10*. *Plant Mol. Biol.* 45: 577-585.
- Rost, B. (1996): Predicting one-dimensional protein structure by profile based neural networks. *Methods in Enzymology* 266: 525-539. <http://cubic.bioc.columbia.edu>
- Rountree, M.R., Selker E.U. (1997): DNA methylation inhibits elongation but not initiation of transcription in *Neurospora crassa*. *genes Dev.* 11: 2.383-2.395.
- Roy, S., Eckard, K.J., Lancelle, S., Hepler, P.K., Lord, E.M. (1997). High-pressure freezing improves the ultrastructural preservation of *in vitro* grown lily pollen tubes. *Protoplasma* 200: 87-98.
- Roy, S.J., Holdaway-Clarke, T.L., Hackett, G.R., Kunkel, J.G., Lord, E.M, Hepler, P.K. (1999): Uncoupling secretion and tip growth in lily pollen tubes: evidence for the role of calcium in exocytosis *Plant J.* 19: 379-86.
- Rubinstein, A.L., Broadwater, A.H., Lowrey, K.B., Bedinger, P.A. (1995): *Pex1*, a pollen-specific gene with an extensin-like domain. *PNAS* 92: 3.086-3.090.
- Russo, M.W., Lukas, T.J., Cohen, S., Staros, J.V. (1985): Identification of residues in the nucleotide binding site of the epidermal growth factor receptor/kinase. *J. Biol. Chem.* 10: 5.205-5.208.
- Salmeron, J., Rommens, C., Barker, S. Carland, F., Oldroyd, G. (1994): Tomato mutants altered in bacterial disease resistance provide evidence for a new controlling pathogen recognition. *Plant Cell* 6: 511-520.
- Sambrook, F., Fritsch, E. F., Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: A laboratory manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sanders, L.C., Lord, E. (1989): Directed movement of latex particles in the gynoecia of three species in flowering plants. *Science* 243: 1.606-1608.
- Sanford, J.C. (1990): Biolistic plant transformation. *Physiol. Plant.* 79: 206-209.
- Sanger, F. Nickler, S., Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 5.463-5.467
- Sargent, C., Gay, J.L. (1977): Barley epidermal apoplast structure and modification by powdery mildew contact. *Physiol. Plant Pathol.* 11: 195-205.
- Sari-Gorla, M., Frova, C., Binelli, G., Ottaviano, E. (1986): The extent of gametophytic-sporophytic gene expression in maize. *Theor. Appl. Genet.* 72: 42-47.
- Sarker, R.H., Ellemann, C.J., Dickinson, H.G. (1988): Control of pollen hydration in *Brassica* requires continued protein synthesis and glycosylation is necessary for intraspecific incompatibility. *PNAS* 85: 4.340-4.344.
- Schreiber, D.N., Dresselhaus, T. (2003): *In vitro* pollen germination and transient transformation of *Zea mays* and other plant species. *Plant Molecular Biology Reporter* 21: 31-41.
- Schultz, C.J., Gilson, P., Oxley, D., Youl, J., Bacic, A. (1998): GPI-anchors on arabinogalactan-proteins: implications for signalling in plants. *Trends in Plant Science* 3: 426-431.
- Settles, A.M., Baron, A., Barkan, A. and Martienssen, R.A. (2001): Duplication and suppression of chloroplast protein translocation in maize. *Genetics* 157, 349-360.

- Sessa, G., D'Ascenzo, M., Martin, G.B. (2000): The major site of the Pti1 kinase phosphorylated by the Pto kinase is located in the activation domain and is required for Pto-Pti1 physical interaction. *Eur. J. Biochem.* 267: 171-178.
- Sijen, T., Fleenor, J., Simmer, F., Thijssen, K.L., Parrish, S., Timmons, L., Plasterk, R.H., Fire, A. (2001): On the role of RNA amplification in dsRNA triggered gene silencing. *Cell* 107: 465-476.
- Smith, R.F., Wiese, B.A., Wojzynski, M.K., Davison, D.B., Worley, K.C. (1996): BCM Search Launcher - An Integrated Interface to Molecular Biology Data Base Search and Analysis Services Available on the World Wide Web. *Genome Res.* 6:454-462.
- Snyder, M.A., Bishop, J.M., McGrath, J.P., Levinson, A.D. (1985): A mutation at the ATP-binding site of pp60v-src abolishes kinase activity, transformation, and tumorigenicity. *Mol. Cell. Biol.* 5:1.772-1.779.
- Song, H.J., Poo, M.M. (2001) The cell biology of neuronal navigation. *Nature Cell Biology* 3: E81-E88.
- Song, W.Y., Wang, G.L., Chen, L.L., Kim, H.S., Pi, L.Y. (1995): A receptor kinase-like protein encoded by the rice disease resistance gene *Xa21*. *Science* 270: 1.804-1.806.
- Southern, E. M. (1975): Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98: 503-541.
- Spencer, T.M., O'Brien, J.V., Start, W.G., Adams, T.R., Gordon-Kamm, W.J., Lemaux, P.G. (1992): Segregation of transgenes in maize. *Plant Mol. Biol.* 18: 201-210.
- Stadler, R., Truernit, E., Gahrtz, M., Sauer, N. (1999): The AtSUC1 sucrose carrier may represent the osmotic driving force for anther dehiscence and pollen tube growth in *Arabidopsis*. *Plant Journal* 19: 269-278
- Staswick, P. (2000): Two expressed soybean genes with high sequence identity to tomato Pti1 kinase lack autophosphorylation activity. *Arc. Bioch. Bioph.* 15: 233-237.
- Steer, M.W., Steer, J.M. (1989): Pollen tube tip growth. *New Phytol.* 111: 323-358.
- Stone, S.L., Anderson, E.M., Mullen, R.T., Goring, D.R. (2003): ARC1 is an E3 ubiquitin ligase and promotes the ubiquitination of proteins during the rejection of self-incompatible *Brassica* pollen. *Plant Cell* 15: 885-898.
- Storchova, H., Capkova, V., Tupy, J. (1994): A *Nicotiana tabacum* mRNA encoding a 69-kDa glycoprotein occurring abundantly in pollen tubes is transcribed but not translated during pollen development in anthers. *Planta* 192: 441-445.
- Strasburger, E. (1991). *Lehrbuch der Botanik*. 33. Aufl., Fischer Verlag, Stuttgart.
- Stratford, S., Barnes, W., Hohorst, D.L., Sagert, J.S., Cotter, R., Golubiewski, A., Showalter, A.M., McCormick, S., Bedinger, P. (2001): A leucine-rich repeat region is conserved in pollen extensin-like (Pex) proteins in monocots and dicots. *Plant Mol. Biol.* 46: 43-56.
- Su, M.-T., Venkatesh, T.V., Bodmer, R. (1998): Large- and small-scale preparation of bacteriophage λ lysate and DNA. *BioTechniques* 25: 44-46.
- Takayama, S., Shiba, H., Iwano, M., Shimosato, H., Che, F.S., Kai, N., Watanaba, M., Suzuki, G., Hinata, K., Isogai, A. (2000): The pollen determinant of self-incompatibility in *Brassica campestris*. *PNAS* 97: 1.920-1.905.
- Tang, W., Ezcurra, I., Muschietti, J., McCormick, S. (2002): A cysteine-rich extracellular protein, LAT52, interacts with the extracellular domain of the pollen receptor Kinase LePRK2. *Plant Cell* 14: 2.277-2.287.
- Taylor, L.P., Hepler, P.K. (1997): Pollen germination and tube growth. *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant Mol. Biol.* 48: 471-491.
- Taylor, L.P., Jorgensen, R. (1992): Conditional male fertility in chalcone synthase-deficient petunia. *J. Hered.* 83: 11-17.
- Thara, V.K., Tang, X., Gu, Y.Q., Martin, G.B., Zhou, J.-M. (1999): *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* induces the expression of tomato EREBP-like genes *Pti4* and *Pti5* independent of ethylene, salicylate and jasmonate. *Plant J.* 20: 475-483.
- Tian, A.G., Luo, G.Z., Wang, Y.J., Zhang, J.S., Gai, J.Y., Chen, S.Y. (2004): Isolation and characterization of a *Pti1* homologue from soybean. *J. Exp. Bot.* 55: 535-537.
- Twell, D. (1994): The diversity and regulation of a gene expression in the pathway of male gametophyte development. In: *Molecular and Cellular Aspects of Plant Reproduction*, ed. RJ Scott, AD Stead: 83-135. Cambridge: Cambridge: Univ. Press.

- Vaistij, F.E., Jones, L., Baulcombe, D.C. (2002): Spreading of RNA targeting and DNA methylation in RNA silencing requires transcription of the target gene and a putative RNA-dependent RNA-polymerase. *Plant Cell* 14: 857-867.
- van der Biezen, E.A., Jones, J.D.G. (1998): Plant disease-resistance proteins and the gene-for-gene concept. *Trends in Biol. Science* 23: 454-456.
- Vogt, T., Pollak, P., Tarlyn, N., Taylor, L.P. (1994): Pollination- or wound-induced kaempferol accumulation in petunia stigmas enhances seed production. *Plant Cell* 6: 11-23.
- Vogt, T., Taylor, L.P. (1995): Flavonol 3-O-glycosyltransferases associated with petunia pollen produce gametophyte-specific flavonol diglycosides. *Plant Physiol.* 108: 903-911.
- von Stein, O.D., Thies, W.G., Hofmann, M. (1997): A high throughput screening for rarely transcribed differentially expressed genes. *Nucleic Acids Res.* 25:2.598-2.602.
- Wakely, P.R., Rogers, H.J., Rozycka, M., Greenland, A.J., Hussey, P.J. (1998): A maize pectin methylesterase-like gene, ZmC5, specifically expressed in pollen. *Plant Mol. Biol.* 37: 187-192.
- Wengier, D., Valsecchi, I., Cabanas, M.L., Wei-hua, T., McCormick, S., Muschietti, J. (2003): The receptor kinases LePRK1 and LePRK2 associate in pollen and when expressed in yeast, but dissociate in the presence of style extract. *PNAS* 100: 6.860-6.865.
- Weterings, K., Reijnen, W., van Aarssen, R., Kortstee, A., Spijkers, J. *et al.* (1992): Characterization of a pollen-specific cDNA clone from *Nicotiana tabacum* expressed during microgametogenesis and germination. *Plant Mol. Biol.* 18: 1.101-1.111.
- Wienand, U., Weydemann, U., Niesbach-Klößgen, U., Peterson, P.A., Saedler, U. (1986): Molecular characterisation of the *c2* locus of *Zea mays*, the gene coding for chalcone synthase. *Mol. Gen. Genet.* 203: 202-207.
- Wierenga, R.K., Hol, W.G. (1983): Predicted nucleotide-binding properties of p21 and its cancer-associated variant. *Nature* 302: 842-844.
- Wiermann, R., Gubatz, S. (1992): Pollen wall and sporopollenin. *Int. Rev. Cytol.* 140: 35-72.
- Wooten, M.W. (2002): In-gel kinase assay as a method to identify kinase substrates. *Science's STKE*, <http://www.stke.org/cgi/content/full/sigtrans;2002/153/pl15>.
- Worley, K.C., Culpepper, P., Wiese, B.A., Smith, R.F. (1998): BEAUTY-X: enhanced BLAST searches for DNA queries. *Bioinformatics* 14: 890-891.
- Worley, K.C., Wiese, B.A., Smith, R.F. (1995): BEAUTY: an enhanced BLAST-based search tool that integrates multiple biological information resources into sequence similarity search results. *Genome Res.* 5:173-184.
- Wu, G., Gu, Y., Li, S., Yang, Z. (2001): A genome-wide analysis of *Arabidopsis* Rop-interactive CRIB motif-containing proteins that act as Rop GTPase targets. *Plant Cell* 13: 2.841-2.856.
- Yang, Z. (1998): Signaling tip growth in plants. *Curr. Opin. Plant. Biol.* 1: 525-530.
- Ylstra, B., Busscher, J., Franken, J., Hollmann, P.C.H., Mol, J.N.M., van Tunen, A.J. (1994): Flavonols and fertilization in *petunia hybrida*: localization and mode of action during pollen tube growth. *Plant J.* 6: 201-212.
- Yokota, E., Muto, S., Shimmen, T. (1999): Inhibitory regulation of higher-plant myosin by Ca²⁺ ions. *Plant Physiol.* 119: 231-40.
- Yu, K., Schafer, U., Glavin T.L., Goring, D.R., Rothstein, S.J. (1996): Molecular characterization of S locus in two self-incompatible *Brassica napus* lines. *Plant Cell* 8: 2.369-2.380.
- Zappavigna, V., Falciola, L., Citterich, M.H., Mavilio, F., Bianchi, M.E. (1996): HMG1 interacts with HOX proteins and enhances their binding and transcriptional activation. *EMBO J.* 15: 4.981-4.991.
- Zerback, R., Dressler, K., Hess, D. (1989): Flavonoid compounds from pollen and stigma of *Petunia hybrida*: Inducers of the *vir* region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid. *Plant Science* 62: 83-91.
- Zheng, Z.L., Yang, Z. (2000): The Rop GTPase switch turns on polar growth in pollen. *Trends in Plant Science* 5: 298-303.
- Zhong, H., Srinivasan, C., Sticklen, M.B. (1992): *In-vitro* morphogenesis of corn (*Zea mays* L.). *Planta* 187, 483-489.

-
- Zhou, J.-M., Tang, X., Martin, G.B. (1997): The Pto kinase conferring resistance to tomato bacterial speck disease interacts with proteins that bind a *cis*-element of pathogenesis-related gene. *EMBO J.* 16: 3.207-3.218.
- Zhou, J.-M., Loh, Y.-T., Bressan, R.A., Martin, G.B. (1995): The tomato gene *Pti1* encodes a serine/threonine kinase that is phosphorylated by Pto and is involved in the hypersensitive response. *The Cell* 83: 925-935.
- Zhou, J.-M., Tang, X., Frederick, R.D., Martin, G.B. (1998): Pathogen recognition and signal transduction by the Pto kinase. *J. Plant Sci. Res.* 111: 353-356.
- Zinkl, G.M., Zweibel, B.I., Grier, D.G., Preuss, D. (1999): Pollen-stigma adhesion in *Arabidopsis*: a species-specific interaction mediated by hydrophobic molecules in the pollen exine. *Development* 126: 5.431-5.440.
- Zoller, M.J., Nelson, N.C., Taylor, S.S. (1981): Affinity labeling of cAMP-dependent protein kinase with p-fluorosulfonylbenzoyl adenosine. Covalent modification of lysine⁷¹. *J. Biol. Chem.* 10:10.837-10.842.
- Zuberi, M.I., Dickinson, H.G. (1985): Pollen-stigma interaction in *Brassica*. III. hydration of the pollen grains. *Cell. Sci.* 76: 321-336.

Und sonst so...

Ich danke allen, die mich bei der Durchführung meiner Arbeit unterstützt und begleitet haben.

Besonderer Dank gilt *Prof. Dr. Udo Wienand* und dem Arbeitskreis *AMP I* des Biozentrums Klein Flottbek und Botanischer Garten. Ich habe die Zeit bei Euch sehr genossen.

Dank Eurer Dreifaltigkeit *Edelgard, Elke* und *Helga*! Ohne Euch läuft nichts und das ist auch gut so. Lieber *René* danke für so vieles. Deine Mühe ist nicht hoch genug einzuschätzen und hat erheblich zum guten Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Weltreisender *Reinhold*, ich denke gerne an unseren Chicago Aufenthalt und die zwei Papiertüten zurück. Beste *Sima* der Welt, wie macht man es, immer gute Laune und für andere ein offenes Ohr zu haben? *Jantje*, danke für die goldenen Schüsse und Deine Fehlerbetrachtung. Liebe *Carina*, bilde ein Wort aus V-E-X-Z-Y-A-S und frage Dich dann, was es bedeutet. Danke, *Kätzchen*!

Ich danke allen Kollegen von *AMP II*. Insbesondere *Prof. Dr. Horst Lörz* für die Begutachtung meiner Dissertation. *Steffi, Stefan, Dirk* und *Manfred* für gute Ratschläge, aufmunternde Worte, Kritik, bioaktive Substanzen und Geräte. *Celia* und *Katina* danke ich für Einwegpipetten und Tütchen, für Plastinationen und prächtige Gesellschaft am nächtlichen Waschtage (vgl. Abb. 3-22). Wir hätten früher anfangen sollen, gemeinsam zu forschen.

Ich danke den 'grünen Daumen aus Haus 9' *Bärbel, Marion, Sabine* und *Marlene*. Ihr ward sehr gut zu meinen Pflanzen und seht ja was dabei herauskommt.

Ich schaue mich um und sehe nichts als Paper. *Andrea* und *Kolleginnen* sei für ihre Mühe gedankt, mich mit allerlei Interessantem und weniger Interessantem zu versorgen.

Ein herzlicher Dank auch den *Haustechnikern*. Sehr fix und nicht erst morgen.

Und zu guter Letzt wird's sehr persönlich...

Liebe *Janine*, für Dich THE ONE AND ONLY, MOST POPULAR DESICCATED POLLEN GRAIN,  den ich – überraschender Weise – mit GlycineMax™ und einer Flasche großgezogen habe.

Heilige *Mutter*, was soll ich sagen? Danke für alles und dafür, dass Du für mich da bist.

Geliebte *Studienstiftung*, schön das es Dich gibt! Ich bin glücklich und geb' *Dir* den Ring. 