

Funktionelle und biochemische Charakterisierung  
der PTI1-Kinasefamilie aus  
*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.

Dissertation

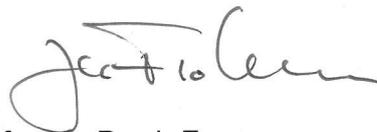
zur Erlangung des Doktorgrades  
des Departments Biologie der Fakultät für Mathematik,  
Informatik und Naturwissenschaften  
der Universität Hamburg

vorgelegt von  
**Kerstin Schumacher**  
aus Mönchengladbach

Hamburg, 2012

Genehmigt vom Fachbereich Biologie  
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften  
an der Universität Hamburg  
auf Antrag von Priv.-Doz. Dr. R. LORBIECKE  
Weiterer Gutachter der Dissertation:  
Professor Dr. U. WIENAND  
Tag der Disputation: 27. April 2012

Hamburg, den 08. April 2012



Professor Dr. J. Fromm  
Vorsitzender des Promotionsausschusses  
Biologie

# I. Inhaltsverzeichnis

I.	Inhaltsverzeichnis.....	i
II.	Abkürzungsverzeichnis .....	v
1.	Zusammenfassung.....	1
2.	Einleitung.....	4
2.1	Pollenentwicklung.....	4
2.2	Pollinierung und Pollenschlauchwachstum.....	6
2.3	Pathogenabwehr bei Pflanzen.....	9
2.4	Analogien zwischen Prozessen der Pollinierung und Pathogen-Abwehr.....	10
2.5	PTI1-Genfamilie .....	11
2.5.1	SIPTI1 und SIPTO aus Tomate.....	11
2.5.2	ZmPTI1a.....	14
2.5.3	Identifizierung weiterer PTI1-Kinasen .....	15
2.5.4	Signalkaskaden mit Beteiligung von PTI1-Kinasen.....	18
2.6	Zielsetzung dieser Arbeit.....	21
3.	Material und Methoden .....	22
3.1	Material.....	22
3.1.1	Chemikalien, Enzyme, Radionukleotide.....	22
3.1.2	Größenstandards.....	22
3.1.3	Primer .....	23
3.1.4	Reaktionskomplettausstattungen (Kits).....	23
3.1.5	Vektoren.....	24
3.1.6	Bakterienstämme .....	24
3.1.7	Pflanzen.....	25
3.1.8	Lösungen und Medien .....	26
3.1.8.1	Lösungen.....	26
3.1.8.2	Medien .....	27
3.2	Methoden .....	28

3.2.1	Anzucht von <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	28
3.2.1.1	<i>In vitro</i> Pollenkeimung von <i>Arabidopsis</i> Pollen.....	28
3.2.2	Mikrobiologische Methoden .....	29
3.2.2.1	Kultivierung und Lagerung von <i>E. coli</i> .....	29
3.2.2.2	Herstellung chemisch kompetenter Bakterienzellen .....	29
3.2.2.3	Transformation chemisch kompetenter Bakterienzellen.....	30
3.2.3	Molekularbiologische Methoden.....	30
3.2.4	Analyse von Nukleinsäuren.....	30
3.2.4.1	Allgemeine Klonierungstechniken .....	30
3.2.4.2	Präparation von Plasmid-DNA.....	31
3.2.4.3	Isolierung von genomischer DNA aus Pflanzen .....	31
3.2.4.4	Isolierung von Gesamt-RNA.....	32
3.2.4.5	Polymerase Kettenreaktion (PCR) .....	32
3.2.4.6	Agarose-Gelelektrophorese .....	33
3.2.4.7	Reverse Transkription von RNA .....	33
3.2.4.8	Sequenzierungen.....	34
3.2.4.9	Computergestützte Sequenzanalysen.....	34
3.2.5	Analyse von Proteinen .....	35
3.2.5.1	Überexpression rekombinanter Proteine in <i>E. coli</i> .....	35
3.2.5.2	Native Aufreinigung rekombinanter His-Tag-Proteine aus <i>E. coli</i> .....	36
3.2.5.3	Aufreinigung rekombinanter GST-Tag-Proteine aus <i>E. coli</i> .....	37
3.2.5.4	GST-Pulldown.....	37
3.2.5.5	Kinase Assays.....	38
3.2.5.5.1	Standard-Phosphorylierungsassay.....	38
3.2.5.5.2	Interaktions-Kinase-Assay .....	38
3.2.5.6	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	39
3.2.5.7	Coomassie Färbung.....	39
3.2.5.8	Western Blot-Transfer .....	39

3.2.5.9	Western Detektion.....	40
3.2.6	Transformation von Pflanzen.....	41
3.2.6.1	Transiente, biolistische Transformation von <i>Allium fistulosum</i> L. ....	41
3.2.6.2	Stabile Transformation von <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	42
3.2.7	Histochemischer GUS-Assay .....	43
3.2.8	Oryzalin Behandlung.....	43
3.2.9	Anilinblau-Färbung.....	44
3.2.10	Mikroskopie.....	44
3.3	Klonierungen.....	44
3.3.1	Klonierungen von PCR-Fragmenten .....	44
3.3.2	Klonierung der Promotor-Reportergen-Konstrukte.....	45
3.3.3	Klonierung von GFP-Expressionsvektoren.....	46
3.3.4	Klonierung binärer <i>Arabidopsis</i> -Expressionsvektoren.....	48
3.3.5	Klonierung von Expressionsvektoren zur Proteinexpression in <i>E. coli</i> .....	49
3.3.5.1	Klonierung von phosphorylierungsdefizienten Kinase-Mutanten.....	50
4.	Ergebnisse.....	53
4.1	Analyse der <i>PTI1</i> -Familie in <i>Arabidopsis</i> .....	53
4.1.1	Analyse der abgeleiteten Aminosäuresequenzen der <i>Arabidopsis</i> PTI1-Proteinkinasen .....	55
4.1.2	Genstruktur der <i>Arabidopsis</i> <i>PTI1</i> -Gene.....	59
4.1.3	Expressionsanalyse der <i>Arabidopsis</i> PTI1-Proteinkinasen.....	60
4.1.3.1	Untersuchung der <i>PTI1</i> -Expression in <i>Arabidopsis</i> mittels <i>in silico</i> Auswertung und semi-quantitativer Expressionsanalyse.....	61
4.1.3.2	Analyse der <i>AtPTI1</i> -Promotoraktivität in Promotor- <i>GUS</i> -Pflanzen.....	65
4.1.4	Analyse der subzellulären Lokalisation der <i>Arabidopsis</i> PTI1-Kinasen.....	70
4.1.5	Funktionalität der <i>Arabidopsis</i> PTI1-Proteinkinasen .....	77
4.1.6	T-DNA-Insertionsmutanten der PTI1-Kinasen .....	78
4.2	Pollen exprimierte AGC-Kinasen als mögliche Interaktionspartner der <sub>Pol</sub> PTI1-Kinasen .....	80

4.2.1	Funktionalität der AGC-Kinasen AGC1-5 und AGC1-7.....	83
4.2.2	PolPTI1-Kinasen und PTI1-2 interagieren <i>in vitro</i> mit AGC1-5.....	84
4.2.2.1	Interaktions-Kinase-Assays .....	85
4.2.2.2	<i>In vitro</i> GST-Bindungsstudien .....	89
4.2.3	PDK1.2 interagiert <i>in vitro</i> mit AGC1-5 .....	92
4.2.3.1	Phosphorylierung von AGC1-5 <sup>K214R</sup> durch PDK1.2.....	93
4.2.3.2	<i>In vitro</i> GST-Bindungsstudien mit AGC1-5 und PDK1.2 .....	95
4.3	Subzelluläre Lokalisation von AGC1-5, AGC1-7 und PDK1.2 .....	96
4.4	Phänotyp der T-DNA-Insertionslinien <i>agc1-5/agc1-7</i> und <i>pdk1.1/pdk1.2</i> .....	97
5.	Diskussion.....	104
5.1	Die PTI1-Kinasefamilie aus <i>Arabidopsis</i> .....	105
5.1.1	Expression und Evolution der PTI1-Kinasen aus <i>Arabidopsis</i> .....	106
5.1.2	Funktionalität der <i>Arabidopsis</i> PTI1-Kinasen.....	109
5.1.3	Subzelluläre Lokalisation der <i>Arabidopsis</i> PTI1-Kinasen.....	109
5.1.4	Funktionelle Redundanz der PTI1-Kinasen aus <i>Arabidopsis</i> .....	112
5.2	Putative PTI1-Signalkaskade in Pollen .....	113
5.2.1	Ein stromaufwärts gelegener Interaktionspartner der AGCVIII-Kinase AGC1-5 ist PDK1.2 .....	115
5.2.2	Subzelluläre Lokalisation von AGC1-5, AGC1-7 und PDK1.2.....	116
5.3	Ausblick.....	122
6.	Literaturverzeichnis.....	124
	Anhang .....	135
	Danksagung.....	142

## II. Abkürzungsverzeichnis

### Chemikalien und Lösungen

DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	1,4-Dithiothreitol
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
LB	Luria-Bertani
MES	2-(N-Morpholino)-ethansulfonsäure
MOPS	2-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
SDS	Natriumdodecylsulfat (Sodium Dodecyl Sulfate)
TAE	Tris-Acetat-EDTA
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
X-Gluc	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- $\beta$ -D-Glucuronsäure, Monohexylammoniumsalz

### Molekularbiologische Abkürzungen

Amp	Ampicillin	ORF	Offener Leserahmen
BIFC	Bimolekulare Fluoreszenz-Komplementation	<sup>32</sup> P	Radioaktives Phosphor-Isotop Isotop 32
C-terminal	carboxy-terminal	PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Cam	Chloramphenicol	PA	Phosphatidsäure
cDNA	Komplementäre DNA	PCR	Polymerase-Kettenreaktion
<i>d. ko.</i>	Doppelknockout-Mutante	<i>Pfu</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure	PI(4,5)P <sub>2</sub>	Phosphatidylinosit-4,5-Bisphosphat
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat	ps	Pseudogen
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	pv.	Pathovar
<i>For</i>	<i>forward</i>	rev	<i>reverse</i>
gDNA	genomische DNA	RNA	Ribonukleinsäure
GFP	<i>green fluorescent protein</i>	RNAi	RNA Interferenz
GUS	$\beta$ -Glucuronidase	ROS	Reaktive Sauerstoff Spezies
GST	Gluthation-S-Transferase	RT-PCR	reverse Transkriptase PCR
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid	<i>taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
•HIS	<i>His-Tag</i>	UTR	nicht translatierter Bereich
HRP	Meerrettich-Peroxidase	YFP	<i>yellow fluorescent protein</i>
Kan	Kanamycin		
mRNA	<i>messenger RNA</i>		
N-terminal	amino-terminal		

### Einheiten und sonstige Abkürzungen

ad	auffüllen bis	mg	Milligramm	rpm	Umdrehungen pro min
<i>ag</i>	<i>after germination</i>	min	Minute	RT	Raumtemperatur
bp	Basenpaar	ml	Milliliter	sec	Sekunde
ca.	circa	mM	Millimolar	U	Einheit
cm	Zentimeter	$\mu$ g	Mikrogramm	u. a.	unter anderem
<i>et al.</i>	und andere	$\mu$ l	Mikroliter	u. zw.	und zwar
g	Gramm	$\mu$ m	Mikrometer	UV	ultraviolett
<i>g</i>	Erdbeschleunigung	$\mu$ M	Mikromolar	vgl.	vergleiche
h	Stunde	OD	Optische Dichte	Vol	Volumen
kb	Kilobasen	p.A.	zur Analyse	Volt	Volt
kDa	Kilodalton	pH	Negativ dekadischer Logarithmus	v/v	Volumen pro Volumen
l	Liter	Pos.	Position	w/v	Gewicht pro Volumen
M	Molar	psi	<i>Pounds per Square inch</i>	z. B.	zum Beispiel
mA	Milliampere			° C	Grad Celsius

# 1. Zusammenfassung

Die Familie der PTI1-Kinasen (*PTO-interacting protein 1*) ist eine in Pflanzen weit verbreitete Genfamilie, deren Vertreter sowohl in mono- als auch in dikotyledonen Pflanzen vorkommen. Das erste bekannte Mitglied dieser Familie ist die Kinase SIPTI1 aus Tomate, der als *in vitro* Interaktionspartner der Kinase SIPTO eine Bedeutung bei der SIPTO-vermittelten Resistenz gegenüber *Pseudomonas syringae* zugeschrieben wird. Seither konnten weitere PTI1-Kinasen in *Arabidopsis*, Mais, Reis, Soja und Tabak identifiziert werden. Alle PTI1-Kinasen zeichnen sich durch den Besitz einer konservierten Serin/Threonin-Kinasedomäne und eines sehr variablen, jedoch häufig artübergreifend konservierten N-Terminus aus. Basierend auf ihrer Sequenzähnlichkeit werden die PTI1-Kinasen in drei Subfamilien eingeteilt. Die bisher postulierten Funktionen der PTI1-Kinasen lassen ihre Beteiligung an mindestens zwei verschiedenen biologischen Prozessen vermuten: an der Reaktion auf abiotische und/oder biotische Stresssignale und bei der Pollinierung. Die genaue Bedeutung der PTI1-Kinasen ist bislang jedoch ungeklärt.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die elf Mitglieder der PTI1-Kinasefamilie aus *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. (PTI1-1 bis PTI1-11) genetisch, biochemisch und funktionell zu charakterisieren. Insbesondere sollte der Frage nachgegangen werden, ob *Arabidopsis* PTI1-Kinasen besitzt, die in Pollen exprimiert werden und ob diese Kinasen an Mechanismen der Pollinierung beteiligt sein könnten.

Bioinformatische Genomanalytik lieferte Indizien, dass die *PTI1*-Genfamilie von *Arabidopsis* aufgrund von Genomduplikationen eine spezifische Expansion erfahren hat, die vermutlich auch mit einer Subfunktionalisierung einhergegangen ist. Zwei der elf *Arabidopsis* PTI1-Kinasen (PTI1-10 und PTI1-11) konnten aufgrund von Sequenzmutationen und einer kaum vorhandenen Expression als putative Pseudogene identifiziert werden.

Promotor-Reportergen-Studien und *in silico* Transkriptom-Analysen offenbarten ein vielfältiges mRNA-Expressionsmuster der PTI1-Kinasefamilie. Die Promotoren von vier der neun PTI1-Kinasen, PTI1-1, PTI1-3, PTI1-5 und PTI1-6, zeigten dabei ihre höchste Aktivität im reifen Pollen und wurden als <sub>pol</sub>PTI1-Kinasen bezeichnet. Die übrigen PTI1-Kinasen, PTI1-2, PTI1-4, PTI1-7, PTI1-8 und PTI1-9, werden schwach und vorwiegend ubiquitär exprimiert und wurden daher als <sub>ubi</sub>PTI1-Kinasen weitergeführt.

Die subzelluläre Lokalisation scheint für die Funktion von PTI1-Kinasen von besonderer Bedeutung zu sein. Daher wurde diese für die *Arabidopsis* PTI1-Kinasen anhand transienter und stabiler Transformationen mit GFP-Fusionskonstrukten untersucht. Hierbei konnten PTI1 Kinasen spezifisch z.B. im Cytoplasma, an der Plasmamembran oder an kortikalen

Mikrotubuli gefunden werden. Vergleicht man diese Resultate auf phylogenetischer Ebene z.B. mit der PTI1-Kinasefamilie aus Mais, so wird deutlich, dass es in allen drei Subfamilien zwar sehr große Ähnlichkeiten zwischen PTI1-Kinasen beider Spezies gibt, Lokalisation und Transkriptionsmuster dieser Proteine allerdings kaum übereinstimmen. Ein Grund für diese Vielfalt könnte sein, dass PTI1-Kinasen in der Evolution mehrfach und sehr variabel in unterschiedliche zelluläre Signaltransduktionswege rekrutiert wurden.

Neben den bereits als aktiv bekannten PTI1-Kinasen PTI1-1 und PTI1-2 konnte die Funktionalität für alle  $p_{ol}$ PTI1-Kinasen durch *in vitro* Autophosphorylierungsassays experimentell belegt werden.

Eine Suche nach  $p_{ol}$ PTI1-Interaktionspartnern lieferte mittels *in silico* Analyse zwei potentielle Kandidaten, die AGCVIIIa-Kinasen AGC1-5 und AGC1-7. Diese werden ebenfalls präferentiell in Pollen exprimiert und es wird ihnen eine Funktion beim gerichteten Pollenschlauchwachstum zugeschrieben. Im Rahmen dieser Arbeit konnte für AGC1-5 und AGC1-7 eine *in vitro* Autophosphorylierungsaktivität nachgewiesen werden. Des Weiteren konnte AGC1-5 alle  $p_{ol}$ PTI1-Kinasen sowie PTI1-2 *in vitro* phosphorylieren. Bindungsstudien mit PTI1-1 und PTI1-3 konnten AGC1-5 zudem als physischen *in vitro* Interaktionspartner dieser beiden Kinasen verifizieren.

Außerdem wurde eine präferentiell in Pollen exprimierte funktionelle 3-Phosphoinositid-abhängige Proteinkinase 1, PDK1.2, als putativer stromaufwärts gelegener Interaktionspartner der AGC1-5-Kinase anhand von *in vitro* Phosphorylierungs- und Bindungsstudien identifiziert. Phänotypische Vergleiche zwischen der Doppelknockout-Mutante *pdk1.1/pdk1.2* und einer bereits beschriebenen *agc1-5/agc1-7* Doppelknockout-Mutante zeigten, dass die *pdk1.1/pdk1.2* Mutanten-Linie ebenfalls eine Störung im gerichteten Pollenschlauchwachstum besitzt und der Phänotyp der Mutation in beiden Linien sehr ähnlich ist. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass diese Kinasen der PDK1- und AGCVIIIa-Familie nicht nur *in vitro* interagieren, sondern auch *in planta* an gemeinsamen und für Pollen essentiellen Signalkaskaden beteiligt sind. T-DNA-Insertionslinien der  $p_{ol}$ PTI1-Kinasen PTI1-1 und PTI1-5 sowie der  $ubi$ PTI1-Kinasen PTI1-4 und PTI1-8 zeigten keinen sichtbaren Phänotyp. Als Ursache ist vermutlich eine funktionelle Redundanz anzusehen, da in der Regel mehrere PTI1-Kinasen im selben Gewebe exprimiert werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit geben einen detaillierten Einblick in die genomische Organisation, Evolution, Expression, Funktionalität und subzelluläre Lokalisation der PTI1-Kinasen aus *Arabidopsis*. Im Rahmen dieser Arbeit konnten erstmals AGCVIIIa-Kinasen als mögliche stromaufwärts gelegene Interaktionspartner von PTI1-Kinasen identifiziert

werden. Außerdem scheint PDK1.2 ein stromaufwärts gelegener Interaktionspartner von AGC1-5 zu sein. Diese beiden bislang unbekannt stromaufwärts gelegenen Komponenten einer putativen *in vivo* Signalkaskade der  $P_{ol}$ PTI1-Kinasen liefern aufgrund ihrer Bedeutung für das Pollenschlauchwachstum deutliche Indizien für eine Beteiligung der PTI1-Kinasen an Pollinierungsprozessen in *Arabidopsis*. Zukünftige Studien sind notwendig um diese Theorie weiter zu belegen.

## 2. Einleitung

Jedes Individuum durchläuft in seinem Leben einen spezifischen Entwicklungszyklus. Überdies ist es permanent den Einflüssen seiner Umwelt - in Form von biotischen und abiotischen Faktoren - ausgesetzt. Evolutive Veränderungen der Umwelt erfordern eine kontinuierliche und interaktive Adaptation beider Prozesse im Verlauf der Evolution. Sowohl die Individualentwicklung als auch die Reaktion auf die genannten Umweltfaktoren wird ganz wesentlich durch das wechselnde Zusammenspiel von Signalen, Signalkaskaden und Genfunktionen gesteuert. Die fortwährende Anpassung an die sich verändernde Umwelt erfordert es, dass sich auch die molekularen Mechanismen in einem kontinuierlichen Prozess der Entwicklung und Modifikation befinden. Dabei können auch bestehende molekulare Komponenten für neue Aufgaben rekrutiert werden. Die Erforschung und das Verstehen solcher Prozesse ist einer der Schlüssel, um Einblick in die Funktionsweise von Organismen und die Entstehung evolutiver Neuerungen zu erlangen. Eine wichtige Komponente von Signalkaskaden sind Kinasen, deren Gene häufig Multigenfamilien bilden. In der vorliegenden Arbeit steht eine solche Kinasefamilie im Vordergrund, die PTI1-Kinasefamilie, deren Mitgliedern eine Beteiligung an biotischen und abiotischen Stressreaktionen sowie an Entwicklungsprozessen zugeschrieben wird.

Der Entwicklungszyklus höherer Pflanzen ist durch einen Generationswechsel zwischen einer diploiden sporophytischen und einer stark reduzierten haploiden gametophytischen Generation geprägt. Bei den Angiospermen ist die Eizelle im weiblichen Gametophyten (Embryosack) in den Samenanlagen eingebettet, welche wiederum vollständig im Fruchtknoten der Blüte von den Fruchtblättern (Karpellen) eingeschlossen werden. Um die Befruchtung mit den im männlichen Gametophyten (Pollen) enthaltenen Spermazellen zu ermöglichen, ist ein komplexer Findungsprozess erforderlich, der in der Evolution u.a. durch die Entstehung des zielgerichtet auswachsenden Pollenschlauchs umgesetzt wurde

### 2.1 Pollenentwicklung

Die Pollenmutterzellen durchlaufen im Zuge der Mikrosporogenese in den Antheren eine meiotische Teilung, wodurch vier haploide Mikrosporen entstehen (Abbildung 2-1). Die vier Mikrosporen einer Pollenmutterzelle bilden eine Tetrade, in der die einzelnen Mikrosporen sowie die Tetrade selbst durch eine dicke Callose ( $\beta$ -1,3-Glucan)-Wand umgeben sind. Durch

die Produktion von Callase in der Tapetumschicht der Antheren wird die Auflösung der Callosewand und die Freisetzung der Mikrosporen bewirkt. Während der Mikrogametogenese entsteht im Zuge einer asymmetrischen Mitose, der Pollenmitose I, aus einer freien, einzelligen Mikrospore ein Pollenkorn mit zwei Zellen unterschiedlicher Größe. Bei der kleineren Zelle handelt es sich um die generative Zelle (Antheridium-Zelle) und bei der größeren um die vegetative Zelle (Pollenschlauch-Zelle). Die generative Zelle ist von dem Cytoplasma der vegetativen Zelle eingeschlossen und durchläuft dort eine weitere Mitose, die Pollenmitose II, aus welcher zwei Spermazellen hervorgehen. Der Zeitpunkt der Pollenmitose II ist in den verschiedenen Pflanzenfamilien variabel. In Gräsern und Kruziferen findet sie noch innerhalb der Anthere statt, so dass sich die Pollenkörner bei der Freisetzung in einem trizellulären Stadium befinden (MASCARENHAS 1990; MCCORMICK 2004). In den meisten Pflanzenfamilien (~70 %) werden die Pollen jedoch im bizellulären Stadium aus den Antheren freigesetzt und die zweite Mitose findet erst während des Pollenschlauchwachstums im Stylus statt (BREWBAKER 1967).

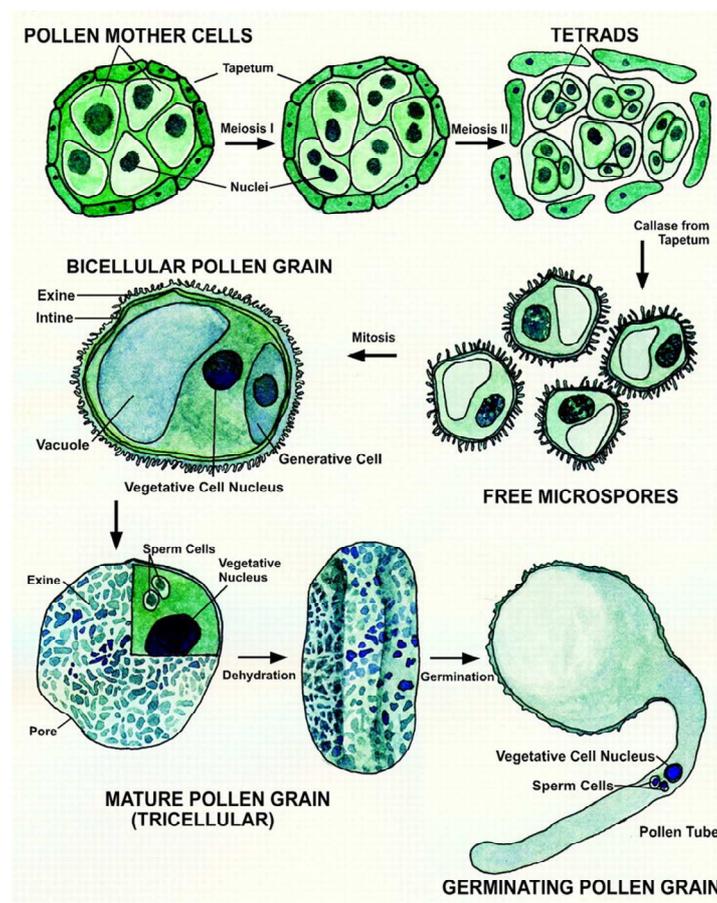


Abbildung 2-1: Schematische Darstellung der Pollenentwicklung (entnommen aus MCCORMICK 2004).

Vor der Anthese durchlaufen die Pollenkörner eine Phase der Dehydrierung. Während dieses erforderlichen Stadiums kommt es zu einer metabolischen Inaktivierung, wodurch der Pollen seine Toleranz gegenüber Umwelteinflüssen erhält (LIN & DICKINSON 1984). Der Wassergehalt der Pollen im Anschluss an die Dehydrierung ist charakteristisch für die jeweiligen Pflanzenspezies und liegt bei Freisetzung aus den Antheren zwischen 6 und 60 % (KERHOAS *et al.* 1987).

Obwohl eine relativ große Anzahl von Genen notwendig ist, um die gesamte Entwicklung der Pollen zu programmieren, wird der Großteil dieser Gene sowohl im Sporophyten als auch im Gametophyten exprimiert und nur eine kleine Menge davon ist spezifisch im Pollen vorhanden. Aufgrund des Zeitpunktes, zu welchem die Gene während der Pollenentwicklung aktiviert werden, unterscheidet man zwei Gruppen: die „frühen“ und die „späten“ Gene. Die „frühen“ Gene werden kurz nach der Meiose aktiv und kodieren u.a. für Proteine, welche für die Organisation des Cytoskeletts benötigt werden. Die Gene der zweiten Gruppe, die „späten“ Gene, werden nach der Mikrosporen-Mitose aktiv und die Menge an mRNAs steigt mit zunehmendem Reifegrad. Diese späten Gene nehmen vermutlich eine Rolle in der Pollenkeimung oder dem Pollenschlauchwachstum ein (MASCARENHAS 1990).

## 2.2 Pollinierung und Pollenschlauchwachstum

Bei den Angiospermen wird die Pollinierung durch das Auftreffen eines teilweise dehydrierten Pollens auf ein kompatibles Stigma eingeleitet. Die Adhäsion des Pollenkorns wird durch die Exine vermittelt, der hauptsächlich aus Sporopollenin bestehenden äußeren Wand des Pollenkorns (ZINKL *et al.* 1999). Für die nachfolgenden stärkeren Interaktionen zwischen Pollenkorn und Stigma werden Proteine und Lipide beider Oberflächen benötigt (DICKINSON *et al.* 2000) und es kommt zur Ausprägung eines Appressorium-ähnlichen Fußes, der essentiell für die Akzeptanz von kompatiblen Pollen ist (ELLEMAN & DICKINSON 1990; KANDASAMY *et al.* 1994). Im Anschluss an die Adhäsion des Pollens auf dem Stigma rehydriert das Pollenkorn innerhalb weniger Minuten. Dieser Prozess ist bei Pflanzen mit feuchten Stigmata (z.B. bei *Solanaceae*) passiv und unreguliert (SWANSON *et al.* 2004), während die Rehydrierung bei Pflanzen mit trockenen Stigmata (z.B. bei *Brassicaceae* und *Poaceae*) ein komplex regulierter Prozess ist (HESLOP-HARRISON 1979; DUMAS *et al.* 1984; DICKINSON 1995). Die Aufnahme von Wasser führt zu einem Anschwellen des Pollen, einer Aktivierung von Stoffwechselprozessen und einem Wiederaufnehmen der Proteinsynthese unter

Verwendung eingelagerter mRNAs (MASCARENHAS 1989, 1993). Begleitet werden diese Prozesse mit einer Reorganisation des Cytoskeletts und des Cytoplasmas, um die vegetative Zelle für die Bildung des Pollenschlauchs auszurichten (HESLOP-HARRISON 1987; STEER & STEER 1989). Der durch die Wasseraufnahme entstandene osmotische Druck führt in Verbindung mit einer enzymatischen Schwächung der Intine an der Stelle des Pollenschlauchaustritts (MÄKINEN & BREWBAKER 1967; KNOX & HESLOP-HARRISON 1970) zu einem Hervortreten des Pollenschlauchs aus einer der Poren in der Exine (BEDINGER 1992). Der Pollenschlauch durchbricht zunächst die Kutikula des Stigmas und wächst durch polares Spitzenwachstum in einem spezialisierten Gewebe, dem Transmissionsgewebe, zu den Samenanlagen. Der Nukleus der vegetativen Zelle und die generative Zelle<sup>1</sup> bzw. die zwei Spermazellen<sup>2</sup> bilden eine *male germ unit (MGU)* (DUMAS *et al.* 1984), welche während der Ausdehnung des Pollenschlauchs in diesen wandert und beim polaren Spitzenwachstum des Pollenschlauchs nachgezogen wird. Durch die Bildung von Zwischenwänden aus Callose, den Calloseplaques, wird der Spitzenbereich mit der *MGU* von den nicht mehr benötigten Abschnitten der Pollenschlauchzelle getrennt (Abbildung 2-2).

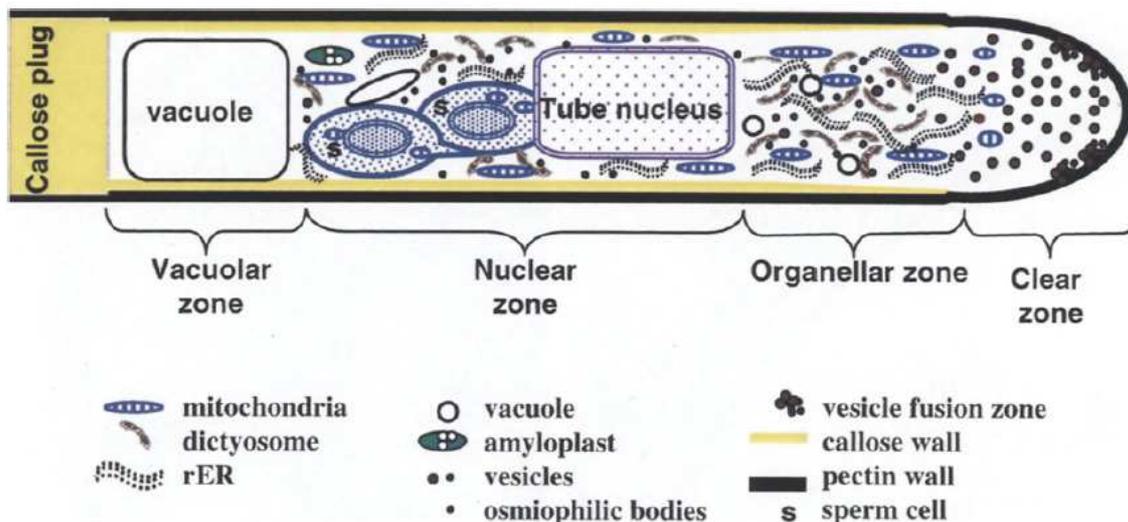
Polares Spitzenwachstum ist in vielen Organismen bekannt, wie beispielsweise das Hyphenwachstum bei Pilzen oder bei Neuronen (Axons) tierischer Zellen. In Pflanzen zeigen zwei Zelltypen polares Spitzenwachstum: Wurzelhaare und Pollenschläuche. Pollenschläuche besitzen im Pflanzenreich das schnellste Wachstum, welches bei Mais bis zu 1 cm pro Stunde erreicht (MASCARENHAS 1993). Ermöglicht wird das polarisierte Spitzenwachstum durch koordinierte zelluläre Aktivitäten, im Besonderen durch ein dynamisches Aktin-Cytoskelettsystem sowie gerichtete Exocytose und regulierte Endocytose. Beim polaren Spitzenwachstum der Pollenschlauchzelle ist sowohl ein gerichtetes Wachstum notwendig als auch die Möglichkeit eines Richtungswechsels als Reaktion auf extrazelluläre Hinweise, damit der Pollenschlauch die Spermazellen erfolgreich ausliefern kann (HEPLER *et al.* 2001). Einzigartig an den Pollenschlauchzellen ist allerdings der sukzessive Transport des Nukleus, welcher seine Position in der Spitze, entfernt vom letzten Calloseplaque, beibehält (LORD 2000). Den Mikrotubuli wird für den Transport der *MGU* sowie für deren Spindelform eine wichtige Rolle zugesprochen (JOOS *et al.* 1994; ASTRÖM *et al.* 1995; RAUDASKOSKI *et al.* 2001). Eine offensichtliche Rolle in der Regulierung der Pollenschlauchwachstumsrate wird den Mikrotubuli hingegen in Angiospermen abgesprochen (ASTRÖM *et al.* 1995; RAUDASKOSKI *et al.* 2001).

---

<sup>1</sup> Bei Pflanzen mit bizellulärem Pollen

<sup>2</sup> Bei Pflanzen mit trizellulärem Pollen

Am Ende der Pollinierung wächst der Pollenschlauch in die Mikropyle eines Ovulums durch eine der beiden Synergiden ein. Nach Platzen des Pollenschlauches kommt es zur Freisetzung der Spermazellen in den Embryosack. Im Zuge der doppelten Befruchtung fusioniert eine der Spermazellen mit der Eizelle und die andere mit der Zentralzelle, wodurch sowohl der Embryo als auch das Endosperm entstehen. In den meisten Pflanzen sind Keimung und Pollenschlauchwachstum relativ schnelle Prozesse und die Zeitspanne zwischen Pollinierung und Befruchtung liegt zwischen 1 bis 48 Stunden (MASCARENHAS 1990).



**Abbildung 2-2: Diagramm eines in vivo wachsenden Pollenschlauchs von *A. thaliana*** (entnommen aus Lennon & Lord 2000).

Um zielgerichtet vom Stigma des Gynoeceums bis zum Embryosack zu gelangen, ist eine komplexe Zielfindung des Pollenschlauchs notwendig, die allgemein als Pollenschlauch *Guidance* bezeichnet wird. Nachdem der Pollenschlauch die Basis der Stigma-Papillen erreicht hat, wächst er interzellulär weiter zum Stylus und anschließend durch das Transmissionsgewebe des Stylus und Septums (HILL & LORD 1986; LENNON *et al.* 1998). Nach Verlassen des Septums wächst der Pollenschlauch über die Oberfläche des Funiculus zur Mikropyle des Ovulums, durch die er durch eine der Synergiden in den Embryosack eintritt, um die Spermazellen freizusetzen. Das Transmissionsgewebe produziert extrazelluläre Matrix (ECM), durch welche der Pollenschlauch zu den Ovarien geleitet wird. Die ECM enthält die notwendigen chemischen Gradienten und Nährstoffe für die Navigation und das schnelle Wachstum des Pollenschlauchs (CRAWFORD & YANOFKY 2008). Mittlerweile sind verschiedene Moleküle aus dem Pistill bekannt, die den Pollenschlauch mittels Gradienten leiten, dazu gehören z.B. GABA ( $\gamma$ -Aminobuttersäure), Chemocyanin in Lilie bzw.

Plantacyanin in *Arabidopsis* und Nitritoxid (NO) (PALANIVELU *et al.* 2003; KIM *et al.* 2003; DONG *et al.* 2005; PRADO *et al.* 2008). Ebenfalls werden verschiedene Proteine mit der Leitung von Pollenschläuchen zum Ovulum in Verbindung gebracht, wie z.B. GEX3, MAA1/3, LURE, MYB98 und CCG (ALANDETE-SAEZ *et al.* 2008; SHIMIZU & OKADA 2000; OKUDA *et al.* 2009; PUNWANI *et al.* 2007; CHEN *et al.* 2007) sowie FER/SRN und LRE, welche die Pollenschlauch Aufnahme ins Ovulum leiten (ESCOBAR-RESTREPO *et al.* 2007; CAPRON *et al.* 2008). Über die Rezeptoren der Pollenschläuche und die nachfolgenden Signalkaskaden, die für die Aufnahme und Weiterleitung dieser zahlreichen Signale notwendig sind, ist jedoch weniger bekannt. Bisher konnten zwei verwandte Rezeptorkinasen der FER/SRN identifiziert werden, ANX1 und ANX2, welche die Freisetzung der Spermazellen aus den Pollenschläuchen in *Arabidopsis* regulieren (BOISSON-DERNIER *et al.* 2009; MIYAZAKI *et al.* 2009).

## 2.3 Pathogenabwehr bei Pflanzen

Pflanzen benötigen aufgrund eines fehlenden zirkulierenden Immunsystems individuelle, schnelle Mechanismen zur Erkennung und Reaktion auf biotische Umweltfaktoren, beispielsweise Pathogenen. Die frühe und schnelle Aktivierung einer Anzahl von Abwehrreaktionen, die zur Resistenz führen, stellen einen Bereich der angeborenen Immunität dar (SESSA & MARTIN 2000). Die erste Schicht des angeborenen Immunsystems basiert auf der Erkennung von Pathogen-assoziierten molekularen Mustern (*pathogen-associated molecular patterns*, PAMPs) durch *pattern recognition receptors* (PRRs) auf der Pflanzenoberfläche, wie z.B. Flagellin durch den FLS2 (*flagellin sensitive 2*). Die Reaktion auf Flagellin und andere PAMPs wird als PAMP ausgelöste Immunität (*PAMP-triggered immunity*, PAMP-TI) bezeichnet. Die durch PAMP vermittelten Abwehrmechanismen führen zu einer basalen Resistenz (JONES & DANGL 2006). Um diese PAMP ausgelöste Immunität zu hemmen, entwickeln erfolgreiche Pathogene Effektoren, die Produkte der Avirulenz (*avr*)-Gene. Diese können von Pflanzen jedoch wiederum durch zusätzliche, komplementäre Rezeptoren, den Produkten der Resistenz (*R*)-Gene, erkannt werden, um eine zweite Abwehrschicht aufzubauen. Diese zweite Schicht wird als Effektor ausgelöste Immunität (*effector-triggered immunity*, ETI) oder auch Gen-für-Gen-Resistenz bezeichnet (BOLLER & HE 2009). Die intrazellulären oder transmembranen Rezeptoren der Pflanzen erkennen in einer Rezeptor-Liganden-Interaktion spezifisch die direkt in die Pflanzenzelle oder in die intrazellulären Bereiche injizierten *avr*-Genprodukte (SESSA & MARTIN 2000).

Zu den nach Erkennung vermittelten Abwehrreaktion gehören u.a. die Akkumulation von reaktiven Sauerstoff Spezies (ROS, „oxidative burst“), Ionenflüsse (insbesondere von Calcium), Veränderungen des Phosphorylierungszustands von Proteinen an der betroffenen Stelle, Zellwandverstärkung durch Callose, Produktion von antimikrobiellen Phytoalexinen sowie die Synthese von PR (*pathogenesis-related*)-Proteinen mit antifungalen und antibakteriellen Eigenschaften wie Glucanasen und Chitinasen. Die Abwehrreaktionen werden häufig durch einen schnellen lokalen begrenzten Zelltod, der Hypersensitiven Reaktion (HR), manifestiert, um das Wachstum des Pathogens und die Ausbreitung einzudämmen (HAMMOND-KOSACK & JONES 1996; DURNER & KLESSIG 1999)

## **2.4 Analogien zwischen Prozessen der Pollinierung und Pathogen-Abwehr**

Obschon die Ziele bei Pollinierung und Pathogenabwehr andersgeartet sind, so zeigen molekularbiologische Forschungen an diesen Vorgängen immer mehr Parallelen zwischen beiden Prozessen auf. Bei beiden Mechanismen handelt es sich um die Interaktion zweier Organismen, entweder zwischen dem männlichem Gametophyten und dem Stigma des Sporophyten oder zwischen dem Pathogen und dem Wirtsorganismus. Während der Pollinierung penetriert der auskeimende Pollenschlauch durch einen Appressorium-ähnlichen Fuß die Kutikula und die Papillazelle des Stigmas und wächst anschließend durch das Transmissionsgewebe des weiblichen Sporophyten (ELLEMAN *et al.* 1992). Bei der Infektion mit einem Pathogen werden z.B. epidermale Zellen durch einen Typ III Sekretionsapparat infiziert (GALÁN & COLLMER 1999) bzw. in vielen Pflanze-Pilz-Interaktionen erfolgt die Penetration der Pflanzenkutikula nach Formation eines Appressoriums mit anschließendem intrazellulärem Wachstum der Pilzhyphen (EMMETT & PARBERY 1975). Sowohl bei der Pollinierung als auch bei der Pathogenabwehr kommt es zu Calloseablagerungen. Während des Pollenschlauchwachstums wird Callose sowohl in der inneren Wandschicht hinter der wachsenden Pollenschlauchspitze abgelagert als auch in regelmäßigen Abständen als Calloseplaques im Pollenschlauch. In der Pathogenabwehr wird während der HR Callose in Pflanzenzellen an und um die Stelle der HR herum abgelagert, welches die Zellwand verstärken und somit eine Barriere gegen eine Invasion des Pathogens bilden soll (STANGHELLINI & ARAGATI 1966).

In beiden Systemen ermöglichen Mechanismen der Signalweiterleitung die Erkennung des jeweiligen Eindringlings und es werden die entsprechenden Reaktionen ausgelöst. Während der Pollinierung wird die Kommunikation zwischen dem männlichen Gametophyten und dem weiblichen Teil der Blüte durch Signalweiterleitung gewährleistet. Dies trägt somit zur Erkennung von Eigen- und Fremdpollen bzw. kompatiblen und inkompatiblen Pollen bei. Zudem wird das Pollenschlauchwachstum im weiblichen Stylus reguliert. Analog ist eine spezifische Erkennung des Eindringlings ebenfalls während der Pathogenabwehr zu verzeichnen, welche ebenfalls zur Aktivierung verschiedener Signaltransduktionswege führt, die eine schnelle und effektive Abwehr des Krankheitserregers einleiten und somit eine mögliche Resistenz gegenüber dem Pathogen vermitteln.

## 2.5 PTI1-Genfamilie

Im Zuge einer Identifizierung von Genen, die in Prozessen der Pollenfertilität und Pollinierung in Mais beteiligt sind, konnten HERRMANN *et al.* (2006) ein Gen mit einer besonders hohen Expression in Pollen identifizieren. Dieses Gen kodiert für eine funktionelle Serin/Threonin-Kinase, mit *in vitro* Autophosphorylierungsaktivität, an deren Phosphattransfer das hochkonservierte Lysin<sup>100</sup> beteiligt ist. Aufgrund einer Identität von 69% zu der SIPTI1-Serin/Threonin-Kinase aus Tomate bezeichneten HERRMANN *et al.* (2006) die im Mais identifizierte Kinase als ZmPTI1a. Die SIPTI1-Kinase ist im Gegensatz zu ZmPTI1a nicht in reifen und keimenden Pollen exprimiert, sondern in grünen Pflanzenteilen. Ursprünglich wurde die Kinase SIPTI1 (*PTO interactor 1*) als *in vitro* Substrat von der Serin/Threonin-Kinase SIPTO (*Pseudomonas syringae* cv. *tomato*) identifiziert (ZHOU *et al.* 1995), die eine gut charakterisierte Funktion bei der R-Gen vermittelten Pathogenresistenz besitzt.

### 2.5.1 SIPTI1 und SIPTO aus Tomate

Mit Hilfe eines Hefe-2-Hybrid-Ansatzes konnte SIPTI1 als einer von zehn verschiedenen mit SIPTO interagierenden Proteinen in Tomate identifiziert werden (ZHOU *et al.* 1995; 1997). SIPTO aus Tomate ist ein R-Gen, welches Resistenz gegenüber spezifischen Rassen des bakteriellen Pathogens *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (*Pst*) vermittelt (MARTIN *et al.* 1993). *Pst* exprimiert u. a. die *avr*-Genprodukte AvrPTO und AvrPTOb, die durch das bakterielle Typ III Sekretionssystem in die Wirtszelle eingeschleust werden, um die Blatt-

Fruchtfleckenkrankheit (*bacterial speck disease*) auszulösen (ABRAMOVITCH *et al.* 2003; MARTIN *et al.* 1993). Die physische Interaktion der cytoplasmatischen SIPTO-Kinase mit AvrPTO und AvrPTOB in der Pflanzenzelle resultiert in der Aktivierung der HR, welche mit einem Aufgebot an Abwehrreaktionen einhergeht, einschließlich des Zelltodes an der Infektionsstelle (PEDLEY & MARTIN 2003; MUR *et al.* 2008). Diese SIPTO-vermittelte Immunität benötigt das *nukleotide-binding site/leucine rich repeats* (NBS-LRR)-Protein SIPRF, das zusammen mit PTO einen hochmolekularen Proteinkomplex bildet (SALMERON *et al.* 1996; MUCYN *et al.* 2006).

Für die Interaktion zwischen SIPTI1 und SIPTO konnte eine *in vitro trans*-Phosphorylierung des Threoninrestes an Position 233 von SIPTI1 durch SIPTO nachgewiesen werden (SESSA *et al.* 2000a). Thr233 wurde zudem als Hauptziel der SIPTI1-Autophosphorylierung bestimmt. Da SIPTI1 nicht in der Lage war SIPTO zu phosphorylieren, wurde von einer SIPTO-abwärtsgelegenen Funktion von SIPTI1 ausgegangen. Weitere Hinweise auf eine Beteiligung von SIPTI1 bei der Pathogenabwehr bzw. an einer SIPTO-vermittelten HR wurden durch die Überexpression von SIPTI1 und SIPTO in Tabakpflanzen unterstützt (ZHOU *et al.* 1995). Diese transgenen Tabakpflanzen zeigten nach Infektion mit avrPTO exprimierendem *P. syringae* pv. *tabaci* eine verstärkte HR in den Blättern. Während die Kontrollpflanzen, welche nur SIPTO enthielten, entweder keine oder nur eine verspätete HR zeigten. Bei Infektion der gleichen Pflanzen mit einem virulenten *P. syringae* pv. *tabaci*-Stamm, der avrPTO nicht exprimierte, zeigten deren Blätter keine HR. Offen blieb jedoch die Frage, ob SIPTI1 eine Rolle in anderen Abwehrreaktionen spielen könnte, die ebenfalls zur Resistenz gegenüber *P. syringae* pv. *tabaci* führen. Bis zum gegenwärtigen Zeitpunkt konnte keine „*loss-of-function*“ Mutante erfolgreich erzeugt werden, die eine Beteiligung von SIPTI1 in der Pathogenresistenz bestätigen könnte.

Weitere Untersuchungen der SIPTO-vermittelten Resistenz gegenüber *Pst* trugen interessante Daten zur Aufklärung des Mechanismus von SIPTO bei. So konnten DE VRIES *et al.* (2006) zeigen, dass die N-terminale Myristoylierung des SIPTO essentiell für die Signaltransduktion und Initiierung der HR ist, jedoch keinen Einfluss auf die Lokalisation des Proteins hat. WU *et al.* (2004) postulierten zuvor einen hydrophoben Bereich der SIPTO-Kinase, der die katalytische Spalte von SIPTO umspannt. An diesen hydrophoben Bereich bindet in der nicht infizierten Zelle ein inhibitorisches Protein, welches dadurch die Kinaseaktivität von SIPTO negativ reguliert. Da ein Teil dieses hydrophoben Bereichs mit der Hauptstelle der Interaktion von SIPTO mit AvrPTO und AvrPTOb übereinstimmt, wurde angenommen, dass durch eine Bindung der bakteriellen Effektoren eine Entfernung des

inhibitorischen Proteins stattfindet, wodurch die negative Regulierung von SIPTO aufgehoben würde. In Übereinstimmung mit den Daten von DE VRIES *et al.* (2006) und WU *et al.* (2004) zeigten ANDRIOTIS UND RATHJEN (2006), dass die negative Kontrolle der SIPTO-Kinaseaktivität durch den myristoylierten N-Terminus von SIPTO ausgelöst wird.

Kontrovers ist jedoch die Rolle der SIPTO-Kinaseaktivität für die Erkennung der bakteriellen Effektoren und für die Signalweiterleitung. Während einige Studien die Notwendigkeit der SIPTO-Kinaseaktivität für die Effektorerkennung erbrachten (SESSA *et al.* 2000b; KIM *et al.* 2002; RATHJEN *et al.* 1999; WU *et al.* 2004; XING *et al.* 2007), konnten einige dieser Studien auch Ausnahmen aufweisen (RATHJEN *et al.* 1999; WU *et al.* 2004). Beweise, dass die Kinaseaktivität von SIPTO nach Effektorerkennung verzichtbar ist, wurden mittels „*gain-of-function*“ SIPTO-Mutanten geliefert. Diese besaßen zwar keine Kinaseaktivität, waren jedoch ebenfalls in der Lage, bei Abwesenheit der bakteriellen Effektoren eine HR auszulösen (RATHJEN *et al.* 1999; WU *et al.* 2004). Unterstützt wurden diese Annahmen durch Verwendung eines PP1-Analogons, welches als ATP-kompetitiver Inhibitor fungiert, und einer Analogon-sensitiven SIPTO-Kinasen (SIPTO<sup>as</sup>) mit zusätzlicher Hemmung der Kinaseaktivität. Diese SIPTO<sup>as</sup>-Kinasen waren in Anwesenheit von PP1 und AvrPTO in der Lage eine HR auszulösen (SALOMON *et al.* 2009). Im Widerspruch dazu zeigten SESSA *et al.* (2000b) basierend auf einer Mutation der SIPTO-Autophosphorylierungsstelle Ser198, welche zum Auslösen der HR notwendig aber verzichtbar für die Interaktion mit AvrPTO ist, dass die SIPTO-Kinaseaktivität für die Signalweiterleitung notwendig ist. SALOMON *et al.* (2009) postulierten daher, dass die SIPTO-Kinaseaktivität zwar eine wichtige Rolle in der Stabilisierung des SIPTO-Moleküls in der richtigen Konformation durch Autophosphorylierung spielt, aber nicht in der SIPTO-vermittelten Signalweiterleitung. In Übereinstimmung mit WU *et al.* (2004) und ANDRIOTIS & RATHJEN (2006) formulierten SALOMON *et al.* (2009) die Hypothese, dass das Protein erst durch eine Effektor induzierte Konformationsänderung aktiviert wird, welche anschließend von SIPFR detektiert wird um die pflanzlichen Immunreaktionen zu aktivieren.

Einige der Annahmen betreffend der SIPTO-vermittelten Resistenz gegenüber *Pst* erscheinen somit kontrovers und eine Beteiligung von SIPTI1 an der SIPTO-vermittelten HR nicht eindeutig bestätigt. Klarheit könnte sowohl ein Nachweis der *in vivo* Interaktion zwischen SIPTI1 und SIPTO als auch Untersuchung von „*loss-of-function*“ Mutanten liefern.

### ***PTO-Kinase Familie***

SIPTO-ähnliche Gene sind hochkonserviert in vielen Pflanzenarten vertreten (MARTIN *et al.* 1993) und mittels *in silico* Analysen konnten mehrere SIPTO-ähnliche Gene in Mais, Reis und *Arabidopsis* identifiziert werden. Diese sind jedoch im Gegensatz zu den PTO-Kinasen aus Tomate und anderen *Solanaceae*n nicht cytoplasmatisch lokalisiert, sondern weisen Transmembrandomänen auf und gehören wahrscheinlich der großen Familie der transmembranen Rezeptorkinasen an (ROSE 2004). Genauere Untersuchungen einer PTO-ähnliche Serin/Threonin -Kinase (ZmPTO) aus Mais zeigten, dass diese im Gegensatz zu SIPTO keine N-terminale Myristoylierungsstelle besitzt, sondern sowohl eine extrazelluläre als auch eine Transmembrandomäne aufweist und sehr wahrscheinlich ebenfalls eine Transmembranrezeptorkinase ist (ROSE 2004). Die C-terminale Kinasedomäne von ZmPTO zeigte allein keine *in vitro* Autophosphorylierungsaktivität und war weder in der Lage SIPTI1 noch ZmPTI1a zu phosphorylieren (KLUTH 2004). Die Sequenzvergleiche lassen vermuten, dass sich die PTO-Kinasen der *Solanaceae*n aufgrund der nicht vorhandenen extrazellulären Binde- und Transmembrandomänen grundsätzlich im Aufbau von denen anderer Pflanzen unterscheiden. Daher ist fraglich, ob PTO-Kinasen generelle Interaktionspartner von PTI1-Kinasen sind oder dies nur ein Merkmal der *Solanaceae* ist.

Interessanterweise besitzen die Serin/Threonin-Kinasen SIPTO und SIPTI1 aus Tomate signifikante Ähnlichkeit zur humanen IL-1R assoziierten Kinase IRAK und dem Pelle-Protein aus *Drosophila*, welche stromabwärts gelegene Komponenten des *Interleukin-1*-Rezeptors (IL-1R) bzw. des Toll-Rezeptors darstellen und ebenfalls in Mechanismen der angeborenen Immunität involviert sind (SESSA & MARTIN 2000; TROFIMOVA *et al.* 1996).

#### **2.5.2 ZmPTI1a**

Die starke Expression von ZmPTI1a in Pollen konnten HERRMANN *et al.* (2006) sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene zeigen und durch die Identifizierung von pollenspezifischen Sequenzmotiven in der Promotorregion belegen (HERRMANN 2004). Des Weiteren waren sowohl SIPTO als auch Proteine aus dem Extrakt von Maispollen bzw. Narbenfäden in der Lage, ZmPTI1a zu phosphorylieren. Anhand dieser Ergebnisse postulierten HERRMANN *et al.* (2006), dass ZmPTI1a keine Funktion bei der Pathogenabwehr besitzt, sondern eher an der pollenspezifischen Signaltransduktion mitwirkt.

Mittels transienter und stabil exprimierter ZmPTI1a:GFP-Fusionskonstrukte in Mais konnten HERRMANN *et al.* (2006) eine Assoziation von ZmPTI1a mit der Plasmamembran von Pollen nachweisen. Diese wird vermutlich über eine N-Myristoylierung des Glycinrestes an Position 2 vermittelt und durch weitere Acylierungen von Cysteinresten des N-Terminus unterstützt. ZmPTI1a:GFP war jedoch nicht gleichmäßig über die Pollenmembran verteilt, sondern akkumulierte in einer ringförmigen Struktur, die mit Callose co-lokalisierte. Eine Funktion für diese auch in Wildtyp-Pollen vorkommende Ringstruktur aus Callose ist bislang ungeklärt. Eine Co-Lokalisation von ZmPTI1a:GFP und Callose wurde ebenfalls in den sogenannten Callose-Stadien der Pollenmitose I sowie an Callose-Plaques in keimenden Pollenschläuchen dokumentiert. Aufgrund der Assoziation von ZmPTI1a mit Callose, einer Hauptkomponente des Pollenkorns und der Pollenschlauchwand, welche für die Lebensfähigkeit und Fertilität des Pollens unverzichtbar ist, vermuteten HERRMANN *et al.* (2006), dass ZmPTI1 eine Funktion bei der Regulation der Callose-Synthese und anderen mit Callose verbundenen Prozessen ausüben könnte. Diese Vermutung wurde durch eine Tendenz zu niedrigeren Callosemengen in Pollen von ZmPTI1a-RNAi Pflanzen unterstützt, eine statistische Absicherung dieser Daten war jedoch bedingt durch den hybriden, genetischen Hintergrund nicht möglich (PINTO 2005).

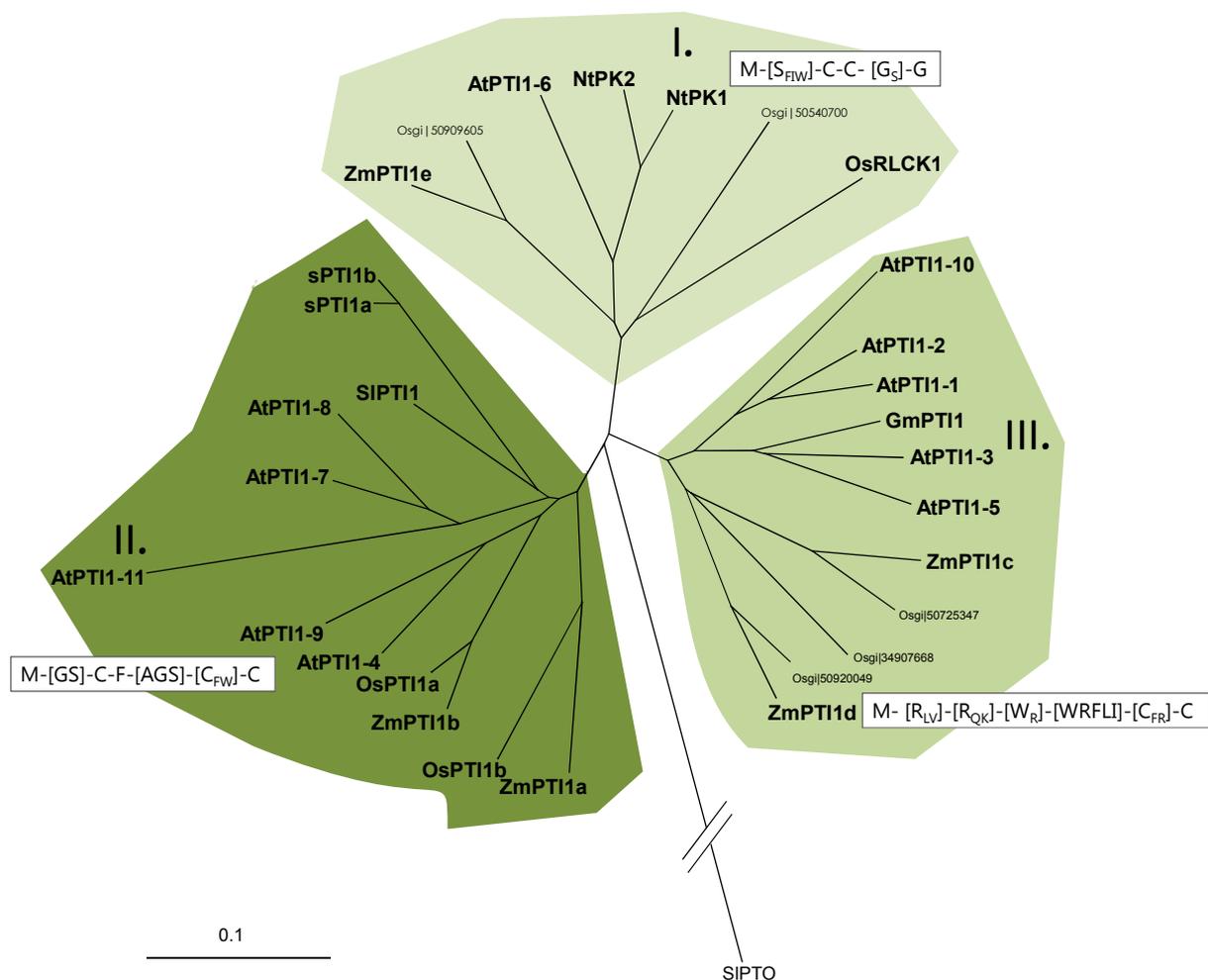
Pollen von ZmPTI1a-RNAi-Pflanzen zeigte keine morphologischen Veränderungen und auch keine Veränderungen der *in vitro* Keimungsfähigkeit (HERRMANN *et al.* 2006). Durch Kreuzungsstudien konnte allerdings eine signifikant verringerte Konkurrenzfähigkeit der transgenen ZmPTI1a-RNAi-Pollen im Vergleich zu Wildtyp-Pollen nachgewiesen werden. Hieraus wurde abgeleitet, dass ZmPTI1a eine wichtige Rolle in Signalwegen spielt, die mit der Aufrechterhaltung der Pollenfitness assoziiert sind (HERRMANN *et al.* 2006).

### 2.5.3 Identifizierung weiterer PTI1-Kinasen

Seit der Identifizierung von SIPTI1 konnten neben ZmPTI1a weitere PTI1-Kinasen in verschiedenen Pflanzenarten identifiziert werden, wozu sowohl Vertreter der Monokotyledonen wie Mais und Reis als auch der Dikotyledonen wie *Arabidopsis*, Soja und Tabak gehören.

Diese SIPTI1-homologen Kinasen besitzen neben einer besonders hochkonservierten Kinasedomäne sehr variable N- und C-terminale Regionen. Anhand eines phylogenetischen Vergleichs der ZmPTI1-Kinasen mit anderen bereits bekannten und weiteren putativen PTI1-Kinasen aus anderen Pflanzen wurde eine Einteilung in drei Subfamilien

vorgenommen (Abbildung 2-3, HERRMANN *et al.* 2006). Jede der Subfamilien besitzt einen konservierten N-Terminus mit einer spezifischen Konsensussequenz und setzt sich sowohl aus Vertretern mono- als auch dikotyledoner Pflanzen zusammen. Aufgrund der Ähnlichkeiten zwischen den N-Termini mono- und dikotyledoner Pflanzenarten scheinen die *PTI1*-Gene eine sehr ursprüngliche Gen-Familie in höheren Pflanzen zu repräsentieren. Die konservierten N-terminalen Motive der einzelnen Subfamilien wurden scheinbar bedingt durch distinkte und spezifische biologische Funktionen während der Evolution in den verschiedenen Taxa beibehalten (HERRMANN *et al.* 2006).



**Abbildung 2-3: Phylogenie PTI1-homologer Proteine aus mono- und dikotyledonen Pflanzen.** Phylogenetische Beziehung von PTI1-Kinasen aus *Arabidopsis*, Mais, Reis, Soja, Tabak und Tomate, als *outgroup* diente SIPTO. Die Konsensussequenz der N-Termini ist für die Subfamilien angezeigt: hochkonservierte Aminosäurereste sind fett gedruckt während in Klammern angegebene Aminosäuren weniger konserviert sind, Aminosäurereste mit seltenem Auftreten sind mit tiefgestellten Buchstaben gekennzeichnet. Der phylogenetische Baum wurde durch Berechnungen mit *ClustalX2* und Visualisierung mit *TreeView* erstellt. Modifiziert nach HERRMANN *et al.* (2006).

Zusätzlich zu ZmPTI1a identifizierten HERRMANN *et al.* (2006) in Mais drei weitere zu *SIPTI1* homologe Gene, die gemäß ZmPTI1a, ZmPTI1b, c und d genannt wurden. In etwa zeitgleich identifizierten ZOU *et al.* (2006) ebenfalls eine PTI1-Kinase in Mais, die sie ZmPTI1 nannten und welche identisch mit ZmPTI1c ist. Keine der drei ZmPTI1-Kinasen ZmPTI1b, c und d zeigt eine vornehmliche Expression in Pollen. HERRMANN *et al.* (2006) konnten jedoch für ZmPTI1b zeigen, dass die Transkriptmenge des zugehörigen Gens in Maiskolben nach Infektion mit *Fusarium graminearum* signifikant ansteigt. ZmPTI1b besitzt von den vier genannten PTI1-Kinasen aus Mais die höchste Ähnlichkeit zu *SIPTI1* (75% Identität auf Aminosäureebene). Zudem zeigten ZOU *et al.* (2006) eine Induktion der Expression von ZmPTI1 (ZmPTI1c) als Reaktion auf abiotische Stressoren in Wurzeln. Eine weitere PTI1-Kinase, ZmPTI1e, wurde in einer im Rahmen der vorliegenden Arbeit betreuten Bachelorarbeit identifiziert (REHDE 2010). ZmPTI1e zeigt, wie schon ZmPTI1a, eine auf reifen und keimenden Pollen begrenzte Expression, gruppiert im Gegensatz zu ZmPTI1a aber in Subfamilie I.

Während in Mais bisher fünf Gene von PTI1-Kinasen bekannt sind, konnten im vollständig sequenzierten Genom der dikotyledonen Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* elf PTI1-homologe Gene identifiziert werden (PINTO 2005). Die Vertreter der homologen PTI1-Kinasen aus *Arabidopsis* sind in allen drei Subfamilien zu finden.

Aufgrund der bisherigen Kenntnisse lassen sich die bisher untersuchten PTI1-Kinasen entweder zu den präferentiell in Pollen exprimierten PTI1-Kinasen oder zu den auf biotische und/oder abiotische Stressoren reagierenden PTI1-Kinasen gruppieren. Diese Daten untermauern die Hypothese von HERRMANN *et al.* (2006), dass PTI1-Kinasen an mindestens zwei sehr unterschiedlichen elementaren pflanzlichen Prozessen beteiligt sein könnten, der Pathogenabwehr und der Pollinierung.

NtPK1 und NtPK2 aus Tabak sowie OsRLCK1 aus Reis sind neben ZmPTI1a vorwiegend in Pollen exprimiert (DISSANAYAKE *et al.* 2004; KONG *et al.* 2007). Sowohl für die PTI1-Kinasen aus Tabak als auch für OsRLCK1 aus Reis wurde ebenfalls eine Rolle in Signalwegen während der Pollenkeimung und/oder des Pollenschlauchwachstums postuliert. KONG *et al.* (2007) konnten anhand eines Knockdowns von OsRLCK1 durch RNA-Interferenz, wie schon HERRMANN *et al.* (2006) bei dem Knockdown von ZmPTI1a, keine signifikante Veränderung der Pollenkeimung und des Pollenschlauchwachstums nachweisen. Die Autoren erklärten dies durch eine mögliche funktionelle Redundanz der RLCKVIII-Kinasefamilien in Reis.

AtPTI1-2 und AtPTI1-4 aus *Arabidopsis*, GmPTI1 aus Soja sowie OsPTI1a aus Reis konnten hingegen mit Reaktionen auf biotischen und/oder abiotischen Stress in Zusammenhang gebracht werden. Ein Anstieg der Aktivität bzw. der Transkriptmenge konnte für AtPTI1-2, AtPTI1-4 bzw. GmPTI1 nach Behandlung mit verschiedenen Stressoren wie z.B. Phosphatidylsäure (PA), Salicylsäure (SA), Xylanase, Cellulase, Flagellin, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und Verwundung nachgewiesen werden (ANTHONY *et al.* 2006; FORZANI *et al.* 2011; TIAN *et al.* 2004).

Im Gegensatz zu der postulierten positiven Regulation der HR durch SIPTI1 in Tabak (ZHOU *et al.* 1995) konnten TAKAHASHI *et al.* (2007) interessanterweise für OsPTI1a eine negative Regulierung von Abwehrsignalwegen für *R*-Gen vermittelte und basale Resistenz nachweisen. Die Komplementation des Phänotyps der *ospti1a* Nullmutante, Bildung spontaner Nekrosen, mit SIPTI1 lieferte den Hinweis für eine funktionelle Äquivalenz von SIPTI1 und OsPTI1a. TAKAHASHI *et al.* (2007) postulierten daher, dass sich der molekulare Schalter stromabwärts der Pathogenerkennung, der die HR kontrolliert, in der monokotyledonen Pflanze Reis im Vergleich zur dikotyledonen Pflanze Tomate unterschiedlich entwickelt hat.

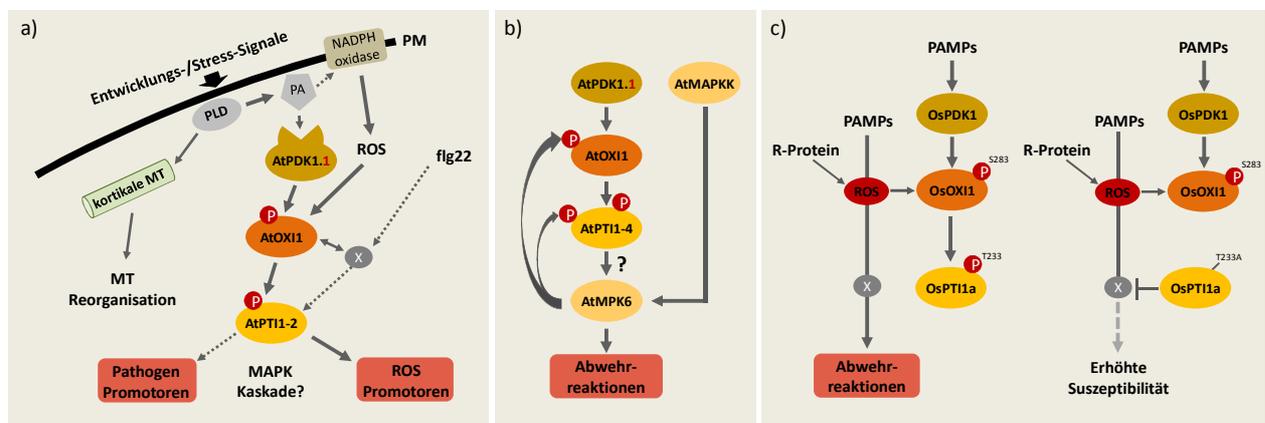
Während sich die meisten der PTI1-Kinasen von Mais, Reis, Tabak und Tomate nach ihrer präferentiellen Expression in Pollen bzw. Blätter einteilen lassen, liegen zu gewebespezifischen Expression der PTI1-Kinasen von *Arabidopsis* bislang kaum Informationen vor.

#### 2.5.4 Signalkaskaden mit Beteiligung von PTI1-Kinasen

Die Beteiligung von PTI1-Kinasen bei Phosphorylierungskaskaden konnten außer bei SIPTI1 aus Tomate noch für einige andere Vertreter der Proteinfamilie nachgewiesen werden. ANTHONY *et al.* (2006) identifizierten die PTI1-homologen Kinasen PTI1-1, PTI1-2 und PTI1-3 in einem Hefe-2-Hybrid-Ansatz als stromabwärtsgelegene Interaktionspartner von OXI1 aus *Arabidopsis*. Die Serin/Threonin-Kinase OXI1 (*oxidative signal inducible 1*, auch AGC2-1) ist eine durch oxidativen Stress (ROS) aktivierte AGC-Kinase, die unabdingbar für zwei unterschiedliche ROS-vermittelte Prozesse ist: Erstens für die basale Resistenz gegenüber *Hyaloperonospora arabidopsis* (früher bekannt als *Hyaloperonospora parasitica*) und zweitens für das Wurzelhaarwachstum (RENTEL *et al.* 2004). OXI1 konnte PTI1-1 und PTI1-2 *in vitro* phosphorylieren, nicht aber PTI1-3. Einen weiteren Hinweis auf eine gemeinsame Beteiligung an einer durch oxidativen Stress hervorgerufene Signalkaskade

von PTI1-2 und OXI1 gab die Beobachtung, dass beide Kinasen durch dieselben Stressoren bzw. Elicitoren (PA, Xylanase und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) erfolgen kann. Zusätzlich konnte PTI1-2 auch durch Flagellin-Behandlung aktiviert werden.

OXI1 sowie andere Mitglieder der AGC-Kinasen sind stromabwärts gelegene Komponenten der durch PA aktivierten Kinase PDK1.1 (*3-phosphoinositide-dependent kinase-1*), welche verschiedene Signalwege reguliert, wie z.B. das Wurzelhaarwachstum, Auxin-Regulation und Zelltod (ANTHONY *et al.* 2004; RENTEL *et al.* 2004; ZEGZOUTI *et al.* 2006b). PDK1.1 ist ebenfalls eine AGC-Kinase vom Serin/Threonin-Typ. ANTHONY *et al.* (2006) konnten zeigen, dass auf Ebene der PTI1-2 Kinase spezifische PDK1.1 und OXI1 vermittelte Lipid-abhängige- bzw. ROS-Signalwege zusammentreffen. Signale, die durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und Flagellin ausgelöst werden, werden durch einen PDK1-1-unabhängigen Weg, der nur durch OXI1 und PTI1-2 vermittelt wird, weitergeleitet. PTI1-2 integriert somit ROS- und Lipidvermittelte Signale aus unabhängigen Signalwegen und ist vermutlich direkter Interaktionspartner von OXI1. Zusätzlich zeigten RENTEL *et al.* (2004), dass OXI1 zur vollständigen Aktivierung der MAPKs (*mitogen-activated protein kinases*) MPK3 und MPK6 nach ROS- oder Elicitor-Behandlung notwendig ist. FORZANI *et al.* (2011) konnten zudem für OXI1 *in vivo* eine physische Interaktion mit PTI1-4 nachweisen.



**Abbildung 2-4: Schematische Darstellung der PTI1-Signalkaskaden in *Arabidopsis* und *Reis*.** Signalweg mit Beteiligung von **a)** AtPTI1-2 nach ANTHONY *et al.* (2006), **b)** von AtPTI1-4 nach FORZANI *et al.* (2011), modifiziert und **c)** von OsPTI1a nach MATSUI *et al.* (2010 a), modifiziert mit den Daten aus MATSUI *et al.* (2010 b).

Auch in Reis konnte eine Beteiligung der Kinase OsPTI1a an einer Signalkaskade mit OsPDK1 und OsOXI1 sowohl *in vitro* als auch *in planta* nachgewiesen werden (MATSUI *et al.* 2010 a; b). Es wird angenommen, dass die OsPDK1/OsOXI1-Phosphorylierungskaskade die

basale Resistenz der Pflanze positiv beeinflussen und durch Phosphorylierung von OsPTI1a durch OsOXI1 die Unterdrückung der HR aufgehoben werden könnte.

Aufgrund der vorliegenden Forschungsergebnisse scheint die PDK1-OXI1-PTI1 Signalkaskade in *Arabidopsis* und Reis evolutionär konserviert zu sein. Da AtPTI1-2 jedoch ein Positiv-Regulator der Pathogenresistenz ist (ANTHONY *et al.* 2006), während OsPTI1a als Negativ-Regulator agiert (TAKAHASHI *et al.* 2007; MATSUI *et al.* 2010 a; b), scheinen die Details der Mechanismen, die diese Signalwege regulieren von einander abzuweichen. Diese Daten bestätigen die Annahme von TAKAHASHI *et al.* (2007), dass sich der molekulare Schalter, der die HR kontrolliert, stromabwärts der Pathogenerkennung, in der Monokotyledone Reis im Vergleich zur Dikotyledone Tomate bzw. *Arabidopsis* unterschiedlich entwickelt hat. Jedoch deuten die Ergebnisse von HERRMANN *et al.* (2006) daraufhin, dass eine solche negative Regulation, wie sie für OsPTI1a gezeigt wurde, nicht für ZmPTI1b aus Mais, ebenfalls eine monokotyledone Pflanze, gilt.

## 2.6 Zielsetzung dieser Arbeit

Die Mitglieder der Serin/Threonin-Kinase PTI1 sind vermutlich an mindestens zwei elementaren entwicklungsbiologischen Prozessen beteiligt. Während z.B. die Serin/Threonin-Kinase SIPTI1 aus Tomate an einer Signalkaskade im Zuge der Pathogenabwehr beteiligt ist, scheinen ZmPTI1a aus Mais und weitere PTI1-Kinasen eine Funktion in der Signaltransduktion in Pollen zu besitzen (ZHOU *et al.* 1995; HERRMANN *et al.* 2006). Die genaue Funktion dieser Kinasen sowie die Identität von stromaufwärts und stromabwärts gelegenen Interaktionspartnern sind bislang größtenteils unbekannt.

Erstes Ziel der vorliegenden Arbeit war es, einen möglichst vollständigen Überblick über die Eigenschaften und Funktionen der PTI1-Kinasefamilie zu erhalten. Zu diesem Zweck wurde die PTI1-Familie der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* gewählt, um die analytischen Vorteile auf molekularer Ebene ausschöpfen zu können. Zunächst wurde eine funktionelle und biochemische Charakterisierung der gesamten PTI1-Genfamilie aus *Arabidopsis* angestrebt. Hierzu sollten die genomische Struktur, die Expressionsmuster, die subzellulären Lokalisationen sowie die Funktionalität der PTI1-Kinasen untersucht werden. Mit Hilfe dieser Daten sollte der Frage nachgegangen werden, ob es in *A. thaliana* auch *ZmPTI1a*-orthologe Gene gibt, deren Funktion ebenfalls in Prozessen der Pollinierung liegen könnte. Anhand von T-DNA-Insertionslinien der *AtPTI1*-Gene sollten dann mögliche Phänotypen hinsichtlich der biologischen Bedeutung einzelner Mitglieder der Kinasefamilie untersucht werden.

Das zweite Ziel dieser Arbeit bestand in der Identifizierung und biochemischen Charakterisierung möglicher stromaufwärts oder stromabwärts gelegener Interaktionspartner der *AtPTI1*-Kinasen. Hierbei sollten verschiedene Screening-Methoden und bioinformatische Ansätze angewendet werden.

## 3. Material und Methoden

### 3.1 Material

#### 3.1.1 Chemikalien, Enzyme, Radionukleotide

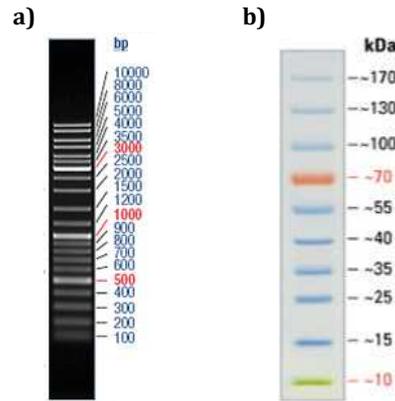
Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden mit dem Reinheitsgrad *zur Analyse* (p.A.) von folgenden Firmen bezogen: GE Healthcare (München), AppliChem (Darmstadt), Applied Biosystems (Darmstadt), Biomol (Hamburg), Biozym (Oldenburg), Duchefa (Haarlem, NL), Fluka (Neu-Ulm), Invitrogen (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), Qiagen (Hilden), Roche Diagnostics (Mannheim), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg), Sigma-Aldrich (München) und Stratagene (Heidelberg).

Die in dieser Arbeit verwendeten Enzyme wurden von Fermentas (St. Leon-Rot), clontech (Saint-Germain-en-Laye, Frankreich) und Invitrogen (Karlsruhe) bezogen.

Für die radioaktive Markierung von Proteinen wurde das Radionukleotid  $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ -ATP (3.000 Ci/mmol) von der Firma Hartmann Analytic (Braunschweig) verwendet.

#### 3.1.2 Größenstandards

Zur Bestimmung der Größen von elektrophoretisch aufgetrennten DNA-Fragmenten wurde der Größenstandard *GeneRuler™ DNA Ladder Mix* (Fermentas, St. Leon-Rot) mit einem Größenspektrum von 100 bp bis 10000 bp verwendet. Das Molekulargewicht von Proteinen wurde mit Hilfe der *PageRuler™ Prestained Protein Ladder* (Fermentas, St. Leon-Rot) mit einem Spektrum von 10 kDa bis 170 kDa bestimmt (Abbildung 3-1).



**Abbildung 3-1: Verwendete Größenstandards.** a) *GeneRuler™ DNA Ladder Mix* und b) *PageRuler™ Prestained Protein Ladder* (Fermentas, St. Leon-Rot).

### 3.1.3 Primer

Die in dieser Arbeit verwendeten Primer stammen von der Firma Sigma-Genosys (Steinheim) und wurden in DST-Qualität (*desalt*) verwendet. Es wurden 100  $\mu$ M Stammlösungen und 10  $\mu$ M Arbeitslösungen mit LiChrosolv®-Wasser angesetzt, die bei -20 °C gelagert wurden.

Eine Liste der in dieser Arbeit verwendeten Primer ist im Anhang A1 aufgelistet.

### 3.1.4 Reaktionskomplettausstattungen (Kits)

**Tabelle 3.1-1: Verwendete Reaktionskomplettausstattungen.**

Reaktionskomplettausstattung	Firma	Verwendung
<i>High-Speed Plasmid Mini Kit</i>	Avegene, Taiwan	Präparation von Plasmid-DNA (3.2.4.2)
<i>Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit</i>	Avegene, Taiwan	Elution von DNA-Fragmenten aus dem Agarosegel und Aufreinigung von PCR-Fragmenten
<i>TOPO® TA Cloning Kit</i>	Invitrogen, Niederlande	Klonierung von PCR-Fragmenten
<i>Zero Blunt® TOPO® PCR Cloning Kit</i>	Invitrogen, Niederlande	Klonierung von PCR-Fragmenten
<i>pGEM®-T Easy Vector Systems</i>	Promega, USA	Klonierung von PCR-Fragmenten

### 3.1.5 Vektoren

Tabelle 3.1-2: In dieser Arbeit verwendeten Vektoren.

Verwendung	Name	Ursprung
Klonierungsvektoren	<i>pCR<sup>®</sup>2.1.TOPO<sup>®</sup></i>	Invitrogen (Karlsruhe)
	<i>pCR<sup>®</sup>-Blunt II-TOPO<sup>®</sup></i>	Invitrogen (Karlsruhe)
	<i>pGEM<sup>®</sup>-T Easy</i>	Promega (USA)
Klonierung von <i>GFP</i> -Konstrukten	<i>35S-AB-M</i>	DNA Cloning Service (Hamburg)
	<i>Nos-AB-M</i>	DNA Cloning Service (Hamburg)
	<i>35S:GFPII</i>	BRYLKA (2002)
Klonierung von <i>GUS</i> -Konstrukten	<i>GUS-BA-M</i>	DNA Cloning Service (Hamburg)
Binärer Expressionsvektor	<i>p7N-35S</i>	DNA Cloning Service (Hamburg)
	<i>7P-Nos</i>	DNA Cloning Service (Hamburg)
<i>E. coli</i> -Expressionsvektoren	<i>pet30a</i>	Novagen, Merck (Schwalbach)
	<i>pet41b(+)</i>	Novagen, Merck (Schwalbach)

Die im Rahmen dieser Arbeit hergestellten Vektoren sind unter 3.3 beschrieben.

### 3.1.6 Bakterienstämme

Tabelle 3.1-3: Vewendete Bakterienstämme

Organismus	Stamm	Genotyp	Quelle
<i>E. coli</i>	<i>XL1-blue</i> <i>MRF' tet<sup>R</sup></i>	$\Delta(mcrA)183 \Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1$ <i>supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac [F' proAB</i> <i>lacIqZ \Delta M15Tn10 (Tet<sup>R</sup>)]</i>	Stratagene (Heidelberg)
<i>E. coli</i>	<i>XL1-blue</i> <i>MRF' kan<sup>R</sup></i>	$\Delta(mcrA)183 \Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1$ <i>supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac [F' proAB</i> <i>lacIqZ \Delta M15 Tn5 (Kan<sup>R</sup>)]</i>	Stratagene (Heidelberg)
<i>E. coli</i>	<i>GM2163</i>	<i>F- dam-13::Tn9 (Cam<sup>R</sup>) dcm-6 hsdR2 (r<sub>k</sub><sup>-</sup>m<sub>k</sub><sup>+</sup>) leuB6</i> <i>hisG4 thi 1 araC14 lacY1 galk2 galT22 xylA5 mtl-1</i> <i>rpsL136 (Str<sup>R</sup>) fhuA31 tsx-78 glnV44 mcrA mcrB1</i>	Fermentas (St. Leon-Rot)
<i>E. coli</i>	<i>BL21</i> <i>Rosetta</i> <i>(DE3)</i>	<i>F- ompT hsdS<sub>B</sub>(R<sub>B</sub> m<sub>B</sub>) gal dcm \lambda(DE3 [lacI lacUV5-</i> <i>T7 gene 1 ind1 sam7 nin5]) pLysSRARE (Cam<sup>R</sup>)</i>	Novagen, Merck Biosciences (Schwalbach)
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	<i>GV3101</i>	<i>C58C1 Rif<sup>R</sup>, pMP90RK kan<sup>R</sup> gent<sup>R</sup></i>	LAREBEKE <i>et al.</i> (1974), KONCZ & SCHELL (1986)

### 3.1.7 Pflanzen

Tabelle 3.1-4: In dieser Arbeit verwendete Pflanzen.

Pflanzen	Linie	Herkunft
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Ökotyp Col-0	Zur Verfügung gestellt von M. Sauter, Universität zu Kiel
	SALK_086563 (PTI1-1)	ALONSO <i>et al.</i> (2003)
	SALK_013712 (PTI1-1)	ALONSO <i>et al.</i> (2003)
	SALK_095719 (PTI1-3)	ALONSO <i>et al.</i> (2003)
	GK_382G05 (PTI1-3)	Rosso <i>et al.</i> (2003)
	SALK_064325 (PTI1-4)	ALONSO <i>et al.</i> (2003)
	FLAG_325B10 (PTI1-5)	(Sessions u. a. 2002)
	SALK_094451 (PTI1-7)	ALONSO <i>et al.</i> (2003)
	SALK_1113251 (PDK1.1)	ALONSO <i>et al.</i> (2003)
	SAIL_450_B01 (PDK1.2)	
	SALK_1113251 (PDK1.1)/ SAIL_450_B01 (PDK1.2)	Zur Verfügung gestellt von I. Camehl, Universität Jena
	SALK_073610 (AGC1-5)/ SAIL_151_B12 (AGC1-7)	Zur Verfügung gestellt von S. McCormick, University of California, Berkleyl
<i>Allium fistulosum</i>		Supermarkt

Tabelle 3.1-5: Im Rahmen dieser Arbeit hergestellte transgene Pflanzen.

Pflanze	Ursprungs- linie	Transformation mit	Ursprung
PTI1-1 <sub>Pro</sub> :GUS	Col-0	PTI1-1 <sub>Pro</sub> :GUS-Vektor	diese Arbeit, K. Müller <sup>3</sup>
PTI1-2 <sub>Pro</sub> :GUS	Col-0	PTI1-2 <sub>Pro</sub> :GUS-Vektor	diese Arbeit
PTI1-3 <sub>Pro</sub> :GUS	Col-0	PTI1-3 <sub>Pro</sub> :GUS-Vektor	WITTFOTH (2009)
PTI1-4 <sub>Pro</sub> :GUS	Col-0	PTI1-4 <sub>Pro</sub> :GUS-Vektor	SCHMIDT (2009)
PTI1-5 <sub>Pro</sub> :GUS	Col-0	PTI1-5 <sub>Pro</sub> :GUS-Vektor	diese Arbeit
PTI1-6 <sub>Pro</sub> :GUS	Col-0	PTI1-6 <sub>Pro</sub> :GUS-Vektor	SCHMIDT (2009)
PTI1-7 <sub>Pro</sub> :GUS	Col-0	PTI1-7 <sub>Pro</sub> :GUS-Vektor	WITTFOTH (2009)
PTI1-8 <sub>Pro</sub> :GUS	Col-0	PTI1-8 <sub>Pro</sub> :GUS-Vektor	diese Arbeit, K. Müller
PTI1-9 <sub>Pro</sub> :GUS	Col-0	PTI1-9 <sub>Pro</sub> :GUS-Vektor	diese Arbeit, K. Müller

<sup>3</sup> Biozentrum Klein Flottbek, Universität Hamburg

Fortsetzung von Tabelle 3.1-5: Im Rahmen dieser Arbeit hergestellte transgene Pflanzen.

<i>LAT52<sub>Pro</sub>:PTI1-3:GFP</i>	<i>Col-0</i>	<i>LAT52<sub>Pro</sub>:PTI1-3:GFP-Vektor</i>	<i>WITTFOTH (2009)</i>
<i>LAT52<sub>Pro</sub>:PTI1-5:GFP</i>	<i>Col-0</i>	<i>LAT52<sub>Pro</sub>:PTI1-5:GFP-Vektor</i>	<i>diese Arbeit</i>
<i>LAT52<sub>Pro</sub>:PTI1-6:GFP</i>	<i>Col-0</i>	<i>LAT52<sub>Pro</sub>:PTI1-6:GFP-Vektor</i>	<i>SCHMIDT (2009)</i>
<i>35S<sub>Pro</sub>:PTI1-2:GFP</i>	<i>Col-0</i>	<i>35S<sub>Pro</sub>:PTI1-2:GFP-Vektor</i>	<i>diese Arbeit</i>
<i>35S<sub>Pro</sub>:PTI1-4:GFP</i>	<i>Col-0</i>	<i>35S<sub>Pro</sub>:PTI1-4:GFP-Vektor</i>	<i>SCHMIDT (2009)</i>
<i>35S<sub>Pro</sub>:PTI1-7:GFP</i>	<i>Col-0</i>	<i>35S<sub>Pro</sub>:PTI1-7:GFP-Vektor</i>	<i>WITTFOTH (2009)</i>
<i>35S<sub>Pro</sub>:PTI1-8:GFP</i>	<i>Col-0</i>	<i>35S<sub>Pro</sub>:PTI1-8:GFP-Vektor</i>	<i>diese Arbeit, K. Müller</i>
<i>35S<sub>Pro</sub>:PTI1-9:GFP</i>	<i>Col-0</i>	<i>35S<sub>Pro</sub>:PTI1-9:GFP-Vektor</i>	<i>diese Arbeit, K. Müller</i>

### 3.1.8 Lösungen und Medien

Die Herstellung aller Lösungen und Medien erfolgte mit Wasser, das über eine Millipore Milli-Q Plus Aufbereitungsanlage (Millipore, Billerica, USA) bis zur Qualität *aqua bidest* aufgereinigt wurde. Dies wird im Folgenden als H<sub>2</sub>O bezeichnet. Um Lösungen und Medien zu sterilisieren, wurden diese entweder für 20 min bei 121 °C und einem Druck von 2 · 10<sup>5</sup> Pa autoklaviert oder durch einen Sterilfilter mit einer Ausschlussgröße von 0,22 µm oder 0,45 µm filtriert.

#### 3.1.8.1 Lösungen

Die in dieser Arbeit verwendeten Puffer und Lösungen sowie deren Zusammensetzung sind mit Ausnahme der Folgenden im Methodenteil beschrieben.

##### MES-Puffer (20x)

(Laufpuffer SDS-PAGE)

50 mM 2-(N-morpholino)ethansulfonsäure

20 mM Tris Base

0,1 % SDS

1 mM EDTA

pH 7,3

**MOPS-Puffer (20x)**  
(Laufpuffer SDS-PAGE)

50 mM 3- Morpholinopropansulfonsäure  
50 mM Tris Base  
0,1 % SDS  
1 mM EDTA  
pH 7,7

**TAE (50x)**  
(Agarosegelelektrophorese)

2 M Tris-Acetat  
100 mM EDTA pH 8,0

**X-Gluc Färbepuffer**  
(Histochemischer GUS-Assay)

50 mM NaPO<sub>4</sub>-Puffer pH 7,0  
0,5 mM K-Ferrocyanid  
0,5 mM K-Ferricyanid  
10 mM EDTA  
0,1 % Triton-X

**X-Gluc-Lösung**

100 mg X-Gluc  
in 1 ml DMF

Zur Herstellung von gebrauchsfertiger X-Gluc-Färbelösung 1 ml X-Gluc-Lösung zu 200 ml Färbepuffer geben.

### 3.1.8.2 Medien

**LB-Medium**  
(*E. coli*-Nährmedium)

10 g Caseinhydrolysat  
5 g Hefeextrakt  
10 g NaCl  
(für Platten: 15 g Agar)  
ad 1 l H<sub>2</sub>O  
pH 7,4

<b>YEP-Medium</b>	10 g Hefeextrakt
<i>(Agrobakterien-Nährmedium)</i>	10 g Pepton
	5 g NaCl
(für Platten:	19 g Agar)
	ad 1 l H <sub>2</sub> O
	pH 7,5

Die Medien wurden zur Selektion bestimmter Bakterien mit einem oder mehreren der folgenden Antibiotika in den angegebenen Konzentrationen versetzt:

100 mg/l	Ampicillin
34 mg/l	Chloramphenicol
30 mg/l	Gentamycin
30 bzw. 50 mg/l	Kanamycin
100 mg/l	Spectinomycin

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Anzucht von *Arabidopsis thaliana*

Die Anzucht von *Arabidopsis*-Pflanzen erfolgte auf einem Gemisch aus gleichen Teilen Sand und Einheitserde. Die Pflanzen wurden in einer Phytokammer unter Langtagbedingungen (16 h Licht / 8 h Dunkelheit) mit einer Lichtintensität von 150  $\mu\text{E m}^{-2}\text{sec}^{-2}$  bei 22-24 °C mit einer Luftfeuchtigkeit von 60-70 % angezogen.

#### 3.2.1.1 *In vitro* Pollenkeimung von *Arabidopsis* Pollen

*Arabidopsis* Pollen wurde von neu geöffneten Blüten isoliert und auf Pollenkeimungsmedium nach Li *et al.* (1999) (1 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 1 mM MgSO<sub>4</sub>, 0,01 % (w/v) H<sub>3</sub>BO<sub>2</sub>, 18 % (w/v) Saccharose, 0,5 % (w/v) Agar, pH 7,0) ausgelegt. Die Platten bzw. Objektträger wurden bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert.

## 3.2.2 Mikrobiologische Methoden

### 3.2.2.1 Kultivierung und Lagerung von *E. coli*

*E. coli*-Zellen wurden nach SAMBROOK *et al.* (1989) in LB-Medium bei 37 °C angezogen. Übernachtkulturen wurden zur Plasmid-Isolation (3.2.4.2), zum Animpfen von größeren Kulturvolumina für die Überexpression von rekombinanten Proteinen (3.2.5.1) oder für die Herstellung kompetenter Zellen (3.2.2.2) in 4 ml LB-Medium im Reagenzglas bei 37 °C und 170 rpm im Schüttler angezogen. Größere Kulturen wurden in Erlenmeyerkolben mit zehnfachem Volumen der Kultur angezogen. Die Selektion bestimmter Bakterienstämme oder transformierter Bakterien erfolgte durch Zugabe von Antibiotika zum LB-Medium in empfohlener Konzentration (3.1.8.2). Zur kurzzeitigen Lagerung von Bakterienkolonien wurden Bakterien auf LB-Agarplatten bei 4 °C aufbewahrt. Gefrierkulturen wurden für eine langfristige Lagerung hergestellt. Dazu wurden Flüssigkulturen mit Glycerol versetzt (15 % Endkonzentration), in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Die Zelldichte von Flüssigkulturen wurde, falls erforderlich, durch die Messung der Trübung bei einer Wellenlänge von 600 nm ( $OD_{600}$ ) in einem Spektralphotometer bestimmt.

### 3.2.2.2 Herstellung chemisch kompetenter Bakterienzellen

Für die Herstellung von chemisch kompetenten *E. coli*-Bakterienzellen wurden 50 ml LB-Medium mit entsprechenden Antibiotika in einem 500 ml Erlenmeyerkolben mit 800 µl einer Vorkultur angeimpft. Die Bakterienzellen wurden bis zum Erreichen einer  $OD_{600}$  von 0,5 bis 0,8 bei 37 °C und 170 rpm im Schüttelinkubator angezogen und anschließend auf Eis abgekühlt. Nach Sedimentation der Bakterienzellen (5 min, 4 °C, 5000 rpm) wurde der Überstand verworfen und die Zellen auf Eis in 10 ml kaltem  $MgCl_2$  (0,1 M) vorsichtig resuspendiert. Nach erneuter Sedimentation (5 min, 4 °C, 5000 rpm) wurden die Zellen in 20 ml kaltem  $CaCl_2$  (0,1 M) abermals vorsichtig auf Eis resuspendiert und 30 sec auf Eis geschüttelt, gefolgt von einer weiteren Zentrifugation (5 min, 4 °C, 5000 rpm). Der Überstand wurde dekantiert und das Pellet wurde auf Eis vorsichtig in 3,2 ml kaltem  $CaCl_2$  (0,1 M) und 800 µl 50 % Glycerol gründlich resuspendiert. Nach Anfertigen von 50 µl Aliquots wurden die Bakterien in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

### 3.2.2.3 Transformation chemisch kompetenter Bakterienzellen

Zu 50 µl chemisch kompetenten Bakterienzellen (3.2.2.2), auf Eis aufgetaut, wurden 25 µl TCM-Puffer (1 mM Tris-HCl pH 7,5, 50 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub>) und 0,5 µl Plasmid-DNA bzw. 10-20 µl Ligationsansatz gegeben. Nach 30-minütiger Inkubation auf Eis folgte ein Hitzeschock bei 42 °C im Wasserbad für 35 sec. Anschließend wurden die Zellen sofort für 5 min auf Eis gekühlt, zur Regeneration mit 200 µl LB-Medium versetzt und für 1 h bei 37 °C und 170 rpm inkubiert. Nach dieser Regenerationsphase wurden die transformierten Zellen auf Selektionsmedium (LB-Agarplatten mit entsprechenden Antibiotika) ausgestrichen und bei 37 °C über Nacht inkubiert.

### 3.2.3 Molekularbiologische Methoden

Die in dieser Arbeit angewandten molekularbiologischen Standardmethoden wurden nach SAMBROOK *et al.* (1989) durchgeführt. Bei der Verwendung von molekularbiologischen Kits wurde in der Regel nach Herstellerangaben verfahren.

### 3.2.4 Analyse von Nukleinsäuren

#### 3.2.4.1 Allgemeine Klonierungstechniken

Das zu klonierende DNA-Fragment wurde mittels PCR (3.2.4.5) amplifiziert oder durch Restriktion von Plasmid-DNA gewonnen. Nachdem in der Agarosegelelektrophorese die richtige Fragmentgröße verifiziert werden konnte, wurde das Fragment mittels eines *Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit* der Firma Avescove (Taipei, Taiwan) aus dem Gel eluiert. Die Klonierung amplifizierter PCR-Produkte zwecks *in vivo* Fragment-Amplifikation und -Sequenzierung erfolgte entweder in den Vektor *pCR<sup>®</sup>2.1.TOPO<sup>®</sup>* unter Anwendung des *TOPO<sup>®</sup>TA Cloning Kits* (Invitrogen, Niederlande), in den Vektor *pCR<sup>®</sup>-Blunt II-TOPO<sup>®</sup>* unter Anwendung des *Zero Blunt<sup>®</sup> TOPO<sup>®</sup> PCR Cloning Kits* (Invitrogen, Niederlande) oder in den Vektor *pGEM<sup>®</sup>-T Easy* unter Anwendung des *pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vector Systems* (Promega, USA). Die nachfolgende Restriktion des DNA-Fragments und des Zielvektors mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen erfolgte laut Herstellerangaben. Um eine Religation des Zielvektors zu verhindern, wurde die Vektor-DNA im Anschluss an die Restriktion mit einer Thermosensitiven alkalischen Phosphatase, der FastAP™ (Fermentas,

St. Leon-Rot) dephosphoryliert. Die auf diese Weise präparierten Fragmente wurden in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und im Anschluss eluiert. Die aufgereinigten DNA-Fragmente wurden unter Verwendung der *T4-DNA Ligase* (Fermentas, St. Leon-Rot) ligiert und in chemokompetente *E. coli*-Zellen (3.2.2.2) transformiert. Alle klonierten DNA-Fragmente wurden nach Plasmid-Isolierung (3.2.4.2) durch Restriktionsanalyse und Sequenzierung (3.2.4.8) verifiziert.

### 3.2.4.2 Präparation von Plasmid-DNA

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*-Zellen im Minimaßstab erfolgte unter Verwendung des *High-Speed Plasmid Mini Kit* der Firma Avegene (Taipei, Taiwan). Zur Gewinnung von hochqualitativer Plasmid-DNA wurde der *Plasmid Midi Kit* (Avegene, Taipei, Taiwan) verwendet.

### 3.2.4.3 Isolierung von genomischer DNA aus Pflanzen

Die Isolierung von genomischer DNA (gDNA) zur Genotypisierung aus *Arabidopsis thaliana* erfolgte nach VEJLUPKOVA UND FOWLER (2003).

Etwa 20 mg Rosettenblätter wurden in ein gekühltes 1,5 ml Reaktionsgefäß mit 200 µl kaltem Extraktionspuffer (2 M NaCl, 200 mM Tris-HCl pH 8,0, 70 mM EDTA pH 8,0, 20 mM Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, 0,5 % N-Lauroylsarcosin) gegeben und für 30 sec im Heidolph-Mixer (RZR 2051, Heidolph, Schwabach) bei maximaler Geschwindigkeit homogenisiert. Anschließend wurde die Probe für 1 h bei 95 °C denaturiert und die Gewebetrümmer durch Zentrifugation (15 min, 4 °C, 14000 *xg*) pelletiert. Der Überstand wurde zur Fällung der DNA mit 1 x Volumen 5 M Ammoniumacetat und 2 x Volumen Isopropanol versetzt, für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend zentrifugiert (5 min, RT, 9400 *xg*). Das Präzipitat wurde mit 170 µl 70 % Ethanol gewaschen und nach kurzem Trocknen bei 30-55 °C in 100 µl H<sub>2</sub>O gelöst. In der anschließenden PCR (3.2.4.5) wurden je 10 µl gDNA eingesetzt.

### 3.2.4.4 Isolierung von Gesamt-RNA

Die Gesamt-RNA aus verschiedenen Pflanzengeweben von *Arabidopsis thaliana* wurde entweder mit der „Trizol-Methode“ nach dem Protokoll von CHOMCZYNSKI UND SACCHI (1987) oder nach der von KLUTH *et al.* (2002) beschriebenen Methode extrahiert. Die Konzentration und Reinheit der RNA wurde photometrisch bestimmt und die Qualität im Agarosegel (3.2.4.6) überprüft. Die Gesamt-RNA wurde bei -80 °C gelagert.

### 3.2.4.5 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Zur Amplifikation eines bestimmten DNA-Fragments wurde eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR) mit spezifischen Primern unter der Verwendung von *Taq*-Polymerase (Fermentas, St. Leon-Rot), *Pfu*-Polymerase (Fermentas, St. Leon-Rot) oder *Advantage*<sup>®</sup> 2 *Polymerase Mix* (Clontech, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich) durchgeführt. Als Template wurde Plasmid-DNA, gDNA oder cDNA verwendet. Die 50 µl Reaktionsansätze setzten sich standardmäßig wie folgt zusammen (Abweichungen s. u.):

#### ***Taq*- und *Pfu*-Polymerase Ansatz *Advantage*<sup>®</sup> 2 *Polymerase Mix* Ansatz**

x µl	Template	x µl	Template
5 µl	<i>Taq</i> -Puffer (10 x) + KCl	5 µl	<i>Advantage</i> -Puffer (10 x)
	<i>Pfu</i> -Puffer (10 x) + MgSO <sub>4</sub>	2 µl	dNTPs (10 mM je dNTP)
6 µl	MgCl <sub>2</sub> (25 mM) nur bei <i>Taq</i>	2,5 µl	5'-Primer (10 µM)
2 µl	dNTPs (10 mM je dNTP)	2,5 µl	3'-Primer (10 µM)
1 µl	DMSO	0,5 µl	<i>Advantage</i> <sup>®</sup> 2 Polymerase Mix
2,5 µl	5'-Primer (10 µM)	ad 50 µl	H <sub>2</sub> O
2,5 µl	3'-Primer (10 µM)		
0,5 µl	<i>Taq</i> - bzw. <i>Pfu</i> -Polymerase		

Alle PCR-Programme leiteten sich von dem folgenden Schema ab:

Denaturierung	94 °C	3 min		25-35 Zyklen
Denaturierung	94 °C	1 min		
Primer-Annealing	50-60 °C	1 min		
Elongation	72 °C	0,5-3 min		
Abschluss-Elongation	72 °C	10 min		

Die PCR wurde in einem *TRIO*-Thermozykler der Firma Whatman-Biometra (Göttingen) durchgeführt. Die Elongationszeit richtete sich nach der Länge des zu amplifizierenden DNA-Fragments und lag bei 60 sec/kb (*Taq*-Polymerase, *Advantage*<sup>®</sup> 2 *Polymerase Mix*) bzw. 60-120 sec/kb (*Pfu*-Polmerase). Die optimalen Bedingungen für eine PCR wurden durch Variieren der MgCl<sub>2</sub>-Konzentration, DNA-Konzentration, Primer-*Annealing*-Temperatur und Zyklenzahl abgeleitet.

#### *FailSafe-PCR*

Um die PCR-Bedingungen für schwer zu amplifizierende DNA-Fragmente zu verbessern, wurde die PCR durch die Verwendung von 15 verschiedenen PCR-Puffern (2x konzentriert) mit unterschiedlichen Konzentrationen an Betain und MgCl<sub>2</sub>, in Anlehnung an den *FailSafe*<sup>™</sup> *PCR Selection Kit* (BIOzym Diagnostics GmbH, Oldendorf) optimiert.

#### *PCR zur Genotypisierung von Arabidopsis thaliana*

Für den PCR-Reaktionsansatz zur Bestimmung des Genotyps von *A. thaliana* wurden als Template 10 µl gDNA (3.2.4.3) eingesetzt sowie eine doppelte MgCl<sub>2</sub>-Konzentration.

### **3.2.4.6 Agarose-Gelelektrophorese**

Die Analyse und größenabhängige Auftrennung von DNA- und RNA-Fragmenten erfolgte mittels horizontaler Gelelektrophorese (SAMBROOK *et al.* 1989) im ethidiumbromidhaltigen Agarose-Gel (0,8-2,0% (w/v) Agarose in 1 x TAE-Puffer, 0,1 µg/ml Ethidiumbromid). Mit Hilfe eines Transilluminators mit angeschlossener, digitaler Videokamera (Gene Genius, Syngene, UK) und einem Videoprinter (Mitsubishi P93DW) wurde die Auftrennung dokumentiert.

### **3.2.4.7 Reverse Transkription von RNA**

Die Reverse Transkription, d.h. die Synthese von cDNA, welche komplementär ist zur mRNA, wurde unter Verwendung der RevertAid<sup>™</sup> H Minus M-MuLV Reverse Transkriptase (Fermentas, St. Leon-Rot) durchgeführt. Dazu wurde die Gesamt-RNA (3.2.4.4) zunächst mit RNase-freier DNase I (Fermentas, St. Leon-Rot) nach Angaben des Herstellers behandelt, um

mögliche DNA-Verunreinigungen zu entfernen. Der 100 µl-Reaktionsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

1 µg	Gesamt RNA
20 µl	5 x M-MuLV-RT Puffer
2 µl	dNTPs (10 mM je dNTP)
1 µl	DTT (1 M)
2 µl	Oligo-dT-Primer oder genspezifischer Primer (10 µM)
1 µl	RiboLock™ RNase Inhibitor (40 U/µl)
0,5 µl	ReverseAid™ Minus M-MuLV Reverse Transkriptase (200 U/µl)
ad 100 µl	H <sub>2</sub> O

Die Reverse Transkription erfolgte für 75 min bei 42 °C mit anschließender Hitzeinaktivierung des Enzyms für 10 min bei 72 °C in einem *TRIO*-Thermozykler (Whatman-Biometra, Göttingen).

Zur Untersuchung der Expression und Klonierung bestimmter Gene wurden 10 µl der cDNA als Template für PCR-Reaktionen mit Primern (s. Anhang A1) für das entsprechende Transkript bzw. Gen eingesetzt.

#### **3.2.4.8 Sequenzierungen**

Sämtliche Sequenzierungen wurden entweder von der Firma DNA Cloning Service (Hamburg) oder von Eurofins MWG Operon (Ebersberg) durchgeführt.

#### **3.2.4.9 Computergestützte Sequenzanalysen**

Zur Auswertung, Analyse, Edition und zum Vergleich von Sequenz- und Expressionsdaten wurden die in Tabelle 3.2-1 aufgelisteten Programme und Internetseiten verwendet.

**Tabelle 3.2-1: In dieser Arbeit verwendete Programme und Internetseiten.**

<i>FinchTV</i>	Geospiza Inc., Seattle	Auswertung von Sequenzierungen
<i>Nebcutter V2.0</i>	New England Biolabs, Frankfurt am Main	Analyse von DNA-Sequenzen hinsichtlich Restriktionsschnittstellen
<i>Reverse complement</i>	STOTHARD (2000)	Sequenzbearbeitung
<i>NCBI BLAST</i>	MCGINNIS & MADDEN (2004)	Datenbank, Sequenzvergleich
<i>ExpASy Proteomics Server</i>	GASTEIGER <i>et al.</i> (2003)	<i>Bioinformatic Ressource Portal</i>
<i>eFP-Browser „Arabidopsis electronic Fluorescent Protein Browser“</i>	WINTER <i>et al.</i> (2007)	<i>A. thaliana</i> Datenbank für Expressionsmuster
<i>TAIR</i>	SWARBRECK <i>et al.</i> (2007)	<i>A. thaliana</i> Datenbank
<i>Genedoc</i>	NICHOLAS & NICHOLAS (1997)	Alignment-Darstellung
<i>ClustalX2</i>	LARKIN <i>et al.</i> (2007)	Alignment-Darstellung
<i>Treeview</i>	PAGE <i>et al.</i> (1996)	Erstellung von phylogenetischen Bäumen
<i>t-DNA Express</i>	ALONSO <i>et al.</i> (2003)	<i>A. thaliana</i> Datenbank und Gen-Kartierung
<i>ImageJ</i>	<a href="http://rsb.info.nih.gov/ij">http://rsb.info.nih.gov/ij</a>	<i>Bildbearbeitungsprogramm</i>
<i>Est Profile</i>	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/unigene">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/unigene</a>	Expressionsdatenbank basierend auf ESTs

### 3.2.5 Analyse von Proteinen

#### 3.2.5.1 Überexpression rekombinanter Proteine in *E. coli*

Die Überexpression rekombinanter Proteine erfolgte im *E. coli* Stamm Rosetta(DE3) mit dem *pET30a(+)*- oder *pET41b(+)*-System (Novagen, Merck, Darmstadt).

Mit einer frisch transformierten Rosetta-Kolonie wurde eine 4 ml LB-Vorkultur angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 170 rpm angezogen. 400 ml LB-Medium wurden wiederum mit der Vorkultur angeimpft und bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5 bis 0,8 bei 37 °C und 170 rpm angezogen. Um die Expression der rekombinanten Proteine zu induzieren, wurde die Bakterienkultur mit 1 mM IPTG versetzt und weitere 3 h bei 37 °C und 170 rpm inkubiert.

Im Anschluss wurde die Bakterienkultur aliquotiert und die Bakterien durch Zentrifugation (3 min, 4 °C, 5000 rpm) sedimentiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen und das Zellsediment bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

### 3.2.5.2 Native Aufreinigung rekombinanter His-Tag-Proteine aus *E. coli*

Die Aufreinigung rekombinanter His-Tag-Fusionsproteine erfolgte entweder mit *Ni-NTA Agarose* (Qiagen, Hilden) oder, wenn im Anschluss ein Kinase-Assay durchgeführt wurde, mit *Ni-NTA Magnetic Agarose Beads* (Qiagen, Hilden) in Anlehnung an den QIAexpressionist™ (Qiagen, 2003).

Rosetta-Zellen aus 50 ml Expressionskultur (3.2.5.1) wurden auf Eis aufgetaut und in 1 ml His-Lysispuffer (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 8, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol, 10 mM β-Mercaptoethanol, 1 mM PMSF, 0,05 % (v/v) Tween®20) resuspendiert. Nach der Zugabe von 1 mg pro ml Lysozym wurden die Zellen kurz gevortext und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte der Aufschluss der Bakterienzellen mit einem Branson Sonifier 250 (Hannover) für 10 sec bei 20-30 Watt Ausgangsleistung auf Eis. Das Proteinlysate wurde durch eine 30-minütige Zentrifugation bei 4 °C und 15000 *xg* geklärt und nach Zugabe von 30 µl *Ni-NTA Agarose* bzw. 50 µl *Ni-NTA Magnetic Agarose Beads* für eine Stunde bei 4 °C im Rotationsinkubator bei niedriger Geschwindigkeit inkubiert. Im Anschluss wurde die Agarose Matrix pelletiert (1 min, 4 °C, 1000 *xg*) bzw. die Magnetpartikel abgetrennt und das Gesamtproteinlysate entfernt. Die Matrix/Magnetpartikel wurden dreimal mit 1 ml His-Waschpuffer (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 8,0, 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol, 10 mM β-Mercaptoethanol, 1 mM PMSF, 0,05 % (v/v) Tween®20) gewaschen. Das an die *Ni-NTA Agarose* gebundene rekombinante Protein wurde mit 15 µl 1 x SDS-Probenpuffer (63 mM Tris-HCl pH 6,8, 10 % (v/v) Glycerol, 2 % (w/v) SDS, 0,01 % (w/v) Bromphenolblau, 710 mM β-Mercaptoethanol) versetzt und bis zur Auftrennung im SDS-Polyacrylamidgel (3.2.5.6) bei -20 °C gelagert. Das an die Magnetpartikel gebundene rekombinante Protein wurde nach Entfernen des His-Waschpuffers für einen Phosphorylierungsassay (3.2.5.5.1) oder einen Interaktions-Kinase-Assay eingesetzt (3.2.5.5.2).

### 3.2.5.3 Aufreinigung rekombinanter GST-Tag-Proteine aus *E. coli*

Die Aufreinigung rekombinanter GST-Tag-Fusionsproteine erfolgte mit *GST•Bind™ Resin* (Novagen, Merck Darmstadt) aus 75 ml Expressionskultur (3.2.5.1). Die Rosetta-Zellen der Expressionskultur wurden auf Eis aufgetaut und mit 1,5 ml 1 x PBS-Puffer (140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,3) sowie 10 mM β-Mercaptoethanol und 1 mM PMSF resuspendiert. Nach der Zugabe von 1 mg pro ml Lysozym wurden die Zellen 30 min auf Eis inkubiert und anschließend 10 sec bei 20- 30 Watt Ausgangsleistung mit einem Branson Sonifier 250 (Hannover) aufgeschlossen. Im Anschluss wurde das geklärte Proteinlysate (15 min, 4 °C, 15000 *xg*) mit 75 µl *GST•Bind™ Resin* versetzt. Nach 2-stündiger Inkubation bei 4° C im Rotationsinkubator bei langsamer Rotation wurde die *GST•Bind™ Resin* pelletiert (1 min, 4 °C, 1000 *xg*) und das Gesamtproteinlysate entfernt. Die Matrix wurde fünfmal mit 1,5 ml 1 x PBS-Puffer gewaschen. Anschließend wurden die an die Matrix gebundenen rekombinanten Proteine nach Entfernen des 1 x PBS-Puffers in ein GST-*Pulldown*-Experiment (3.2.5.4) eingesetzt oder mit 40 µl 1 x SDS-Probenpuffer versetzt und bis zur Auftrennung im SDS-Polyacrylamidgel (3.2.5.6) bei -20 °C gelagert.

### 3.2.5.4 GST-*Pulldown*

Um eine mögliche Interaktion zwischen einem rekombinanten GST-Tag-Protein und einem rekombinanten His-Tag-Protein nachzuweisen, wurde ein GST-*Pulldown* nach ZEGZOUTI *et al.* (2006b) durchgeführt. Das rekombinante GST-Protein wurde zunächst wie schon unter 3.2.5.3 beschrieben aufgereinigt. Die Zellen der His-Tag-Expressionskultur wurden mit Binding-Buffer (50 mM TrisHCl pH 6,8, 200 mM NaCl, 0,1 % (v/v) Tween®20, 10 mM β-Mercaptoethanol, 1 mM PMSF) und 1 mg pro ml Lysozym versetzt und für 30 min auf Eis inkubiert. Zum vollständigen Aufbruch der Zellwände wurden die Zellen mit einem *Branson Sonifier 250* (Hannover) für 10 sec bei 20-30 Watt Ausgangsleistung sonifiziert. Das geklärte Proteinlysate (15 min, 4° C, 15000 *xg*) wurde im Anschluss zu den, an die *GST•Bind™ Resin* gebundenen GST-Tag-Proteinen, gegeben. Nach 2-stündiger Inkubation bei 4° C im Rotationsinkubator bei langsamer Rotation wurde die *GST•Bind™ Resin* pelletiert (1 min, 4° C, 1000 *xg*) und das Gesamtproteinlysate entfernt. Die Matrix wurde fünfmal mit 1 ml 1 x Binding-Buffer gewaschen. Anschließend wurden die an die Matrix gebundenen rekombinanten Proteine mit 40 µl 1 x SDS-Probenpuffer versetzt und bis zur Auftrennung im SDS-Polyacrylamidgel (3.2.5.6) bei -20° C gelagert.

### 3.2.5.5 Kinase Assays

Um die Autophosphorylierungsaktivitäten bzw. *trans*-Phosphorylierungsaktivitäten von nativ aufgereinigtem rekombinanten His-Tag-Fusionsproteinen (3.2.5.2) zu bestimmen wurden Standard-Phosphorylierungsassays (3.2.5.5.1) bzw. Interaktions-Kinase-Assays (3.2.5.5.2) unter nativen Bedingungen in Gegenwart von radioaktiv markiertem  $\gamma$ -[<sup>32</sup>P]-ATP durchgeführt.

#### 3.2.5.5.1 Standard-Phosphorylierungsassay

Die an die *Ni-NTA Magnetic Agarose Beads* immobilisierten rekombinanten His-Tag-Proteine wurden nach Entfernen des His-Waschpuffers in 1 ml 1 x Kinasepuffer (50 mM Tris-HCl pH 7,0, 10 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol, 10 mM MnCl<sub>2</sub>) äquilibriert. Für den Nachweis der Autophosphorylierung von AGC1.7 wurde anstelle von 10 mM MnCl<sub>2</sub> als Cofaktor 10 mM MgCl<sub>2</sub> verwendet. Der Reaktionsansatz des Kinase-Assays setzte sich aus 50 mM Tris-HCl pH 7,0, 10 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol, 10 mM MnCl<sub>2</sub>, 50  $\mu$ M ATP, 10  $\mu$ Ci  $\gamma$ -[<sup>32</sup>P]-ATP zusammen. Die Proben wurden darauffolgend für 40 min bei 25 °C inkubiert und währenddessen alle 5 min durch Schnippen gemischt. Im Anschluss wurden die Magnetpartikel zweimal mit je 100  $\mu$ l 1 x TBS-Isolierungspuffer (50 mM Tris-HCl pH 7,3, 300 mM NaCl, 10 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol, 0,1 % (v/v) Tween®20) gewaschen und in je 10  $\mu$ l 1 x SDS-Probenpuffer aufgenommen, um das rekombinante Protein von den Magnetpartikeln zu eluieren. Die rekombinanten, nativ aufgereinigten und vermutlich phosphorylierten Proteine wurden hinsichtlich ihres Molekulargewichts in einer SDS-Gelelektrophorese (3.2.5.6) aufgetrennt und mittels Coomassie-Färbung (3.2.5.7) sichtbar gemacht. Zur Erhöhung der Schärfe und Intensität der Phosphorylierungssignale wurden die Gele im *Gel Drying System 583* (Bio-Rad Laboratories, München) unter Vakuum für 2,5 h bei langsam ansteigender Temperatur bis max. 60 °C getrocknet. Zur Sichtbarmachung der Phosphorylierungssignale wurden die Gele bei -70 °C gegen einen Hyperfilm MP (GE Healthcare, München) exponiert.

#### 3.2.5.5.2 Interaktions-Kinase-Assay

Um eine mögliche Interaktion zwischen zwei Proteinen nachzuweisen, wurden Interaktions-Kinase-Assays durchgeführt. Um jedoch eine mögliche Autophosphorylierungsaktivität des putativen stromabwärts gelegenen Phosphorylierungspartners zu verhindern, welches das *trans*-Phosphorylierungssignal überdecken könnte, wurden autophosphorylierungs-

defiziente Mutanten des putativen stromabwärts gelegenen Phosphorylierungspartners eingesetzt. Dabei wurde der Interaktions-Kinase-Assay wie der Standard-Phosphorylierungsassay (3.2.5.5.1) durchgeführt, jedoch wurden bei der nativen Aufreinigung der rekombinanten His-Tag Proteine (3.2.5.2) die geklärten Proteinlysate vereinigt und gemeinsam aufgereinigt.

### **3.2.5.6 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Zur gelelektrophoretischen Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht wurden entweder das *Mini-PROTEAN® 3 Elektrophoresis Cell-System* der Firma Bio-Rad Laboratories (München) oder das *NuPAGE®Novex-Gel System* der Firma Invitrogen (Karlsruhe) verwendet. Die in SDS-Probenpuffer gelagerten Proteinproben wurden vor der SDS-PAGE für 10 min bei 95 °C denaturiert. Die Auftrennung erfolgte entweder im 10 %-igen selbstgegossenen SDS-Polyacrylamid-Gel oder im 10 %-igen *NuPAGE®Novex Bis-Tris Gel* mit 1 x MES- bzw. 1 x MOPS-Laufpuffer bei einer konstanten Stromstärke von 25-30 mA je Gel.

### **3.2.5.7 Coomassie Färbung**

Zur Sichtbarmachung elektrophoretisch aufgetrennter Proteine in Polyacrylamidgelen wurden die Gele entweder im Anschluss an die SDS-PAGE (3.2.5.6) oder an den Western-Blot (3.2.5.8) mit Coomassie-Lösung (10 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Essigsäure, 0,25 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250) für 30 min gefärbt und daraufhin mit Coomassie-Entfärber (10 % (v/v) Methanol und 10 % (v/v) Essigsäure) differenziert.

### **3.2.5.8 Western Blot-Transfer**

Der Transfer von elektrophoretisch aufgetrennten Proteinen (3.2.5.6) wurde *semi-dry* per Elektroblob unter Verwendung einer *Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell* der Firma Bio-Rad Laboratories (München) auf ECL-Nitrocellulose-Membran (GE Healthcare, München) ausgeführt. Ungefärbte Proteingele wurden dazu 20 min in Transfer-Puffer (48 mM Tris, 39 mM Glycin, 1,3 mM SDS, 20 % (v/v) Methanol; pH 9,2) bei RT geschwenkt. Zusätzlich wurden sechs Stücke Whatman-Papier und die ECL-Nitrocellulose-Membran auf die Größe des Proteingels zugeschnitten und für 5 min ebenfalls in Transfer-Puffer äquilibriert. Auf den unteren Teil der Blottingapparatur, der Anode, wurden drei in Transfer-Puffer

getränkten Whatman-Papieren luftblasenfrei und deckungsgleich übereinandergelegt, gefolgt von der ECL-Nitrocellulose-Membran, dem Proteingel und drei weiteren in Transfer-Puffer getränkten Whatman-Papieren. Am Ende wurde der Blot von der oberen Hälfte der Apparatur, der Kathode, abgedeckt und der Transfer der Proteine erfolgte vom Gel auf die Membran bei einer konstanten Stromstärke von 70 mA (ca. 1,5 mA pro cm<sup>2</sup>) für 60 bis 90 min, abhängig von der Größe, der zu überführenden Proteine. Die Membran wurde zur Überprüfung des Proteintransfers für 20 min mit Ponceau-Lösung (Sambrook et al., 1989) gefärbt und anschließend direkt für die Western Detektion (3.2.5.9) verwendet.

### 3.2.5.9 Western Detektion

#### Verwendete Primär Antikörper:

Monoklonaler Anti-His-Antikörper aus Maus (Qiagen, Hilden) 1:2000

Monoklonaler Anti-GST-Antikörper aus Maus (Novagen, über Merck, Darmstadt) 1:10000

#### Verwendeter Sekundär Antikörper:

Stabilized Goat-Anti-Mouse HRP Konjugat (Pierce, Perbio Science, Bonn) 1:2000

#### Protokoll:

Der Western Nachweis von spezifischen Proteinen erfolgte in Anlehnung an das Immunodetektions-Protokoll mit Anti-His Antikörpern aus dem *QIAexpress*® (2002, Qiagen). Alle Schritte wurden bei RT durchgeführt. Die Membran wurde mit der Proteinseite nach oben zweimal für je 5 min in 1 x TBS-Puffer (10 mM Tris-HCl pH 7,5, 7,5 mM NaCl) äquilibriert. Durch Schwenken der Membran für 1 h in Blockinglösung (5 % (w/v) Magermilchpulver in 1 x TBS-Puffer) wurden die unspezifischen Bindungsstellen der Membran blockiert. Anschließend wurde die Membran zweimal mit 1 x TBSTT-Puffer (20 mM Tris-HCl pH 7,5, 500 mM NaCl, 0,05 % (w/v) Tween®20, 0,2 % (w/v) Triton®X-100) und einmal mit 1 x TBS-Puffer für je 5 min gewaschen. Es folgte eine einstündige Inkubation mit dem primären Antikörper in geeigneter Verdünnung in Blockinglösung. Nach zweimaligem Waschen mit 1 x TBSTT-Puffer und einmaligem Waschen mit 1 x TBS-Puffer für je 5 min wurde die Membran 1 h mit 10 ml einer 1:2000 Verdünnung des sekundären HRP-Antikörpers in Blockinglösung inkubiert. Nach fünfmaligem Waschen der Membran mit 1 x TBSTT-Puffer für je 5 min wurde zur Detektion der spezifisch gebundenen Antikörper

das *SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate* (Pierce, Rockford, USA) als Substrat für die enzymatische Umsetzung durch die Meerrettichperoxidase (engl. *horseradish peroxidase*, HRP) verwendet. Hierzu wurde die Membran für 5 min in einem Gemisch aus 8 ml 1 x TBSTT-Puffer, 500 µl Luminol und 500 µl Peroxid-Puffer inkubiert, eingeschweißt und gegen einen Hyperfilm MP (GE Healthcare, München) exponiert.

### **3.2.6 Transformation von Pflanzen**

#### **3.2.6.1 Transiente, biolistische Transformation von *Allium fistulosum* L.**

Für die Untersuchung der subzellulären Lokalisation wurden GFP-Fusionskonstrukte mittels transienter, biolistischer Transformation in die Epidermiszellen von Frühlingszwiebeln (*Allium fistulosum* L.) eingebracht.

##### ***DNA-Fällung auf Goldpartikel***

40 mg Goldpartikel mit einem Durchmesser von 0,3 bis 3 µm (Heraeus, Karlsruhe) wurden zunächst dreimal in 1 ml Ethanol und einmal in 1 ml H<sub>2</sub>O gewaschen. Anschließend wurden die Goldpartikel in 1 ml H<sub>2</sub>O resuspendiert und in 50 µl Aliquots mit je ca. 2 mg Goldpartikel aufgeteilt, welche bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert wurden. Bei der transienten, biolistischen Transformation wurden DNA-Fällungsansätze für 3 Schüsse vorbereitet, wobei je Schuss 500 ng Plasmid-DNA eingesetzt wurden. In einem 1,5 ml Reaktionsgefäß wurden 12,5 µl (ca. 0,5 mg) Goldpartikel mit 1,5 µg Plasmid-DNA gründlich gemischt. Im Anschluss wurden im Deckel des Reaktionsgefäßes 12,5 µl (2,5 M) CaCl<sub>2</sub> und 5 µl (0,1 M) Spermidin vermischt und unmittelbar nach Schließen des Deckels wurde das Reaktionsgefäß mehrmals invertiert und der Fällungsansatz gründlich gemischt. Nach einer 30-sekündigen Zentrifugation bei 13000 rpm wurde der Ansatz mit 70 µl Ethanol gewaschen und in 40 µl Ethanol resuspendiert.

##### ***Transiente biolistische Transformation***

Die biolistische Transformation erfolgte mit einer Partikelkanone *PDS 1000/He Biolistic® Particle Delivery System* der Firma Bio Rad Laboratories (München). Je Beschuss wurden 10 µl des DNA-Fällungsansatzes auf einem *macrocarrier* verteilt und in der Kammer der Partikelkanone auf der zweiten Schiene von oben positioniert. Ein ca. 2 cm langes Stück der Zwiebel von *Allium fistulosum* wurde der Länge nach halbiert und der innere Teil entfernt.

Das Zwiebelstück wurde mit der Außenseite nach unten auf 0,5 % Wabbelagar durch leichtes Andrücken fixiert und in der fünften Schiene von oben positioniert. Der Beschuss erfolgte bei 1100 psi unter einem Vakuum von 28 inch Hg. Die Zwiebelstücke wurden mit der Innenseite nach unten in einer feuchten Kammer über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Epidermisschicht unter dem UV-Licht Mikroskop (Axioskop, Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena) untersucht.

### **3.2.6.2 Stabile Transformation von *Arabidopsis thaliana***

Zur Bestimmung des Expressionsmusters und der subzellulären Lokalisation der AtPTI1-Kinasen in *Arabidopsis thaliana* wurden die *Arabidopsis*-Pflanzen mit *Agrobakterien* stabil transformiert.

#### ***Transformation von Agrobacterium tumefaciens***

Für die stabile Transformation von *Arabidopsis* wurden zunächst chemisch kompetente *Agrobakterien* vom Stamm GV3101 hergestellt. Dazu wurden 2 ml YEP/Gent<sup>30</sup>/Kan<sup>50</sup>-Medium mit einer Einzelkolonie angeimpft und über Nacht bei 28 °C bei 150 rpm angezogen. Mit dieser Vorkultur wurden 50 ml YEP/Gent<sup>30</sup>/Kan<sup>50</sup>-Medium angeimpft und bei 28 °C und 150 rpm bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5 angezogen. Nach Sedimentieren der Bakterien (5 min, 4 °C, 5000 rpm) wurde das Pellet auf Eis in 10 ml kaltem 150 mM NaCl vorsichtig resuspendiert und dann erneut zentrifugiert (5 min, 4 °C, 5000 rpm). Anschließend wurden die Zellen auf Eis in 1 ml kaltem 20 mM CaCl<sub>2</sub> und 15 % Glycerol vorsichtig gelöst, zu 200 µl aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

Für die Transformation der *Agrobakterien* wurden die chemisch kompetenten Zellen für 10 min auf Eis aufgetaut und mit 1 µg des zu transformierenden Vektors gemischt. Nach 30-minütiger Inkubation auf Eis wurde der Ansatz für 1 min in flüssigen Stickstoff getaucht und anschließend für 3 min bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut. Danach wurde der Ansatz zunächst kurz auf Eis gekühlt und daraufhin vollständig auf einer YEP/Gent<sup>30</sup>/Kan<sup>50</sup>/Spec<sup>100</sup>-Agarplatte ausplattiert und für 2 Tage bei 28 °C inkubiert.

### ***Transformation von Arabidopsis thaliana***

Die stabile Transformation von *Arabidopsis thaliana* mit *Agrobakterien* erfolgte in Anlehnung an die Blütentauch (*foral-dip*)-Methode (Clough & Bent, 1998).

Die Anzucht der *Arabidopsis* Pflanzen erfolgte unter Langtagbedingungen auf Erde (3.2.1) und um die Anzahl der Blütentriebe zu erhöhen, wurden die Primär- und Sekundärfloreszenzen entfernt. Mit einer frisch transformierten Einzelkolonie wurde eine 20 ml YEP/Gent<sup>30</sup>/Kan<sup>50</sup>/Spec<sup>100</sup>-Kultur beimpft und für 24 h bei 28 °C und 150 rpm angezogen. Die Bakterien wurden sedimentiert (5 min, 4 °C, 5000 rpm) und in 20 ml YEP-Medium mit 0,6 g Saccharose und 10 µl Silwet L77 resuspendiert. Mit Hilfe einer Pipette wurden die transformierten Bakterien wiederholt auf die geschlossenen Blüten der Pflanzen gegeben. Anschließend wurden die Pflanzen für 24 h im Dunkeln bei RT unter einer Plastikhülle inkubiert und darauffolgend bis zum Reifen der Samen den Standardbedingungen ausgesetzt. Nach etwa 5-6 Tagen wurde die Transformation wiederholt.

Die F1-Generation wurde auf Erde ausgesät und zur Selektion der transgenen Pflanzen im Vierblattstadium zwei bis dreimal im Abstand von 2 bis 3 Tagen mit BASTA<sup>®</sup> (250 mg/L Phosphinothricin, 0,1 % Tween<sup>®</sup>20) besprüht.

#### **3.2.7 Histochemischer GUS-Assay**

Zur Detektion der β-Glucuronidase-Aktivität in stabil transformierten *Arabidopsis* Pflanzen wurde das zu untersuchende Gewebe vollständig mit X-Gluc-Färbelösung überschichtet und 2 min einem Vakuum (28 inch Hg) ausgesetzt. Anschließend wurde das Gewebe für 6 bis 24 h bei 37 °C inkubiert. Zum Entfernen des Chlorophylls wurde das Gewebe bis zur vollständigen Entfärbung in einem Gemisch aus Ethanol und Eisessig (3:1) inkubiert.

#### **3.2.8 Oryzalin Behandlung**

Die Zwiebelepidermis wurde für 30 min bis 1 h bei Raumtemperatur im Dunkeln in 10 µM Oryzalin (2 mM Stocklösung in DMSO) inkubiert.

### 3.2.9 Anilinblau-Färbung

Die Anilinblau-Färbung der Pollenschläuche im Pistill wurde nach Wu *et al.* (2010) durchgeführt. Pistille wurden für 2 h bei Raumtemperatur in Fixierlösung aus Ethanol und Eisessig (3:1) inkubiert. Die fixierten Pistille wurden anschließend dreimal für 5 min mit H<sub>2</sub>O gewaschen, gefolgt von einer Übernacht-Inkubation in 8 M NaOH. Am nächsten Tag wurden die Pistille mit dreimal für 1 h mit H<sub>2</sub>O gewaschen und im Anschluss mit Anilinblau-Färbelösung (0,1 % Anilinblau in 0,1 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-KOH Puffer, pH 11) für 3 bis 5 h im Dunkeln gefärbt.

### 3.2.10 Mikroskopie

Das in dieser Arbeit verwendete Lichtmikroskop Axioskop war mit den Fluoreszenzfiltersätzen 01 (Anregung BP 365/12 nm, Emission LP 397 nm), 09 (Anregung BP 450-490 nm, Emission LP 520 nm) und 15 (Anregung BP 546/12 nm, Emission LP 590 nm) sowie einer AxioCamMRC5 CCD-Kamera und der Software AxioVision der Firma Zeiss (Jena) ausgestattet.

## 3.3 Klonierungen

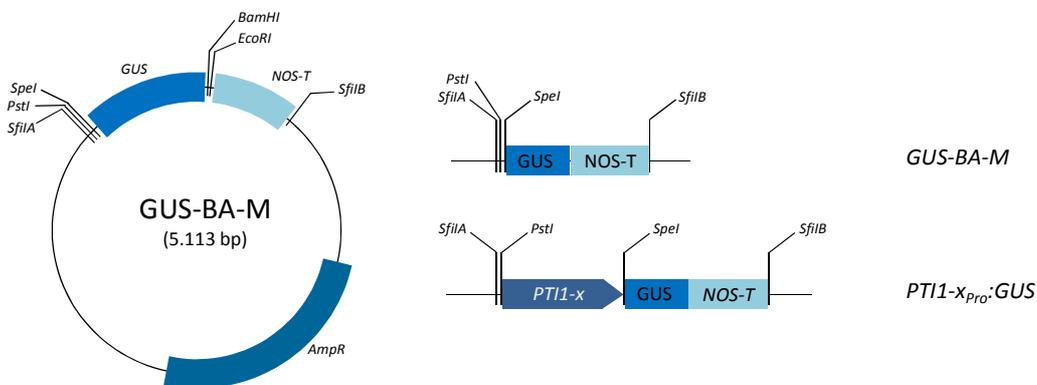
Die für diese Arbeit relevanten Klonierungen sind in dem folgenden Kapitel beschrieben. Eine vollständige Liste der verwendeten Primer ist im Anhang A1 aufgeführt.

### 3.3.1 Klonierungen von PCR-Fragmenten

Zur Subklonierung von PCR-Produkten wurden folgende Vektoren verwendet: *pCR<sup>®</sup>2.1.TOPO<sup>®</sup>* (Invitrogen, Niederlande), *pCR<sup>®</sup>-Blunt II-TOPO<sup>®</sup>* (Invitrogen, Niederlande) oder *pGEM<sup>®</sup>-T Easy* (Promega, USA). Die für diese Arbeit relevanten *TOPO*- bzw. *pGEM*-Vektoren sowie die verwendeten PCR-Fragmente sind im Anhang A2 (Tab. A 2-1, Tab. A 2-2 und Tab. A 2-3) aufgelistet.

### 3.3.2 Klonierung der Promotor-Reporter-Gen-Konstrukte

Zur Untersuchung der gewebespezifischen Expression der *PTI1*-Kinasen *in planta* wurden Reporter-Gen-Konstrukte angefertigt, in denen das  $\beta$ -Glucuronidase-Reporter-Gen (GUS) unter Kontrolle des jeweiligen *PTI1*-Promotors steht. Hierfür wurden stromaufwärts vom Translationsstart gelegene Fragmente, die für jedes Gen individuell bestimmt wurden und mit großer Wahrscheinlichkeit den jeweiligen Promotor umfassen, aus *Arabidopsis* gDNA amplifiziert. Anschließend wurden die jeweiligen Promotorbereiche mit den Endonukleasen *PstI* und *SpeI* restringiert und in den ebenfalls mit *PstI* und *SpeI* geschnittenen Vektor *GUS-BA-M* stromaufwärts des GUS-Gens ligiert (Abbildung 3-2). Eine Zusammenfassung der Klonierung der Promotor-Reporter-Gen-Konstrukte ist in Tabelle 3.3-1 aufgelistet.



**Abbildung 3-2: Klonierungsstrategie der GUS-Promotorstudie.** a) *pUC*-Vektor *GUS-BA-M* (DNA Cloning Service). b) Klonierungsschritte der GUS-Reporter-Gen-Konstrukte. *GUS*:  $\beta$ -Glucuronidase-Gen, *Pro*: Promotor, *NOS-T*: Nopalinsynthase-Terminator, *Amp<sup>R</sup>*: Ampicillin-Resistenz.

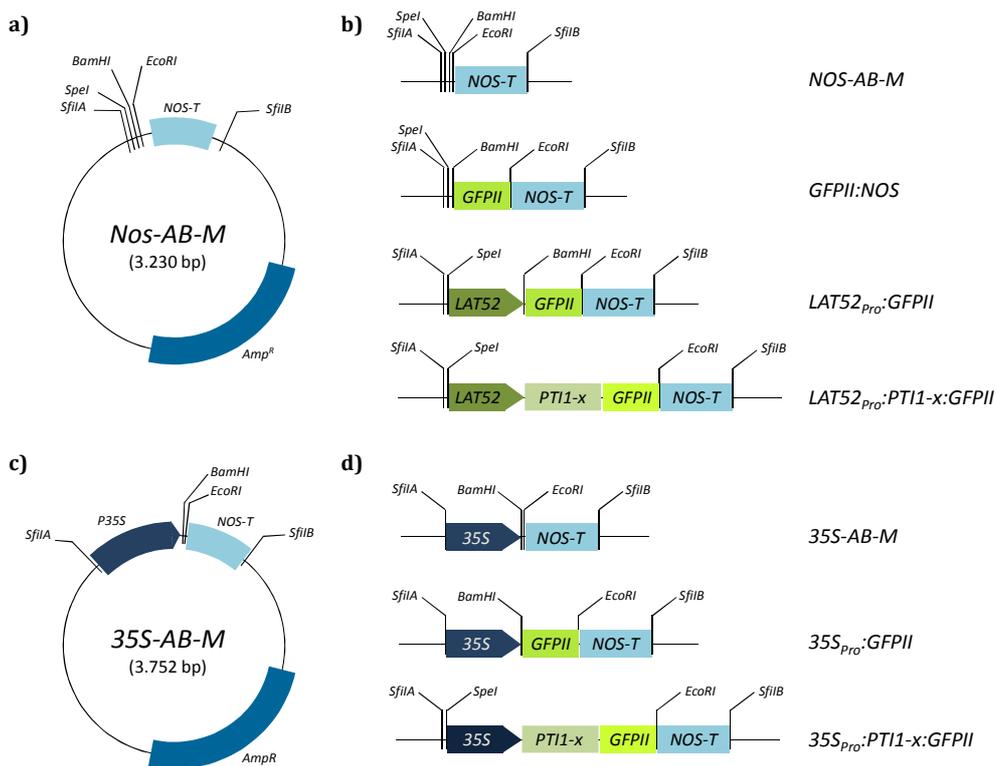
**Tabelle 3.3-1: Klonierung von GUS-Reporter-Gen-Konstrukte mittels Restriktionsverdau.** Die Fragmente wurden mittels *PstI* und *SpeI* aus dem jeweiligen Ursprungsvektor restringiert und in den ebenfalls mit *PstI* und *SpeI* geschnittenen *GUS-BA-M*-Vektor ligiert. *Pro*: Promotor. Die vollständige Liste der Primersequenzen befindet sich im Anhang A1. Ursprungsvektoren sind in Tabelle A 2-1 im Anhang A2 beschrieben, Zielvektoren in Tabelle 3.1-2. Die GUS-Reporter-Gen-Konstrukte wurden in dieser Arbeit bzw. in Bachelorarbeiten, die im Rahmen dieser Arbeit betreut wurden, hergestellt.

Name des Vektors	Konstrukt	Primer for	Primer rev	Ursprungsvektor	Zielvektor	Enzyme	Fragment- größe	Ursprung
<i>PTI1-1<sub>PRO</sub>:GUS</i>	<i>PTI1-1<sub>PRO</sub></i>	KS1	KS2	<i>TOPO:PTI1-1<sub>PRO</sub></i>	<i>GUS-BA-M</i>	<i>PstI/SpeI</i>	1.500 bp	diese Arbeit
<i>PTI1-2<sub>PRO</sub>:GUS</i>	<i>PTI1-2<sub>PRO</sub></i>	KS3	KS4	<i>TOPO:PTI1-2<sub>PRO</sub></i>	<i>GUS-BA-M</i>	<i>PstI/SpeI</i>	1.020 bp	diese Arbeit
<i>PTI1-3<sub>PRO</sub>:GUS</i>	<i>PTI1-3<sub>PRO</sub></i>	KS5	KS6	<i>TOPO:PTI1-3<sub>PRO</sub></i>	<i>GUS-BA-M</i>	<i>PstI/SpeI</i>	1.039 bp	WITTFOTH (2009)
<i>PTI1-4<sub>PRO</sub>:GUS</i>	<i>PTI1-4<sub>PRO</sub></i>	KS7	KS8	<i>TOPO:PTI1-4<sub>PRO</sub></i>	<i>GUS-BA-M</i>	<i>PstI/SpeI</i>	1.081 bp	SCHMIDT (2009)
<i>PTI1-5<sub>PRO</sub>:GUS</i>	<i>PTI1-5<sub>PRO</sub></i>	KS9	KS10	<i>TOPO:PTI1-5<sub>PRO</sub></i>	<i>GUS-BA-M</i>	<i>PstI/SpeI</i>	517 bp	diese Arbeit
<i>PTI1-6<sub>PRO</sub>:GUS</i>	<i>PTI1-6<sub>PRO</sub></i>	KS11	KS12	<i>TOPO:PTI1-6<sub>PRO</sub></i>	<i>GUS-BA-M</i>	<i>PstI/SpeI</i>	1.211 bp	SCHMIDT (2009)
<i>PTI1-7<sub>PRO</sub>:GUS</i>	<i>PTI1-7<sub>PRO</sub></i>	KS13	KS14	<i>TOPO:PTI1-7<sub>PRO</sub></i>	<i>GUS-BA-M</i>	<i>PstI/SpeI</i>	1.154 bp	WITTFOTH (2009)
<i>PTI1-8<sub>PRO</sub>:GUS</i>	<i>PTI1-8<sub>PRO</sub></i>	KS15	KS16	<i>TOPO:PTI1-8<sub>PRO</sub></i>	<i>GUS-BA-M</i>	<i>PstI/SpeI</i>	1484 bp	diese Arbeit
<i>PTI1-9<sub>PRO</sub>:GUS</i>	<i>PTI1-9<sub>PRO</sub></i>	KS17	KS18	<i>TOPO:PTI1-9<sub>PRO</sub></i>	<i>GUS-BA-M</i>	<i>PstI/SpeI</i>	666 bp	diese Arbeit

### 3.3.3 Klonierung von GFP-Expressionsvektoren

Um die subzelluläre Lokalisation der *PTI1*- und *AGC*-Kinasen experimentell zu bestimmen, wurden GFP-Konstrukte angefertigt. Diese Reporter-Gen-Konstrukte wurden entweder verwendet um Frühlingszwiebeln transient oder um *Arabidopsis*-Pflanzen stabil zu transformieren.

Auf Grund der unterschiedlichen Expressionsmuster der Kinasen wurden für die stabile Transformation zwei GFP-Expressionsvektoren mit unterschiedlichen Promotorsequenzen konstruiert. Für die GFP-Expression in den Pollen wurde der *LAT52<sub>Pro</sub>:GFPII*-Vektor basierend auf dem *NOS-AB-M*-Vektor kloniert, der zusätzlich zu dem von BRYLKA (2002) veränderten GFP-Reporter-Gen den pollenspezifischen *LAT52*-Promotor (TWELL *et al.*, 1989) enthält (Abbildung 3-3 a + b). Für eine ubiquitäre GFP-Expression wurde der *35S<sub>Pro</sub>:GFPII*-Vektor basierend auf dem *35S-AB-M*-Vektor kloniert, welcher ebenfalls das von Brylka optimierte GFP-Reporter-Gen beinhaltet (Abbildung 3-3 c + d).



**Abbildung 3-3: Klonierungsstrategie der GFP-Lokalisationsstudie. a + b)** pollenspezifische subzelluläre Lokalisationsstudie. **a)** *pUC*-Vektor *NOS-AB-M*. **b)** Klonierungsstrategie: das *GFPII*-Reporter-Gen aus *UBI<sub>Pro</sub>:GFPII*, der *LAT52*-Promotor aus Tomate und das jeweilige *PTI1*-Gen wurden über unterschiedliche Restriktionsschnittstellen in den *NOS-AB-M*-Vektor ligiert. **c + d)** ubiquitäre subzelluläre Lokalisationsstudie. **c)** *pUC*-Vektor *35S-AB-M*. **d)** Klonierungsstrategie: das *GFPII*-Reporter-Gen aus *UBI<sub>Pro</sub>:GFPII* und das jeweilige *PTI1*-Gen wurden über unterschiedliche Restriktionsschnittstellen in den *35S-AB-M*-Vektor ligiert. *Pro*: Promotor, *35S*: *CaMV* 35S-Promotor, *NOS-T*: *Nopalinsynthase-Terminator*, *Amp<sup>R</sup>*: *Ampicilin-Resistenz*.

Die ORF-Sequenzen der zu untersuchenden Gene exklusive des Stopp-Codons wurden aus den entsprechenden *TOPO*- bzw. *pGEM*-Vektoren mit *BamHI* oder mit zu *BamHI*-kompatiblen Restriktionsenzymen herausgeschnitten (Tabelle A 2-2 und Tabelle 3.3-2).

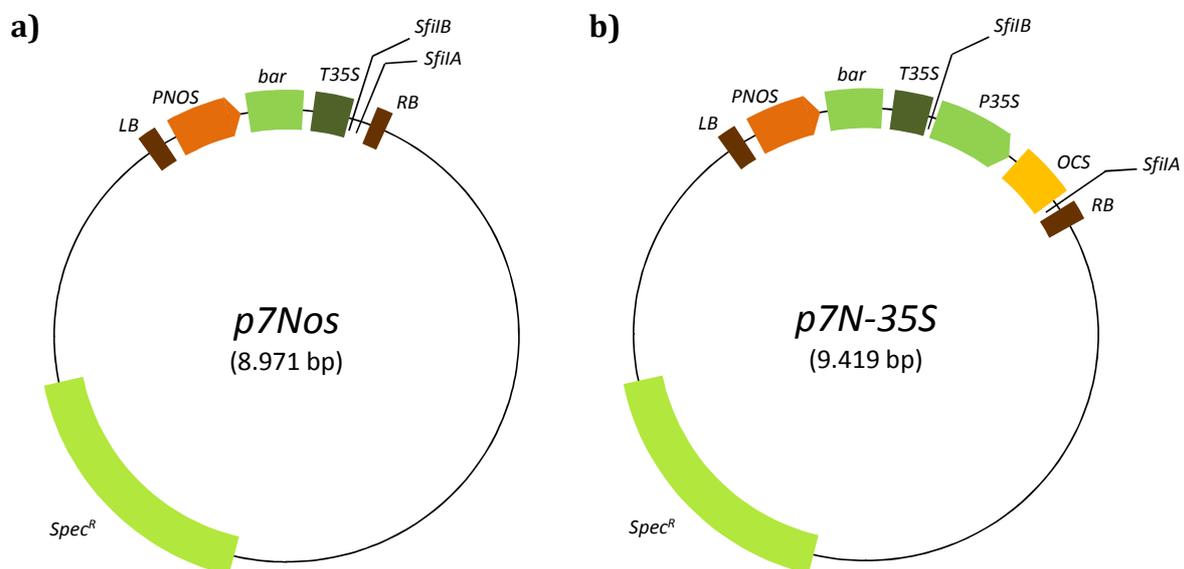
**Tabelle 3.3-2: Klonierung von GFP-Reportergen-Konstrukten mittels Restriktionsverdau.**  
*Pro*: Promotor. Die GFP-Reportergen-Konstrukte wurden in dieser Arbeit bzw. in Bachelorarbeiten, die im Rahmen dieser Arbeit betreut wurden, hergestellt. Ursprungsvektoren sind in Tabelle A 2-2 im Anhang A2 beschrieben, Zielvektoren in Tabelle 3.1-2.

Name des Vektors	Konstrukt	Ursprungsvektor		Zielvektor		Ursprung
		Name	Enzyme	Name	Enzyme	
<i>GFPII</i> :NOS	<i>GFPII</i>	<i>Ubi<sub>Pro</sub></i> : <i>GFPII</i>	<i>BamHI</i> / <i>EcoRI</i>	NOS-AB-M	<i>BamHI</i> / <i>EcoRI</i>	Diese Arbeit
<i>LAT52<sub>Pro</sub></i> : <i>GFPII</i>	<i>LAT52<sub>Pro</sub></i>	<i>TOPO</i> : <i>LAT52<sub>Pro</sub></i>	<i>SpeI</i> / <i>BamHI</i>	<i>GFPII</i> :NOS	<i>SpeI</i> / <i>BamHI</i>	Diese Arbeit
<i>LAT52<sub>Pro</sub></i> : <i>PTI1-1</i> :GFP	<i>PTI1-1</i>	<i>pGEM</i> - <i>PTI1-1<sub>GFP</sub></i>	<i>BclI</i>	<i>LAT52<sub>Pro</sub></i> : <i>GFPII</i>	<i>BamHI</i>	Diese Arbeit
<i>LAT52<sub>Pro</sub></i> : <i>PTI1-3</i> :GFP	<i>PTI1-3</i>	<i>TOPO</i> : <i>PTI1-3<sub>GFP</sub></i>	<i>BglIII</i>	<i>LAT52<sub>Pro</sub></i> : <i>GFPII</i>	<i>BamHI</i>	WITTFOTH (2009)
<i>LAT52<sub>Pro</sub></i> : <i>PTI1-5</i> :GFP	<i>PTI1-5</i>	<i>TOPO</i> : <i>PTI1-5<sub>GFP</sub></i>	<i>BglIII</i>	<i>LAT52<sub>Pro</sub></i> : <i>GFPII</i>	<i>BamHI</i>	Diese Arbeit
<i>LAT52<sub>Pro</sub></i> : <i>PTI1-6</i> :GFP	<i>PTI1-6</i>	<i>TOPO</i> : <i>PTI1-6<sub>GFP</sub></i>	<i>BamHI</i>	<i>LAT52<sub>Pro</sub></i> : <i>GFPII</i>	<i>BamHI</i>	SCHMIDT (2009)
<i>35S<sub>Pro</sub></i> : <i>GFPII</i>	<i>GFPII</i>	<i>Ubi<sub>Pro</sub></i> : <i>GFPII</i>	<i>BamHI</i> / <i>EcoRI</i>	<i>35S</i> -AB-M	<i>BamHI</i> / <i>EcoRI</i>	Diese Arbeit
<i>35S<sub>Pro</sub></i> : <i>PTI1-1</i> : <i>GFPII</i>	<i>PTI1-1</i>	<i>pGEM</i> : <i>PTI1-1<sub>GFP</sub></i>	<i>BclI</i>	<i>35S<sub>Pro</sub></i> : <i>GFPII</i>	<i>BamHI</i>	Diese Arbeit
<i>35S<sub>Pro</sub></i> : <i>PTI1-2</i> : <i>GFPII</i>	<i>PTI1-2</i>	<i>TOPO</i> : <i>PTI1-2<sub>GFP</sub></i>	<i>BamHI</i>	<i>35S<sub>Pro</sub></i> : <i>GFPII</i>	<i>BamHI</i>	Diese Arbeit
<i>35S<sub>Pro</sub></i> : <i>PTI1-4</i> : <i>GFPII</i>	<i>PTI1-4</i>	<i>pGEM</i> : <i>PTI1-4<sub>GFP</sub></i>	<i>BglIII</i>	<i>35S<sub>Pro</sub></i> : <i>GFPII</i>	<i>BamHI</i>	SCHMIDT (2009)
<i>35S<sub>Pro</sub></i> : <i>PTI1-5</i> : <i>GFPII</i>	<i>PTI1-5</i>	<i>TOPO</i> : <i>PTI1-5<sub>GFP</sub></i>	<i>BglIII</i>	<i>35S<sub>Pro</sub></i> : <i>GFPII</i>	<i>BamHI</i>	Diese Arbeit
<i>35S<sub>Pro</sub></i> : <i>PTI1-7</i> : <i>GFPII</i>	<i>PTI1-7</i>	<i>TOPO</i> : <i>PTI1-7<sub>GFP</sub></i>	<i>BamHI</i>	<i>35S<sub>Pro</sub></i> : <i>GFPII</i>	<i>BamHI</i>	WITTFOTH (2009)
<i>35S<sub>Pro</sub></i> : <i>PTI1-8</i> : <i>GFPII</i>	<i>PTI1-8</i>	<i>TOPO</i> : <i>PTI1-8<sub>GFP</sub></i>	<i>BamHI</i>	<i>35S<sub>Pro</sub></i> : <i>GFPII</i>	<i>BamHI</i>	Diese Arbeit
<i>35S<sub>Pro</sub></i> : <i>PTI1-9</i> : <i>GFPII</i>	<i>PTI1-9</i>	<i>pGEM</i> : <i>PTI1-9<sub>GFP</sub></i>	<i>BamHI</i>	<i>35S<sub>Pro</sub></i> : <i>GFPII</i>	<i>BamHI</i>	Diese Arbeit
<i>35S<sub>Pro</sub></i> : <i>AGC1-5</i> : <i>GFPII</i>	<i>AGC1-5</i>	<i>TOPO</i> : <i>AGC1-5<sub>GFP</sub></i>	<i>BamHI</i>	<i>35S<sub>Pro</sub></i> : <i>GFPII</i>	<i>BamHI</i>	LINNEMANN (2011)
<i>35S<sub>Pro</sub></i> : <i>AGC1-7</i> : <i>GFPII</i>	<i>AGC1-7</i>	<i>TOPO</i> : <i>AGC1-7<sub>GFP</sub></i>	<i>BamHI</i>	<i>35S<sub>Pro</sub></i> : <i>GFPII</i>	<i>BamHI</i>	LINNEMANN (2011)
<i>35S<sub>Pro</sub></i> : <i>PDK1.2</i> : <i>GFPII</i>	<i>PDK1.2</i>	<i>pGEM</i> : <i>PDK1.2<sub>GFP</sub></i>	<i>BamHI</i>	<i>35S<sub>Pro</sub></i> : <i>GFPII</i>	<i>BamHI</i>	Diese Arbeit
<i>UBI<sub>Pro</sub></i> : <i>PTI1-3</i> : <i>GFPII</i>	<i>PTI1-3</i>	<i>TOPO</i> : <i>PTI1-3<sub>GFP</sub></i>	<i>BglIII</i>	<i>Ubi<sub>Pro</sub></i> : <i>GFPII</i>	<i>BamHI</i>	BAGHERZADEGAN-SARAVI (2008)
<i>UBI<sub>Pro</sub></i> : <i>PTI1-5</i> : <i>GFPII</i>	<i>PTI1-5</i>	<i>TOPO</i> : <i>PTI1-5<sub>GFP</sub></i>	<i>BglIII</i>	<i>Ubi<sub>Pro</sub></i> : <i>GFPII</i>	<i>BamHI</i>	BAGHERZADEGAN-SARAVI (2008)
<i>UBI<sub>Pro</sub></i> : <i>PTI1-6</i> : <i>GFPII</i>	<i>PTI1-6</i>	<i>TOPO</i> : <i>PTI1-6<sub>GFP</sub></i>	<i>BamHI</i>	<i>Ubi<sub>Pro</sub></i> : <i>GFPII</i>	<i>BamHI</i>	BAGHERZADEGAN-SARAVI (2008)

Einige Sequenzen enthielten zusätzlich noch einen Teil der 5'-UTR-Region, da auf Grund hoher Sequenz-Homologien im 5'-ORF-Bereich eine spezifische Anlagerung der Primer nicht gegeben ist. In diesen Fällen wurde zunächst eine Amplifikation mit UTR-spezifischen Primern durchgeführt, gefolgt von einer weiteren PCR, welche durch einen im ORF bindenden *reverse*-Primer zu einer Amplifikation ohne Stopp-Codon führte. Eine Übersicht über die Klonierung der verwendeten Konstrukte und Vektoren geben die Tabellen A 2-2 und 3.3-2. Die vollständige Liste der verwendeten Primer befindet sich im Anhang A1.

### 3.3.4 Klonierung binärer *Arabidopsis*-Expressionsvektoren

Zur Herstellung der binären *Arabidopsis*-Expressionsvektoren für die stabile Transformation von *Arabidopsis* wurde die Expressionskassetten *PTI1-x<sub>Pro</sub>:GUS* bzw. die Expressionskassetten *LAT52<sub>Pro</sub>:PTI1-x:GFPII* und *35S<sub>Pro</sub>:PTI1-x:GFPII* aus den entsprechenden Vektoren mittels *SfiI*-Schnittstellen in die binären Transformationsvektoren *p7Nos* bzw. *p7N-35S* ligiert. Die binären *Arabidopsis*-Expressionsvektoren sind in Abbildung 3-4 schematisch dargestellt und die Klonierung ist in Tabelle 3.3-3 zusammengefasst.



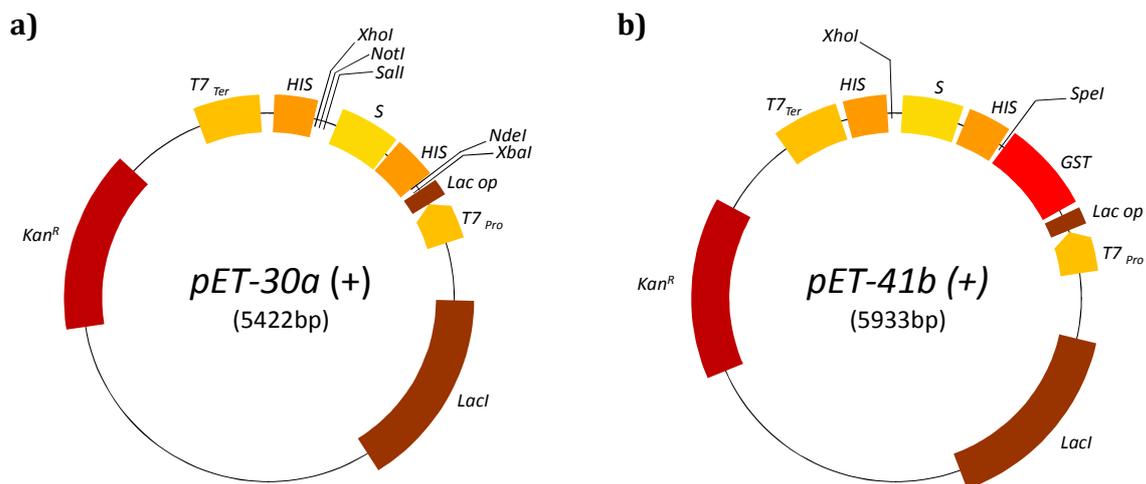
**Abbildung 3-4: Binäre *Arabidopsis*-Expressionsvektoren.** a) *p7Nos* und b) *p7N-35S*. Die Vektorbereiche zwischen der *left border* (LB) und der *right border* (RB) werden während der stabilen Transformation von *Arabidopsis thaliana* mittels *Agrobacterium tumefaciens* in das Genom von *A. thaliana* integriert. PNOS: Promotor der Nopalinsynthase, bar: bar-Gen vermittelt Phosphinothricin(Basta<sup>R</sup>)-Resistenz, T35S: CaMV 35S-Terminator, P35S: CaMV 35S-Promotor, OCS: Octopinsynthase-Terminator, SpecR: Spectinomycin-Resistenz.

**Tabelle 3.3-3: Klonierung der binären Arabidopsis-Expressionsvektoren mittels Restriktionsverdau.** *Bi*: binärer Expressionsvektor. Ursprungsvektoren sind in Tabelle 3.3-1 bzw. Tabelle 3.3-2 beschrieben, Zielvektoren in Tabelle 3.1-2.

Name des Vektors	Konstrukt	Ursprungsvektor		Zielvektor	
		Name	Enzyme	Name	Enzyme
<i>PTI1-x<sub>Pro</sub>:GUS-Bi</i>	<i>PTI1-x<sub>Pro</sub>:GUS</i>	<i>PTI1-x<sub>Pro</sub>:GUS</i>	<i>SfiI</i>	<i>p7Nos</i>	<i>SfiI</i>
<i>LAT52<sub>Pro</sub>:PTI1-x:GFPII-Bi</i>	<i>LAT52<sub>Pro</sub>:PTI1-x:GFPII</i>	<i>LAT52<sub>Pro</sub>:PTI1-x:GFP</i>	<i>SfiI</i>	<i>p7N-35S</i>	<i>SfiI</i>
<i>35S<sub>Pro</sub>:PTI1-x:GFPII-Bi</i>	<i>35S<sub>Pro</sub>:PTI1-x:GFPII</i>	<i>35S<sub>Pro</sub>:PTI1-x:GFP</i>	<i>SfiI</i>	<i>p7N-35S</i>	<i>SfiI</i>

### 3.3.5 Klonierung von Expressionsvektoren zur Proteinexpression in *E. coli*

Die ORFs der *PTI1*- und *AGC*-Kinasen wurden zunächst zur Überexpression in *E. coli* ohne Stopp-Codon in den Expressionsvektor *pET30a(+)* (Abbildung 3-5 und Tabelle 3.3-4) kloniert und dabei mit einem C-terminalen *HIS-Tag* versehen. Zusätzlich wurden die ORFs der *AGC*-Kinasen, *AGC1-5*, *AGC1-7* und *PDK1.2*, mit Stopp-Codon in den Expressionsvektor *pET41b(+)* (Abbildung 3-5 und Tabelle 3.3-4) kloniert. Dadurch wurden die *AGC*-Kinasen mit einem N-terminalen *GST-Tag* versehen und konnten somit in verschiedenen Kombinationen mit den *HIS-Tag*-Fusionsproteinen in *in vitro* *Pulldown*-Studien (3.2.5.4) verwendet werden.



**Abbildung 3-5: *E. coli* Expressionsvektoren.** **a)** *pet30a(+)* und **b)** *pet41b(+)*. *LacI*: *LacI*-Gen, *T7<sub>Pro</sub>*: Promotor der *T7* RNA Polymerase, *Lac op*: *Lac*-Operator, *GST*: *GST*-Tag, *HIS*: *HIS*-Tag, *S*: *S*-Tag, *T7Ter*: Terminator der *T7* RNA Polymerase, *Kan<sup>R</sup>*: Kanamycin-Resistenz.

**Tabelle 3.3-4: Klonierung von *E. coli* Expressionsvektoren mittels Restriktionsverdau.** Zielvektoren sind in Tabelle 3.1-2 und Ursprungsvektoren sind in Tabelle A 2-3 im Anhang A2 beschrieben, Zielvektoren in Tabelle 3.1-2. Die Expressionsvektoren wurden in dieser Arbeit bzw. in Bachelorarbeiten, die dieser Arbeit angegliedert waren, hergestellt.

Name des Konstrukts	Ursprungsvektor		Insert	Zielvektor		tag	Ursprung
	Name	Enzyme		Name	Enzyme		
<i>PTI1-1:HIS</i>	<i>pGEM-PTI1-1<sub>HIS</sub></i>	<i>SpeI/XhoI</i>	<i>PTI1-1</i> ORF ohne Stopp	<i>pET30a(+)</i>	<i>XbaI/XhoI</i>	C-ter. HIS	<i>Diese Arbeit</i>
<i>PTI1-2:HIS</i>	<i>pGEM-PTI1-2<sub>HIS</sub></i>	<i>NdeI/XhoI</i>	<i>PTI1-2</i> ORF ohne Stopp	<i>pET30a(+)</i>	<i>NdeI/XhoI</i>	C-ter. HIS	<i>Diese Arbeit</i>
<i>PTI1-3:HIS</i>	<i>pGEM-PTI1-3<sub>HIS</sub></i>	<i>NdeI/NotI</i>	<i>PTI1-3</i> ORF ohne Stopp	<i>pET30a(+)</i>	<i>NdeI/NotI</i>	C-ter. HIS	WITTFOTH (2009)
<i>PTI1-5:HIS</i>	<i>pGEM-PTI1-5<sub>HIS</sub></i>	<i>NdeI/XhoI</i>	<i>PTI1-5</i> ORF ohne Stopp	<i>pET30a(+)</i>	<i>NdeI/XhoI</i>	C-ter. HIS	<i>Diese Arbeit</i>
<i>PTI1-6:HIS</i>	<i>pGEM-PTI1-6<sub>HIS</sub></i>	<i>XbaI/NotI</i>	<i>PTI1-6</i> ORF ohne Stopp	<i>pET30a(+)</i>	<i>XbaI/NotI</i>	C-ter. HIS	<i>Diese Arbeit</i>
<i>AGC1-5:HIS</i>	<i>TOPO-AGC1-5<sub>HIS</sub></i>	<i>NdeI/XhoI</i>	<i>AGC1-5</i> ORF ohne Stopp	<i>pET30a(+)</i>	<i>NdeI/XhoI</i>	C-ter. HIS	LINNEMANN (2011)
<i>AGC1-7:HIS</i>	<i>TOPO-AGC1-7<sub>HIS</sub></i>	<i>NdeI/NotI</i>	<i>AGC1-7</i> ORF ohne Stopp	<i>pET30a(+)</i>	<i>NdeI/NotI</i>	C-ter. HIS	LINNEMANN (2011)
<i>OXI1:HIS</i>	<i>TOPO-OXI1<sub>HIS</sub></i>	<i>NdeI/NotI</i>	<i>OXI1</i> ORF ohne Stopp	<i>pET30a(+)</i>	<i>NdeI/NotI</i>	C-ter. HIS	<i>Diese Arbeit</i>
<i>PDK1.2:HIS</i>	<i>pGEM-PDK1.2<sub>HIS</sub></i>	<i>NheI/SalI</i>	<i>PDK1.2</i> ORF ohne Stopp	<i>pET30a(+)</i>	<i>XbaI/NotI</i>	C-ter. HIS	<i>Diese Arbeit</i>
<i>GST:AGC1-5</i>	<i>pGEM<sub>-GST</sub>-AGC1-5</i>	<i>XbaI/XhoI</i>	<i>AGC1-5</i> ORF mit Stopp	<i>pET41b(+)</i>	<i>SpeI/XhoI</i>	N-ter. GST	<i>Diese Arbeit</i>
<i>GST:AGC1-7</i>	<i>pGEM<sub>-GST</sub>-AGC1-7</i>	<i>SpeI/XhoI</i>	<i>AGC1-7</i> ORF mit Stopp	<i>pET41b(+)</i>	<i>SpeI/XhoI</i>	N-ter. GST	<i>Diese Arbeit</i>
<i>GST:PDK1.2</i>	<i>pGEM<sub>-GST</sub>-PDK1.2</i>	<i>SpeI/XhoI</i>	<i>PDK1.2</i> ORF mit Stopp	<i>pET41b(+)</i>	<i>SpeI/XhoI</i>	N-ter. GST	<i>Diese Arbeit</i>

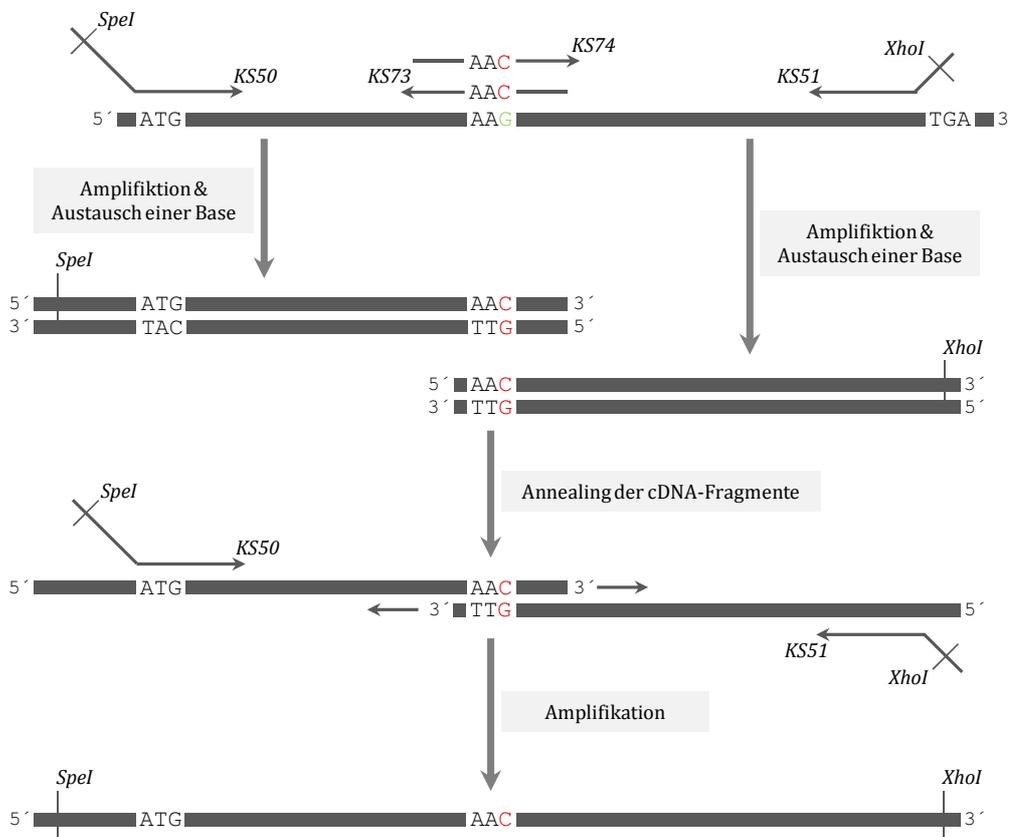
### 3.3.5.1 Klonierung von phosphorylierungsdefizienten Kinase-Mutanten

Um die Kinasen *PTI1-1*, *PTI1-2*, *PTI1-3*, *AGC1-5* und *AGC1-7* in *in vitro* Interaktions-Kinase-Assays (3.2.5.5.2) als Substrat verwenden zu können, wurden zusätzlich die phosphorylierungsdefizienten Mutanten *PTI1-1<sup>K96N</sup>*, *PTI1-2<sup>K99N</sup>*, *PTI1-3<sup>K141N</sup>*, *AGC1-5<sup>K214R</sup>* und *AGC1-7<sup>K175R</sup>* durch gerichtete Mutagenese kloniert. Dafür wurde ein hochkonservierter Lysinrest in der Kinasesubdomäne II gegen Asparagin im Falle der *PTI1*-Kinasen oder gegen Arginin im Falle der *AGC*-Kinasen ausgetauscht. Die dazu verwendeten Klonierungsstrategien werden in den folgenden Abschnitten beschrieben. Eine Übersicht über die Klonierung der einzelnen Konstrukte gibt die Tabelle 3.3-5.

#### ***Klonierung von PTI1-1<sup>K96N</sup>, PTI1-2<sup>K99N</sup>, AGC1-5<sup>K214R</sup> und AGC1-7<sup>K175R</sup>***

Die Klonierung der inaktiven Kinase-Mutanten von *PTI1-1*, *PTI1-2*, *AGC1-5* und *AGC1-7* wird nachfolgend am Beispiel von *PTI1-1<sup>K96N</sup>* beschrieben (Abbildung 3-6). Der Aminosäureaustausch von Lysin zu Asparagin an Position 96 (*PTI1-1<sup>K96N</sup>*) erfolgte durch

zwei PCR-Reaktionen mit den Primerpaaren KS50/KS73 und KS74/KS51, welche die zwei Teilstücke des ORFs amplifizieren. Die mutierte Tripletts-Sequenz AAC (Asparagin) ist anstelle von AAG (Lysin) in den Primern KS73 und KS74 enthalten. Als Template für die beiden PCRs wurde der Vektor *pGEM-PTI1-1* verwendet. Nach erfolgreicher Amplifikation der beiden Fragmente wurden diese in einer weiteren PCR durch Anlagerung der komplementären Überhänge im mutierten Bereich als Primer verwendet, um den ORF zu vervollständigen. Zur Amplifikation des veränderten ORFs wurden in dieser PCR-Reaktion die Primer KS50 und KS51 eingesetzt. Über einen Restriktionsverdau mit den Endonukleasen *SpeI* und *XhoI* wurde das Konstrukt *PTI1-1<sup>K96N</sup>* anschließend in den *pet30a(+)*-Vektor ligiert.

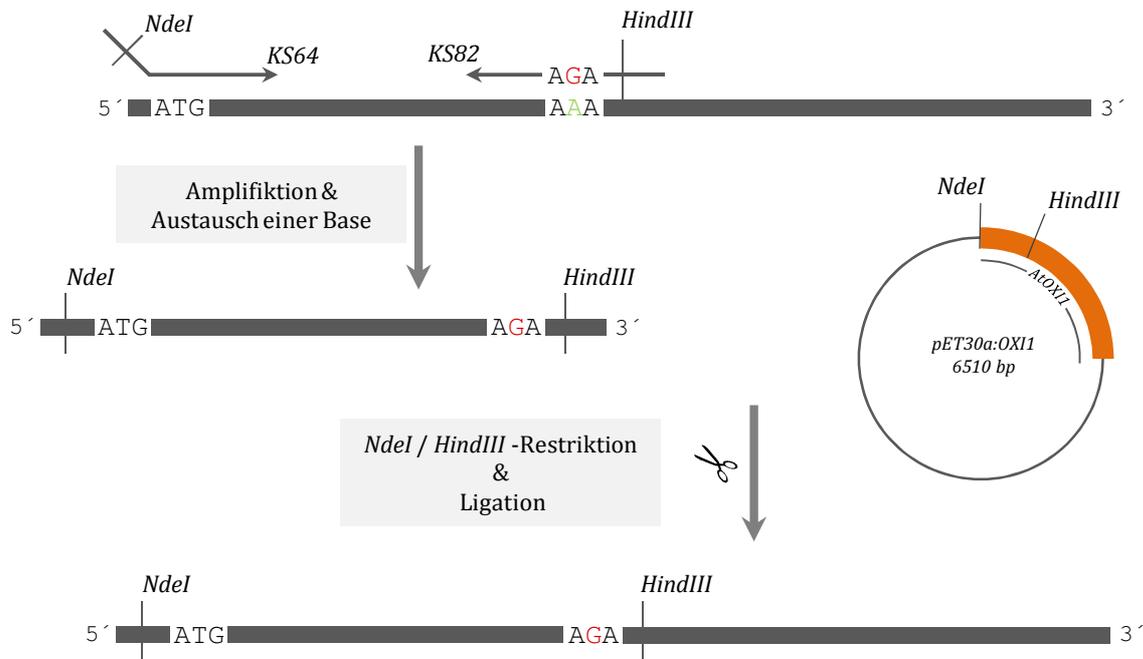


**Abbildung 3-6: Generierung von *PTI1-1<sup>K96N</sup>* durch Punktmutagenese.** Für den Austausch von Lysin durch Asparagin an Position 96 wurde der codierende Bereich des Gens in zwei Teilstücken amplifiziert und durch die Primer KS73 und KS74 die Mutation von Guanin zu Cytosin eingebracht. In einer weiteren PCR-Reaktion wurden die cDNA-Fragmente aneinandergelagert, um mit den Primern KS50/KS51 den mutierten ORF des Gens vollständig zu amplifizieren.

### Klonierung von *OXI1<sup>K45R</sup>* und *PTI1-3<sup>K141N</sup>*

Die Herstellung der phosphorylierungsdefizienten Mutanten von *OXI1* und *PTI1-3* (*OXI1<sup>K45R</sup>* und *PTI1-3<sup>K141N</sup>*) durch Punktmutagenese wird im Folgenden am Beispiel von *OXI1<sup>K45R</sup>*

erläutert (Abbildung 3-7). Die Aminosäure an Position 45 im Wildtyp *OX11*, ein Lysin, wurde durch Arginin ersetzt. Hierzu wurde mit dem Primerpaar KS64/KS82 ein modifizierter 5'-Bereich des *OX11*-ORF amplifiziert, in dem ein Adenin gegen ein Guanin ersetzt wurde. Der Austausch des Wildtyp 5'-ORFs im *pET30a:OX11* -Vektor durch das veränderte Teilstück erfolgte über die Restriktionsschnittstellen *NdeI* und *HindIII*.



**Abbildung 3-7: Generierung von *OX11<sup>K45R</sup>* durch Punktmutagenese.** Die Mutation von Lysin<sup>45</sup> zu Arginin<sup>45</sup> wurde durch Amplifikation des ersten Abschnitts des 5'-ORFs durch den Primer KS82 vermittelt. Der Austausch des unmutierten 5'-ORFs gegen das mutierte Fragment im *pET30a:AtOX11*-Vektor erfolgte über die Restriktionsschnittstellen *NdeI* und *HindIII*.

**Tabelle 3.3-5: Klonierung der phosphorylierungsdefizienten Kinase-Mutanten mittels Punktmutation.** K: Lysin, N:Asparagin, R: Arginin, aa: Aminosäure. Ursprungsvektoren sind in Tabelle A 2-3 in Anhang A2 beschrieben, Zielvektoren in Tabelle 3.1-2 bzw. Tabelle 3.3-4. Primersequenzen befinden sich im Anhang A1.

Name des Konstrukts	Ursprungsvektor Name	Enzyme	Insert	Primer		Zielvektor Name	Enzyme	Ursprung
				for	rev			
<i>PTI1-1<sup>K96N</sup>:HIS</i>	<i>TOPO-PTI1-1<sup>K96N</sup><sub>HIS</sub></i>	<i>SpeI/XhoI</i>	<i>PTI1-1<sup>K96N</sup></i> ORF ohne Stopp, Punktmutation Pos. 96 (K → N)	KS50	KS73	<i>pET30a(+)</i>	<i>XbaI/XhoI</i>	Diese Arbeit
				KS74	KS51			
<i>PTI1-2<sup>K99N</sup>:HIS</i>	<i>TOPO-PTI1-2<sup>K99N</sup><sub>HIS</sub></i>	<i>NdeI/XhoI</i>	<i>PTI1-2<sup>K99N</sup></i> ORF ohne Stopp, Punktmutation Pos. 99 (K → N)	KS52	KS75	<i>pET30a(+)</i>	<i>NdeI/XhoI</i>	Diese Arbeit
				KS76	KS53			
<i>PTI1-3<sup>K141N</sup>:HIS</i>	<i>TOPO-PTI1-3<sup>K141N</sup><sub>HIS</sub></i>	<i>NdeI/HindIII</i>	<i>PTI1-3<sup>K141N</sup></i> 5'-ORF Teil I (aa 1-146), Punktmutation Pos. 141 (K → N)	KS54	KS77	<i>AtPTI1-3:HIS</i>	<i>NdeI/HindIII</i>	LINDEMANN (2011)
<i>AGC1-5<sup>K214R</sup>:HIS</i>	<i>TOPO-AGC1-5<sup>K214R</sup><sub>HIS</sub></i>	<i>NdeI/XhoI</i>	<i>AGC1-5<sup>K214R</sup></i> ORF ohne Stopp, Punktmutation Pos. 214 (K → R)	KS60	KS78	<i>pET30a(+)</i>	<i>NdeI/XhoI</i>	Diese Arbeit
				KS79	KS61			
<i>AGC1-7<sup>K175R</sup>:HIS</i>	<i>pGEM-AGC1-7<sup>K175R</sup><sub>HIS</sub></i>	<i>NdeI/NotI</i>	<i>AGC1-7<sup>K175R</sup></i> ORF ohne Stopp, Punktmutation Pos. 175 (K → R)	KS62	KS80	<i>pET30a(+)</i>	<i>NdeI/NotI</i>	Diese Arbeit
				KS81	KS63			
<i>OX11<sup>K45R</sup>:HIS</i>	<i>TOPO-OX11<sup>K45R</sup><sub>HIS</sub></i>	<i>NdeI/AflII</i>	<i>OX11<sup>K45R</sup></i> 5'-ORF Teil I (aa 1-49), Punktmutation Pos. 45 (K → R)	KS64	KS82	<i>AtOX11:HIS</i>	<i>NdeI/AflII</i>	Diese Arbeit

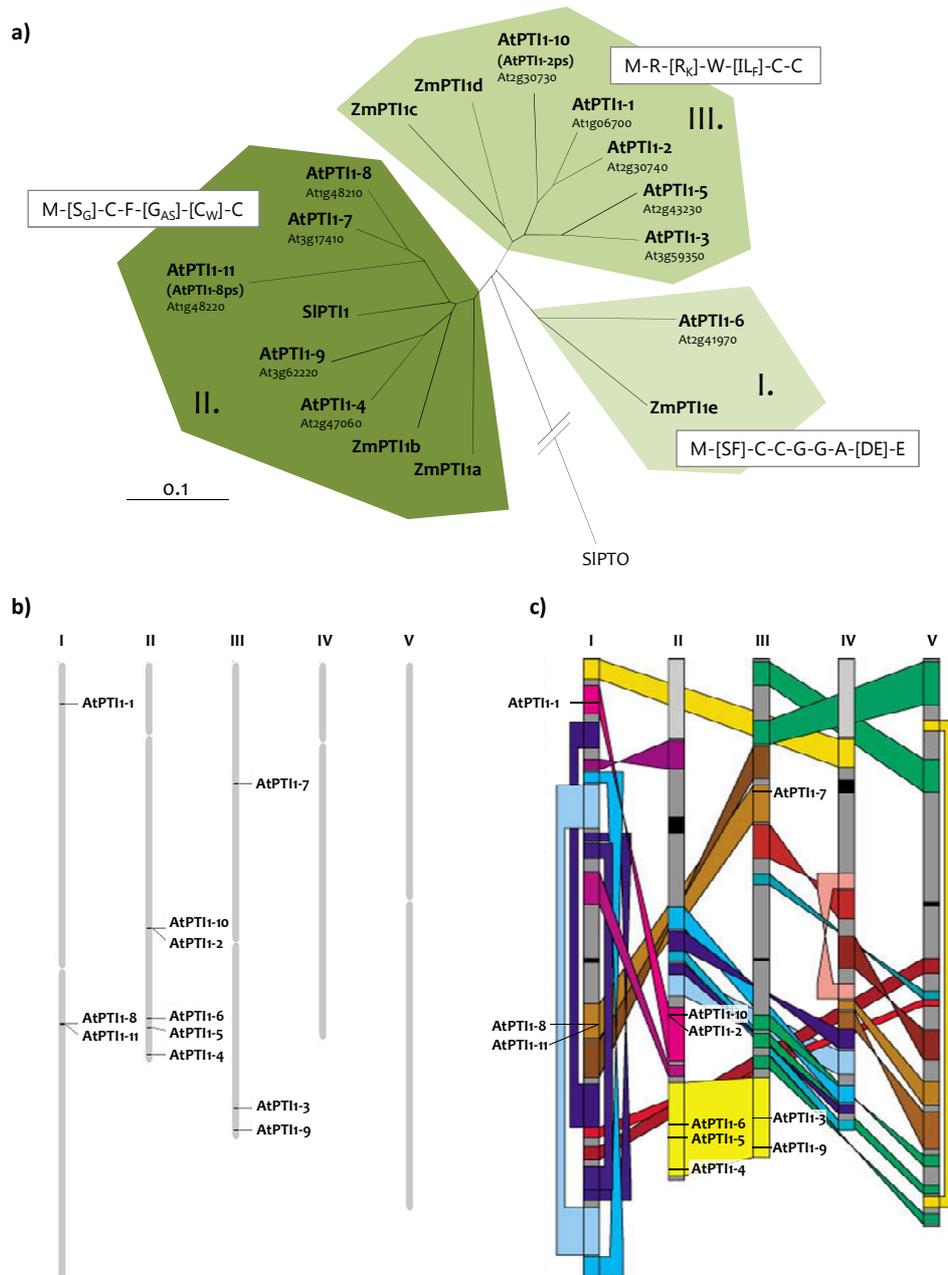
## 4. Ergebnisse

### 4.1 Analyse der *PTI1*-Familie in *Arabidopsis*

Die *PTI1*-Genfamilie ist eine bei mono- und dikotyledonen Pflanzen vertretene Familie, deren Mitglieder bereits in Mais, Reis, Soja, Tabak und Tomate identifiziert wurden. Ihre Produkte, die *PTI1*-Kinasen, gehören zu den Serin/Threonin-Kinasen. In *Arabidopsis* konnten mittels Datenbankrecherche elf *PTI1*-homologe Gene identifiziert werden (PINTO 2005). Anschließend an die bereits von ANTHONY *et al.* (2006) benannten *Arabidopsis* *PTI1*-Kinasen *PTI1-1*, *PTI1-2* und *PTI1-3* wurden die restlichen *PTI1*-Kinasen aus *Arabidopsis* als *PTI1-4* bis *PTI1-11* bezeichnet.

Die *PTI1*-Kinasen zeichnen sich sowohl durch eine hochkonservierte Kinase-Domäne als auch durch einen variablen aber häufig artübergreifend konservierten N-Termini aus. Anhand von Gemeinsamkeiten in der Aminosäuresequenz wurden die *PTI1*-Kinasen in drei Subfamilien eingeteilt (HERRMANN *et al.* 2006). Die *PTI1*-Kinasen aus *Arabidopsis* verteilen sich dabei, wie die *PTI1*-Kinasen aus Mais, auf alle drei Subfamilien (Abbildung 4-1 a).

Die Loci der *PTI1*-Gene im *Arabidopsis*-Genom sind in Abbildung 4-1 b dargestellt. Die elf *PTI1*-Gene sind auf den ersten drei der fünf Chromosomen (*C I-V*) verteilt und liegen teilweise in Clustern vor, die meist aus zwei *PTI1*-Genen bestehen. Da ca. 60% des *Arabidopsis*-Genoms aus duplizierten Segmenten besteht, ist diese Anordnung vermutlich aufgrund von Duplikationen großer Bereiche des Genoms und weiteren Umstrukturierungen entstanden (ARABIDOPSIS GENOME INITIATIVE 2000; BLANC *et al.* 2000). In Abbildung 4-1 c sind die duplizierten und daher syntenischen Bereiche des *Arabidopsis*-Genoms einschließlich der Loci der *PTI1*-Gene dargestellt. Die Lage der *PTI1*-Gene belegt, dass sich die meisten dieser Gene auf syntenischen, duplizierten Genombereichen befinden. So liegen z.B. *PTI1-1* und *PTI1-2/PTI1-10* auf Bereichen der Chromosomen *C I* und *C II*, die durch Duplikation auseinander hervorgegangen sind. Dies wird exakt durch die Ähnlichkeit der Aminosäuresequenzen bestätigt, da diese zwischen den drei Sequenzen am größten ist (Abbildung 4-1 a). In gleicher Weise bilden auch *PTI1-7* (*C III*) und *PTI1-8/PTI1-11* (*C I*),



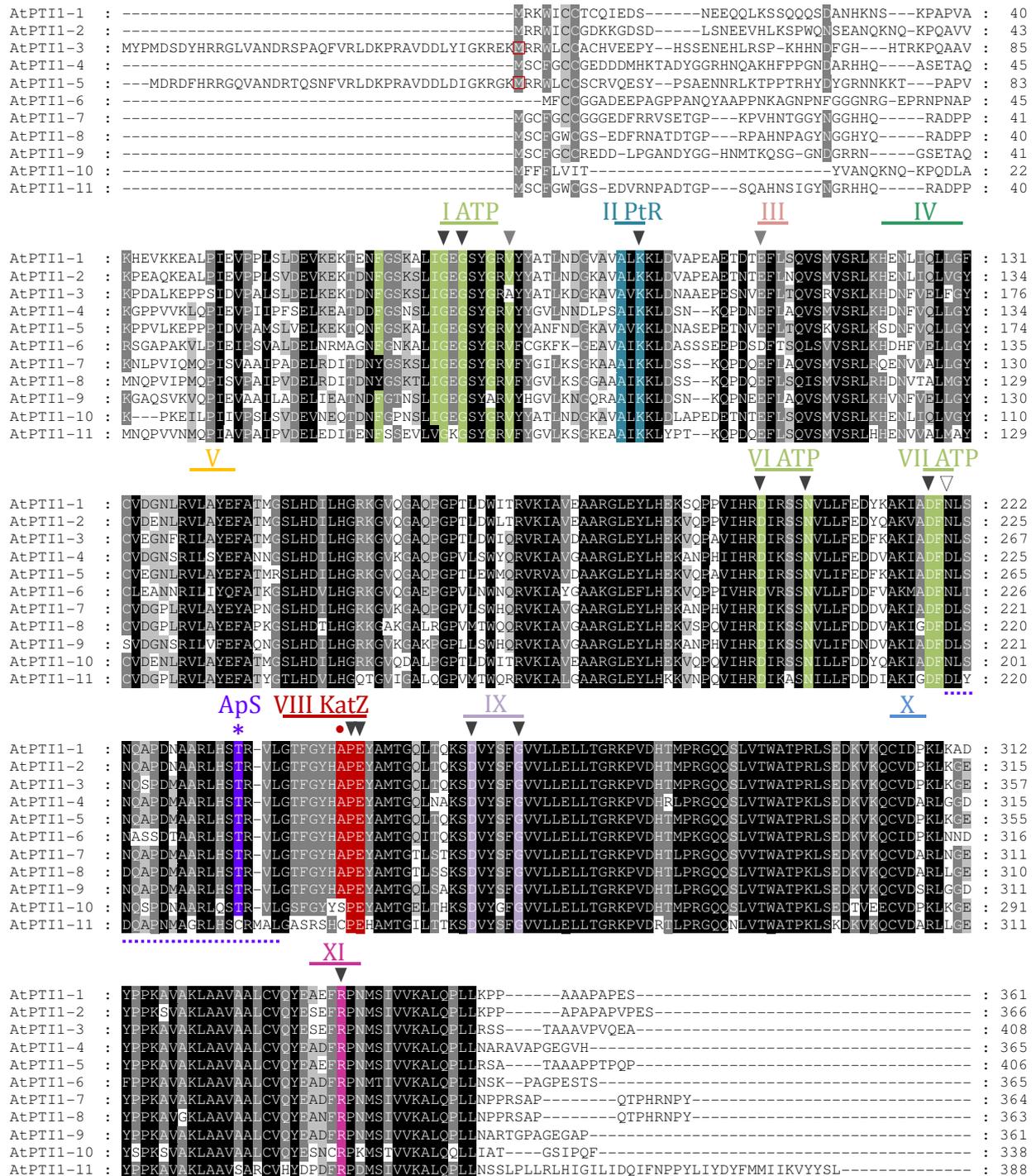
**Abbildung 4-1: Arabidopsis PTI1-Familie** a) Phylogenie PTI1-Familien aus *Arabidopsis* und Mais. Die Einteilung der PTI1-Kinasen gemäß ihrer Aminosäuresequenzen in die drei Subfamilien erfolgte nach HERRMANN *et al.* (2006). ps = Pseudogen. Als Außengruppe dient die PTO-Kinase aus Tomate (SIPTO). Die Konsensussequenz der N-Termini ist für die Subfamilien angezeigt: hochkonservierte Aminosäurereste sind fett gedruckt während in Klammern angegebene Aminosäuren weniger konserviert sind. Aminosäurereste, die an einer bestimmten Position selten auftreten, sind mit tiefgestellten Buchstaben gekennzeichnet. b) Genom-Karte von *Arabidopsis* mit eingezeichneten Loci der *PTI1*-Gene. Die Karte wurde mit dem *Chromosome Map Tool* von TAIR erstellt. c) Synteniekarte der duplizierten Teilregionen im *Arabidopsis* Genom einschließlich der *PTI1*-Gene, entnommen aus ARABIDOPSIS GENOME INITIATIVE (2000). Farbige Bänder verbinden syntenische, duplizierte Segmente. Duplizierte Segmente mit reverser Orientierung sind mit verdrehten Bändern verbunden. Die Längen der Chromosomen in b) und c) sind nicht maßstabsgetreu, da die exakten Längen der Chromosomen bislang noch nicht absolut feststehen (TAIR) und je nach Methodik variiert.

*PTI1-3* (C III) und *PTI1-5* (C II) sowie *PTI1-9* (C III) und *PTI1-4* (C II) syntenische Gruppen. Allein *PTI1-6* scheint in dieser Beziehung monogenisch zu sein, was sich in der isolierten Verwandtschaftsstellung in der Subfamilie I widerspiegelt (Abbildung 4-1 a). Diese Daten zeigen, dass nahezu die Hälfte der *PTI1*-Gene auf duplizierten Genombereichen lokalisiert sind. Aus diesem Grund ist für die Mitglieder der Arabidopsis *PTI1*-Genfamilie sowohl ein monophyletischer Ursprung als auch eine evolutionär eher junge Vervielfachung der Gene zu vermuten.

#### 4.1.1 Analyse der abgeleiteten Aminosäuresequenzen der Arabidopsis *PTI1*-Proteinkinasen

Die Aminosäuresequenzen der elf Arabidopsis *PTI1*-Kinasen wurden aus den jeweiligen cDNA-Sequenzen der Datenbank *TAIR*<sup>4</sup> abgeleitet und sind in Abbildung 4-2 gegenübergestellt. Die Variabilität der N-Termini ist aus dem Alignment der *PTI1*-Kinasen ersichtlich, wobei vor allem *PTI1-3* und *PTI1-5* durch ihren längeren N-Terminus hervorstechen. Für die *PTI1*-Kinasen aus Arabidopsis konnten die für Proteinkinasen charakteristischen und konservierten Subdomänen I bis XI nach HANKS *et al.* (1988) identifiziert werden (römische Ziffern). Die Subdomänen I, II, VI, VII, VIII und IX sind hochkonserviert und weisen entweder katalytische Funktionen auf oder sind für die Zusammenführung jeweiliger Reaktionszentren verantwortlich. Die weniger stark konservierten Subdomänen III, IV, V, X und XI sind hingegen vermutlich bei der Ausbildung einer funktionellen Sekundärstruktur notwendig, welche die aktiven Zentren zueinander ausrichtet (HERRMANN *et al.* 2006). In Proteinkinasen wurden von HANKS *et al.* (1988) und HANKS UND QUINN (1991) 14 hochkonservierte Aminosäuren ausgehend von einem Vergleich der Aminosäuresequenzen verschiedener Proteinkinasen aus unterschiedlichen Organismen bestimmt. 13 dieser 14 hochkonservierten Aminosäuren konnten in den At*PTI1*-Kinasen, wie zuvor in Zm*PTI1a* von HERRMANN *et al.* (2006), identifiziert werden (Abbildung 4-2, Pfeile). Lediglich *PTI1-3* und *PTI1-6* weisen Unterschiede auf. *PTI1-3* besitzt anstelle eines Valins an Position 127 ein Alanin und *PTI1-6* an Position 113 einen Asparaginsäurerest anstelle eines Glutaminsäurerestes. Das in Subdomäne VII hochkonservierte Glycin der Konsensussequenz DFG ist bei den At*PTI1*-Kinasen der Subfamilie II, wie bei Sl*PTI1*, Zm*PTI1a* und Zm*PTI1b*, die ebenfalls zu dieser Subfamilie gehören, durch eine Asparaginsäure ersetzt. Die restlichen At*PTI1*-Kinasen besitzen an

<sup>4</sup> The Arabidopsis Information Resource; [www.arabidopsis.org](http://www.arabidopsis.org)



**Abbildung 4-2: Aminosäurealignment der elf PTI1-Kinasen aus *Arabidopsis*.** Das Alignment wurde mit *ClustalX2* erstellt. Die dargestellten Aminosäuresequenzen sind abgeleitet aus den jeweiligen cDNA-Sequenzen aus *TAIR*. Die charakteristischen Subdomänen der Proteinkinasen I bis XI nach HANKS *et al.* (1988) sind farbig markiert und der konservierte Bereich der Aminosäuresequenz schwarz hinterlegt. Pfeile markieren die Positionen der 14 hochkonservierten Aminosäuren (nach HANKS *et al.* 1988 und HANKS & QUINN 1991). Gefüllte Pfeile kennzeichnen die hochkonservierten Aminosäuren, der offene Pfeile die abweichenden Aminosäuren. ATP = ATP-Bindungsstelle, PtR = Phosphotransfer-Reaktion, KatZ = Katalytisches Zentrum, ApS = Autophosphorylierungsstelle (\*). Rot hinterlegter Bereich im KatZ kennzeichnet den Indikator Bereich des KatZ. 20 Aminosäurereste stromaufwärts der Subdomäne VIII sind mit einer gepunkteten Linie unterstrichen. Der alternative Translationsstart in den Sequenzen von PTI1-3 und PTI1-5 ist durch einen roten Rahmen gekennzeichnet.

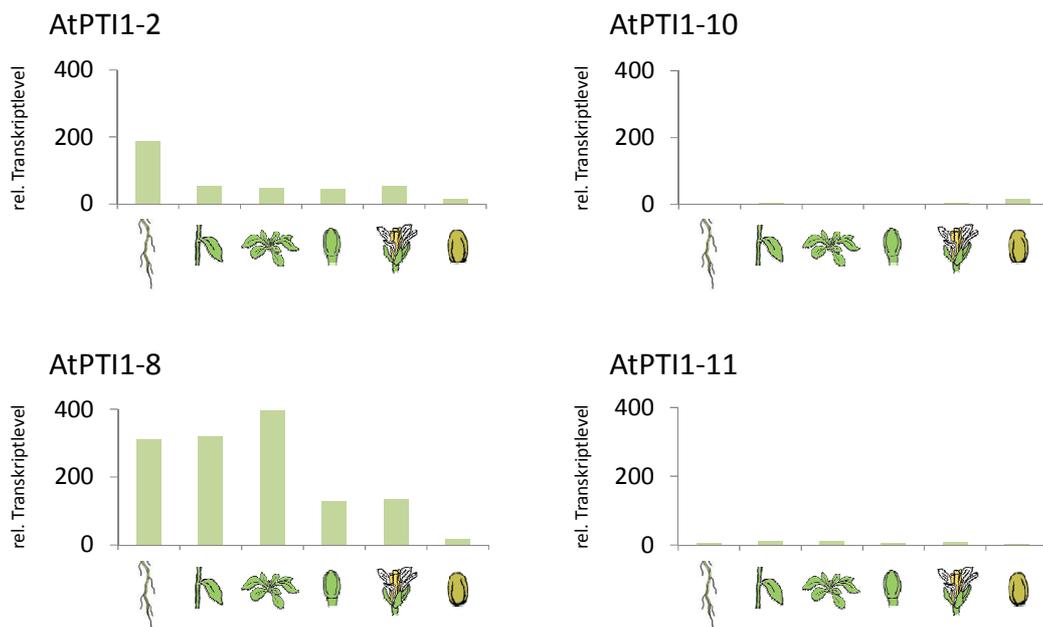
dieser Stelle, wie bereits ZmPTI1c, d und e, eine Substitution zu Asparagin (Abbildung 4-2, offener Pfeil).

Als Hauptstelle der *trans*- und Autophosphorylierung der SIPTI1-Kinase aus Tomate wird der Threoninrest an Position 233 stromaufwärts der Subdomäne VIII beschrieben (SESSA *et al.* 2000). Grundsätzlich ist bei Proteinkinasen mit Autophosphorylierungsaktivität die Phosphorylierungsstelle innerhalb von 20 Aminosäuren stromaufwärts dieser Subdomäne zu finden. In der Aminosäuresequenz von zehn der elf PTI1-Kinasen aus *Arabidopsis* liegt ein Threoninrest vier Aminosäurereste stromaufwärts der Subdomäne VIII vor (Abbildung 4-2, \*). Dieser Threoninrest könnte daher die Autophosphorylierungsstelle der AtPTI1-Kinasen sein. Die Ausnahme stellt PTI1-11 dar, welches innerhalb dieser 20 Aminosäuren keinen Threoninrest besitzt. Zudem weisen PTI1-10 und PTI1-11 im Indikator Bereich des Katalytischen Zentrums in Subdomäne VIII Unterschiede zu den restlichen *Arabidopsis* PTI1-Kinasen sowie aller bislang bekannter PTI1-Kinasen auf. PTI1-10 besitzt ein Serin anstelle eines Alanins an der ersten Position dieses Bereiches, entspricht damit jedoch dem Konsensus von (A<sub>GPS</sub>)-(P<sub>AIL</sub>)-E für Proteinkinasen (CHEE *et al.* 1989). PTI1-11 hingegen weist eine Substitution des Alanins zu Cystein auf und weicht somit von der Konsensussequenz ab.

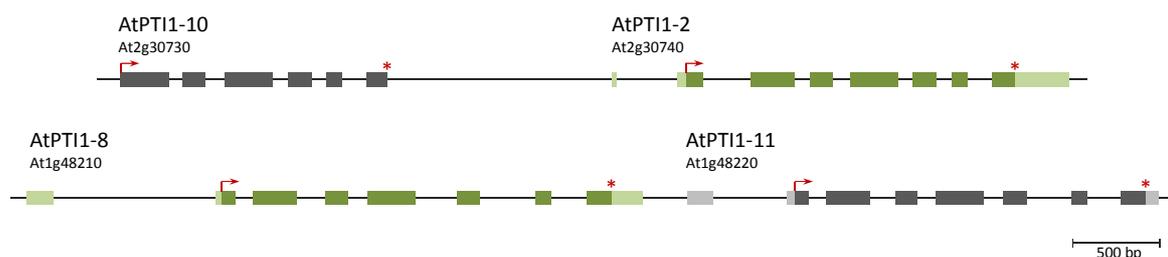
Bedingt durch die Substitutionen in Subdomäne VIII sowie der fehlenden Autophosphorylierungsstelle von PTI1-11 ist diese PTI1-Kinase vermutlich nicht funktionell. PTI1-10 weist ebenfalls mehrere Abweichungen zu den Konsensussequenzen der übrigen PTI1-Kinasen auf, jedoch lässt dies zunächst keine Rückschlüsse auf die Funktionalität der Kinase zu. Um weitere Hinweise für die Funktionalität von PTI1-10 sowie PTI1-11 zu erhalten, wurden die Daten eines von SCHMID *et al.* (2005) durchgeführten Microarray-Experiments analysiert. Diese zeigen, dass die Gene *PTI1-10* und *PTI1-11* nahezu keine Expression aufweisen (Abbildung 4-3a), was die Vermutung nahelegt, dass es sich bei diesen Genen um funktionslose Gene handelt. Weitere Hinweise gibt die Lokalisation der Gene *PTI1-10* bzw. *PTI1-11* und *PTI1-2* bzw. *PTI1-8*, da diese *PTI1*-Gene auf den jeweiligen Chromosomen direkt nebeneinander liegen (Abbildung 4-3b) und deren Produkte die höchste Homologie zueinander teilen (86 % bzw. 79 % Identität auf Proteinebene). PTI1-2 und PTI1-8 zeigen im Gegensatz zu PTI1-10 und PTI1-11 in den im Rahmen dieser Arbeit analysierten Geweben eine schwache ubiquitäre Expression und sind demnach höchstwahrscheinlich funktionsfähige Gene (Abbildung 4-3a). Aufgrund der Lage zueinander und der hohen Sequenzähnlichkeit kann vermutet werden, dass die Gene *PTI1-2* und *PTI1-10* bzw. *PTI1-8* und *PTI1-11* durch Genduplikation entstanden sind. Jeweils eines

der Duplikate (*PTI1-10* und *PTI1-11*) könnte z.B. durch fehlenden Selektionsdruck seine Funktionalität verloren haben. Zusammengenommen ist anzunehmen, dass es sich bei den Genen *PTI1-10* und *PTI1-11* um funktionslose Pseudogene (*ps*) handelt, weshalb sie entsprechend ihres Ursprungs in den weiteren Kapiteln als *PTI1-2ps* bzw. *PTI1-8ps* bezeichnet werden.

a)



b)



**Abbildung 4-3: Analyse der *PTI1*-Gene *PTI1-2*, *PTI1-8*, *PTI1-10* und *PTI1-11*** a) *In silico* Auswertung von Microarraydaten verschiedener Gewebe. Dargestellt ist der relative Transkriptlevel in Wurzeln, Stängelblättern, Rosettenblättern, Knospen, reifen Blüten und reifen Pollen (von links nach rechts). Microarraydaten von SCHMID *et al.* (2005) entstammen dem *eFP Browser*. b) Schematische Darstellung der Exon-Intron-Struktur und Lage der jeweiligen Gene zueinander. Die Gene *PTI1-10* und *PTI1-11* sind vermutlich durch Genduplikation aus *PTI1-2* bzw. *PTI1-8* oder die Gene *PTI1-2* bzw. *PTI1-8* sind aus ihnen entstanden. Exons sind als Boxen abgebildet. Der offene Leserahmen (*open reading frame*, ORF) der Gene *PTI1-10* und *PTI1-11* ist in dunkelgrau, während der ORF der Gene *PTI1-2* und *PTI1-8* in dunkelgrün dargestellt ist. Die untranslatierten Regionen (*untranslated region*, UTR) der Gene *PTI1-10* und *PTI1-11* sind in hellgrau, die der Gene *PTI1-2* und *PTI1-8* in hellgrün dargestellt. Translationsstart und -ende sind durch einen Pfeil bzw. einen Stern gekennzeichnet.

Aufgrund der Übereinstimmung der Konsensussequenz (G-T/S-F-G-Y-H-A-P-E) der neun übrigen PTI1-Kinasen mit dem Konsensus für Serin/Threonin-Proteinkinasen (G-T/S-X-X-Y/F-X-A-P-E) in Subdomäne VIII sowie der Identifizierung der Subdomänen I bis XI und der 13 von 14 hochkonservierten Aminosäuren kann angenommen werden, dass es sich bei diesen neun PTI1-Kinasen um funktionsfähige Serin/Threonin-Proteinkinasen handelt. Die weiteren Analysen wurden daher mit diesen neun PTI1-Kinasen fortgeführt.

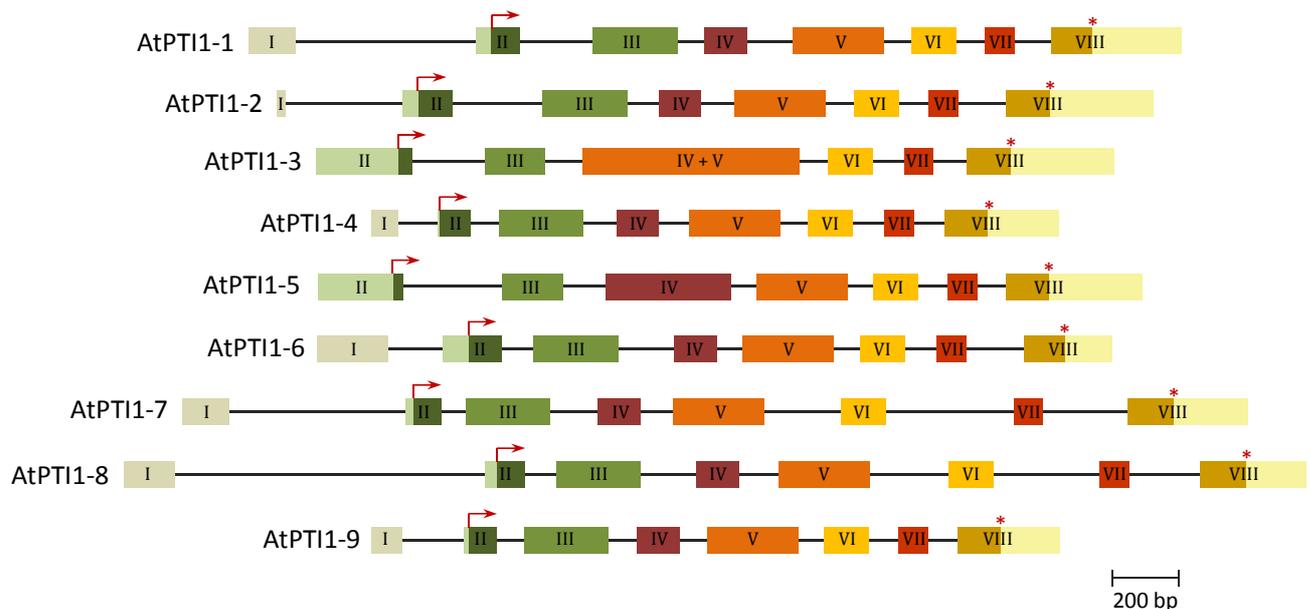
#### 4.1.2 Genstruktur der *Arabidopsis* PTI1-Gene

Mittels *in silico* Auswertung der genomischen Sequenzen konnte die Intron-Exon-Struktur der *AtPTI1*-Gene bestimmt werden. Eine schematische Darstellung der genomischen Sequenzen dieser Gene befindet sich in Abbildung 4-4. Die meisten der *AtPTI1*-Gene besitzen die bereits für *ZmPTI1*-Gene bestimmte Gliederung in acht Exons und sieben Introns (HERRMANN *et al.* 2006; REHDERS 2010). *PTI1-3* und *PTI1-5* bilden mit sechs bzw. sieben Exons die Ausnahme. Bei diesen Genen fehlt vermutlich das Exon I, welches bei den *PTI1*-Genen üblicherweise im 5'-UTR liegt. Bisher ungeklärt ist, ob es sich hierbei um einen Fehler in der Vorhersage handelt und ob das zusätzliche Exon an Position I aufgrund zu geringer Sequenzähnlichkeit zu den übrigen *PTI1*-Genen nicht gefunden wird. Der Translationsstart von *PTI1-3* und *PTI1-5* befindet sich somit im Exon I und nicht im Exon II. Der Übersicht halber wurden die Exons jedoch nach ihrer phylogenetischen Natur benannt, so dass *PTI1-3* und *PTI1-5* mit dem Exon II anfangen, in dem auch ihr Translationsstart liegt. Die übrigen *AtPTI1*-Gene besitzen das Exon I und ihr Translationsstart liegt, wie bei den *ZmPTI1*-Genen, im Exon II. Das Translationsende aller *AtPTI1*-Gene befindet sich im letzten Exon und gleicht ebenfalls der Position in den *ZmPTI1*-Genen.

Die Gliederung der meisten *AtPTI1*-Gene stimmt nicht nur im allgemeinen Aufbau überein, sondern die Exons IV, V, VI und VII weisen auch exakt gleichen Längen auf (Tabelle A 3-1, Anhang A3). Abweichungen kommen im Exon IV von *PTI1-5* sowie im Exon IV+V von *PTI1-3* vor, welche größer sind als die der anderen *PTI1*-Gene. Ein Sequenzvergleich der gDNA von *PTI1-3* mit der von *PTI1-5* (83% Identität der Aminosäuresequenz) belegt, dass das Intron zwischen Exon IV und V bei *PTI1-3* fehlt und Exon IV und V hier ein fusioniertes Exon bilden (IV+V). Geringe Unterschiede in der Länge zeigen sich hingegen bei Exon III, in den meisten Fällen handelt es sich jedoch um geringe Abweichungen zwischen den einzelnen *AtPTI1*-Genen. Die Größen der Exons III, IV, V, VI und VII stimmen dabei aber nicht nur innerhalb der

*AtPTI1*-Gene sondern mit geringen Unterschieden auch mit denen der *ZmPTI1*-Gene überein (Tabelle A 3-1, Anhang A3).

Die hohe Ähnlichkeit in der Exon-Struktur der *PTI1*-Gene aus *Arabidopsis* und Mais stützt die Annahme, dass diese Gene eine gemeinsame Familie bilden, die sich aus Vertretern der Mono- und Dikotyledonen zusammensetzt und auf einen gemeinsamen Ursprung zurück geht.



**Abbildung 4-4: Intron-Exon-Struktur der neun *PTI1*-Gene aus *Arabidopsis*.** Exons sind mit römischen Zahlen nummeriert. Translationsstart und -ende sind durch einen Pfeil bzw. einen Stern gekennzeichnet.

#### 4.1.3 Expressionsanalyse der *Arabidopsis* PTI1-Proteinkinasen

Wie bereits beschrieben, unterscheiden sich einige der bislang untersuchten PTI1-Kinasen in ihrer postulierten Funktion (vgl. 2.5). Die PTI1-Kinase aus Tomate ist z.B. in Prozessen der Pathogenabwehr involviert, während die *ZmPTI1a*-Kinase mit der Fitness von Pollen in Zusammenhang gebracht wird (ZHOU *et al.* 1995; HERRMANN *et al.* 2006). Für die Funktionen der *AtPTI1*-Kinasen liegen ebenfalls erste Daten vor. ANTHONY *et al.* (2006), zeigten, dass die Aktivität von PTI1-2 in Gegenwart von Phosphorsäure (PA), Xylanase, Flagellin und  $H_2O_2$  anstieg, während PTI1-1 und PTI1-3 in diesen Experimenten keine Veränderung ihrer Aktivität zeigten. Darüber hinaus berichteten FORZANI *et al.* (2011) von einem Anstieg der PTI1-4-Transkriptmenge als Reaktion auf verschiedene Stresse wie  $H_2O_2$ , Verwundung und

Cellulase-Behandlung. Zudem konnte für PTI1-4 eine Expression in Wurzeln und Keimlingsblättern sowie im Torpedostadium des Embryos nachgewiesen werden.

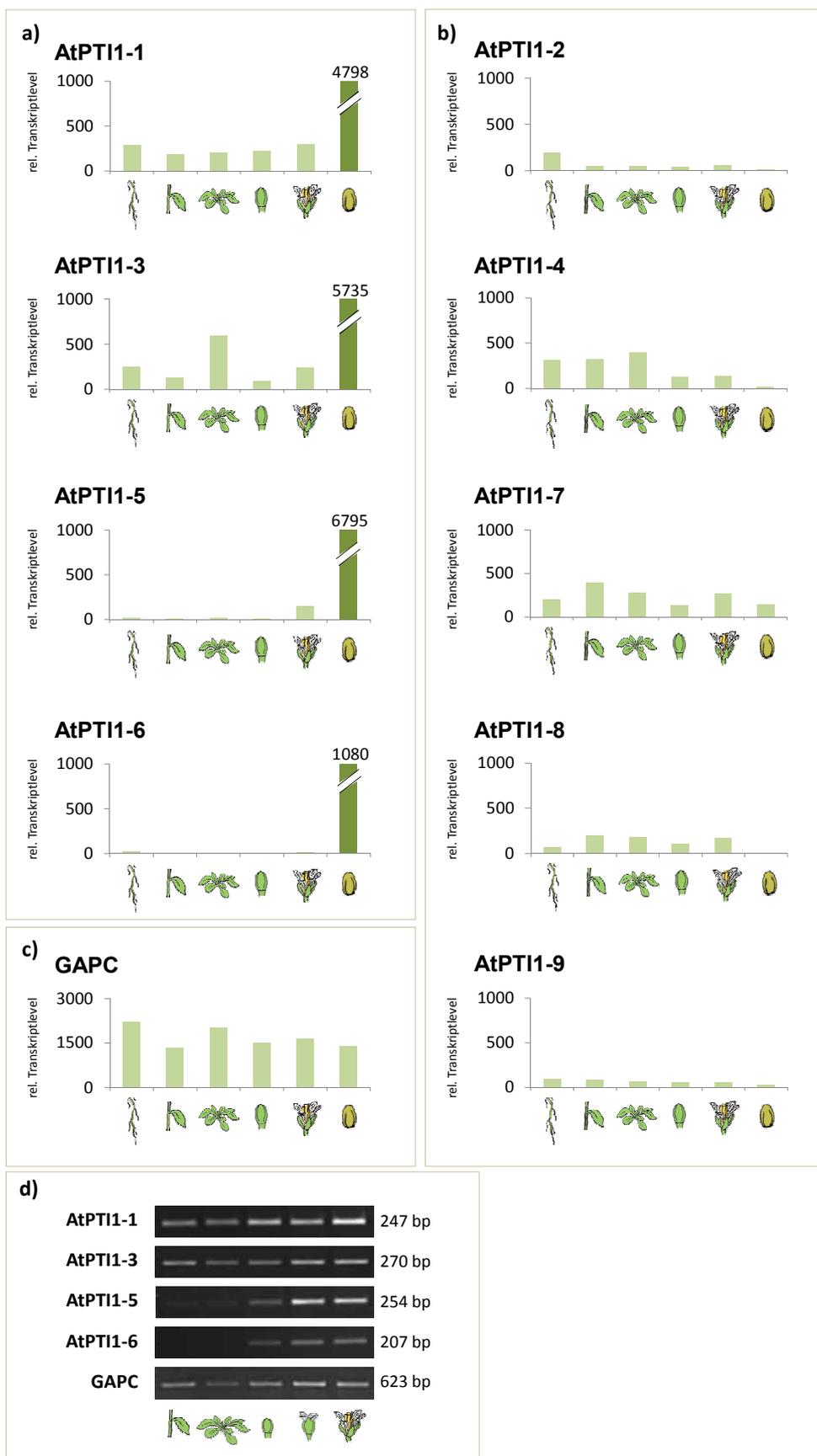
Um einen umfassenden Überblick über die Expression der PTI1-Kinasen aus *Arabidopsis* zu erhalten, wurde im Rahmen dieser Arbeit mit Hilfe von *in silico* Analysen, semi-quantitativer RT-PCR und Promotor-*GUS*-Studien das Expressionsmuster der *AtPTI1*-Gene detailliert untersucht.

#### 4.1.3.1 Untersuchung der *PTI1*-Expression in *Arabidopsis* mittels *in silico* Auswertung und semi-quantitativer Expressionsanalyse

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten *in silico* Auswertungen der Microarray-Daten von SCHMID *et al.* (2005) lieferten einen Überblick über die Expression der neun *PTI1*-Gene aus *Arabidopsis*. Die Expression wurde in Wurzeln, Rosettenblättern (Stadium 8), Stängelblättern, Knospen (Stadium 10/11), reifen Blüten (Stadium 15) und reifen Pollen betrachtet. Auf diesem Wege konnten, wie zuvor bei Mais, auch in *Arabidopsis* *PTI1*-Gene mit einer präferentiellen Expression in Pollen identifiziert werden. Insgesamt zeigten vier der *AtPTI1*-Gene, *PTI1-1*, *PTI1-3*, *PTI1-5* und *PTI1-6*, besonders hohe Transkriptmengen im reifen Pollen (Abbildung 4-5 a). *PTI1-1* und *PTI1-3* weisen zudem noch eine schwache Expression in den übrigen analysierten Geweben auf, während die Expression von *PTI1-5* und *PTI1-6* auf reifen Pollen bzw. reifen Blüten beschränkt ist. Die restlichen *AtPTI1*-Gene sind in Pollen nur schwach (*PTI1-7*) bzw. nahezu gar nicht (*PTI1-2*, *PTI1-4*, *PTI1-8* und *PTI1-9*) exprimiert. Sie weisen vielmehr eine schwache ubiquitäre Expression in den analysierten Geweben auf (Abbildung 4-5 b). Aufgrund dieser ersten Erkenntnisse werden die hauptsächlich in Pollen exprimierten *PTI1*-Gene und ihre Produkte in den folgenden Kapiteln mit *polPTI1* (*pol* für Pollen) und die anderen *PTI1*-Gene und ihre Produkte mit *ubiPTI1* (*ubi* für ubiquitär) benannt.

#### Legende zu Abbildung 4-5:

**a-c)** *In silico* Auswertung der Microarray-Daten von SCHMID *et al.* (2005) der **a)** präferentiell in Pollen exprimierten *PTI1*-Kinasen, **b)** ubiquitär exprimierten *PTI1*-Kinasen und **c)** Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase Untereinheit C (*GAPC*, At3g04120). Gewebe von links nach rechts: Wurzeln, Stängelblätter, Rosettenblätter (Stadium 8), Knospen (Stadium 10/11), reife Blüten (Stadium 15) und reifer Pollen. **d)** Untersuchung der *polPTI1*- und *GAPC*-Expression mittels RT-PCR in den Geweben: Stängelblätter, Rosettenblätter, Knospen, junge und reife Blüten. Verwendete Primer: KS87/KS88 für *PTI1-1*; KS89/KS90 für *PTI1-3*, KS91/KS92 für *PTI1-5*, KS93/KS94 für *PTI1-6* und KS95/KS96 für *GAPC*. Für die Zweitstrangsynthese wurden 30 Zyklen bzw. für *PTI1-5* 35 Zyklen gefahren.



**Abbildung 4-5: Expression der *AtPTI1*-Gene in verschiedenen Pflanzengeweben.** Legende siehe vorherige Seite.

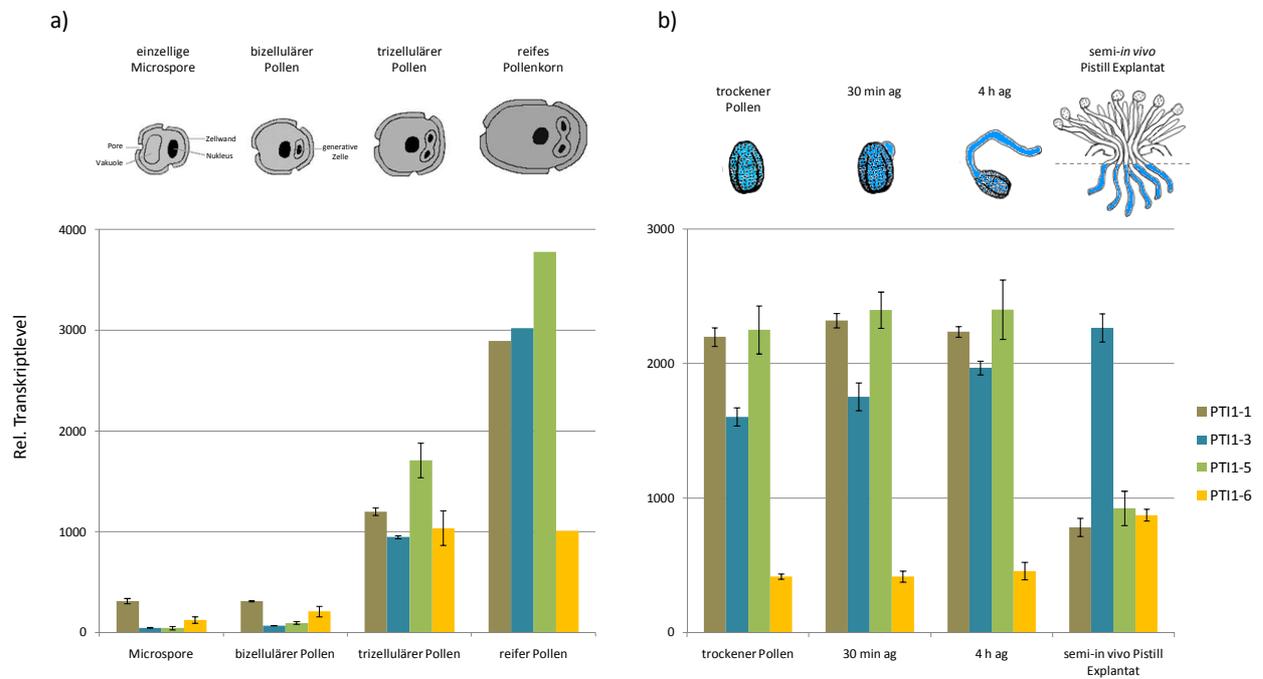
Um die aus den Microarray-Daten abgeleiteten Expressionsmuster experimentell zu überprüfen, wurden semi-quantitative Expressionsanalysen der vier *polPTI1*-Gene durchgeführt. Zum Nachweis der Transkripte wurden Stängelblätter, Rosettenblätter, Knospen sowie junge und reife Blüten von *Arabidopsis* Wildtyp-Pflanzen eingesetzt. Ein Nachweis der mRNA Expression in Pollen wurde aufgrund der extrem limitierten Verfügbarkeit dieses Gewebes nicht durchgeführt. Aus den jeweiligen Geweben wurde zunächst Gesamt-RNA isoliert und verbliebene gDNA durch einen Verdau mit DNase entfernt. Nach erfolgter Erststrangsynthese durch Reverse Transkription wurde mittels genspezifischer Primer die Zweitstrangsynthese durchgeführt. Als Referenz diente das Transkript der Glycerinaldehyd-3-Phospat Dehydrogenase Untereinheit C (*GAPC*) (Abbildung 4-5 c, d).

Den Ergebnissen der semi-quantitativen RT-PCR in Abbildung 4-5 d ist zu entnehmen, dass die Transkriptmenge der untersuchten *polPTI1*-Gene mit ansteigender Blütenreife und folglich mit der Pollenreife zunimmt. *PTI1-5* und *PTI1-6* zeigten im Gegensatz zu *PTI1-1* und *PTI1-3* nahezu keine Expression in Stängel- und Rosettenblättern. Folglich werden die von SCHMID *et al.* (2005) erhobenen Daten durch diese Analyse bestätigt (Abbildung 4-5 a).

Um weitere Informationen über die Expression der *polPTI1*-Gene zu erhalten, wurden weitere Microarray-Daten *in silico* analysiert, welche bei der Entwicklung bzw. Keimung von Pollen ermittelt wurden (HONYS & TWELL 2004; QIN *et al.* 2009). Die Analyse der Expression der *polPTI1*-Gene während der Pollenentwicklung zeigte, dass diese beginnend mit dem trizellulären Stadium der Pollenentwicklung vermehrt exprimiert werden. Maximale Transkriptmengen von *PTI1-1*, *PTI1-3* und *PTI1-5* finden sich im reifen Pollen (Abbildung 4-6 a). *PTI1-5* zeigte hierbei die höchste mRNA-Menge, gefolgt von *PTI1-3* und *PTI1-1*. Die Transkriptmenge von *PTI1-6* ist im reifen Pollen und in Pollen des trizellulären Stadiums gleich.

Die Expressionsanalyse der *polPTI1*-Gene während der Pollenkeimung erfolgte auf Basis der Microarray-Daten von QIN *et al.* (2009). Die gewählten Zeitpunkte und Gewebe waren: trockener Pollen vor der Keimung, keimender Pollen, Pollenschläuche 30 min und 4 h nach *in vitro* Keimung sowie Pollenschläuche nach Eintritt durch das Stigma und den Stylus (Abbildung 4-6 b). Für letzteres wurde ein semi-*in vivo* Pistill Explantat System verwendet. Die Analyse zeigt, dass die Transkriptmengen von *PTI1-1* und *PTI1-5* während der *in vitro* Keimung nahezu konstant bleiben, jedoch beim Eintritt durch Stigma und Stylus deutlich abnehmen. *PTI1-3* und *PTI1-6* Transkripte verhalten sich dazu entgegengesetzt, ihre Menge

nimmt während der *in vitro* Keimung geringfügig aber kontinuierlich zu. Noch größere Transkriptmengen von *PTI1-3* und *PTI1-6* werden in Pollenschläuchen gefunden, die Stigma und Stylus im semi-*in vivo* System durchdrungen haben.



**Abbildung 4-6: Expression der *polPTI1*-Gene während der a) Pollenentwicklung und b) Pollenkeimung.** a) Expression in einzelliger Mikrospore, im bizellulären und trizellulären Pollen sowie im reifen Pollenkorn. b) Expression im trockenem Pollenkorn, während der Pollenkeimung 30 min und 4 h nach *in vitro* Keimung (*after germination = ag*) und in semi-*in vivo* Pistill Explantat nach Eintritt durch Stigma und Stylus. Micorarray-Daten entstammen dem *eFP Browser*, Experimente von a) HONYNS UND TWELL (2004) und b) QIN *et al.* (2009).

#### 4.1.3.2 Analyse der *AtPTI1*-Promotoraktivität in Promotor-*GUS*-Pflanzen

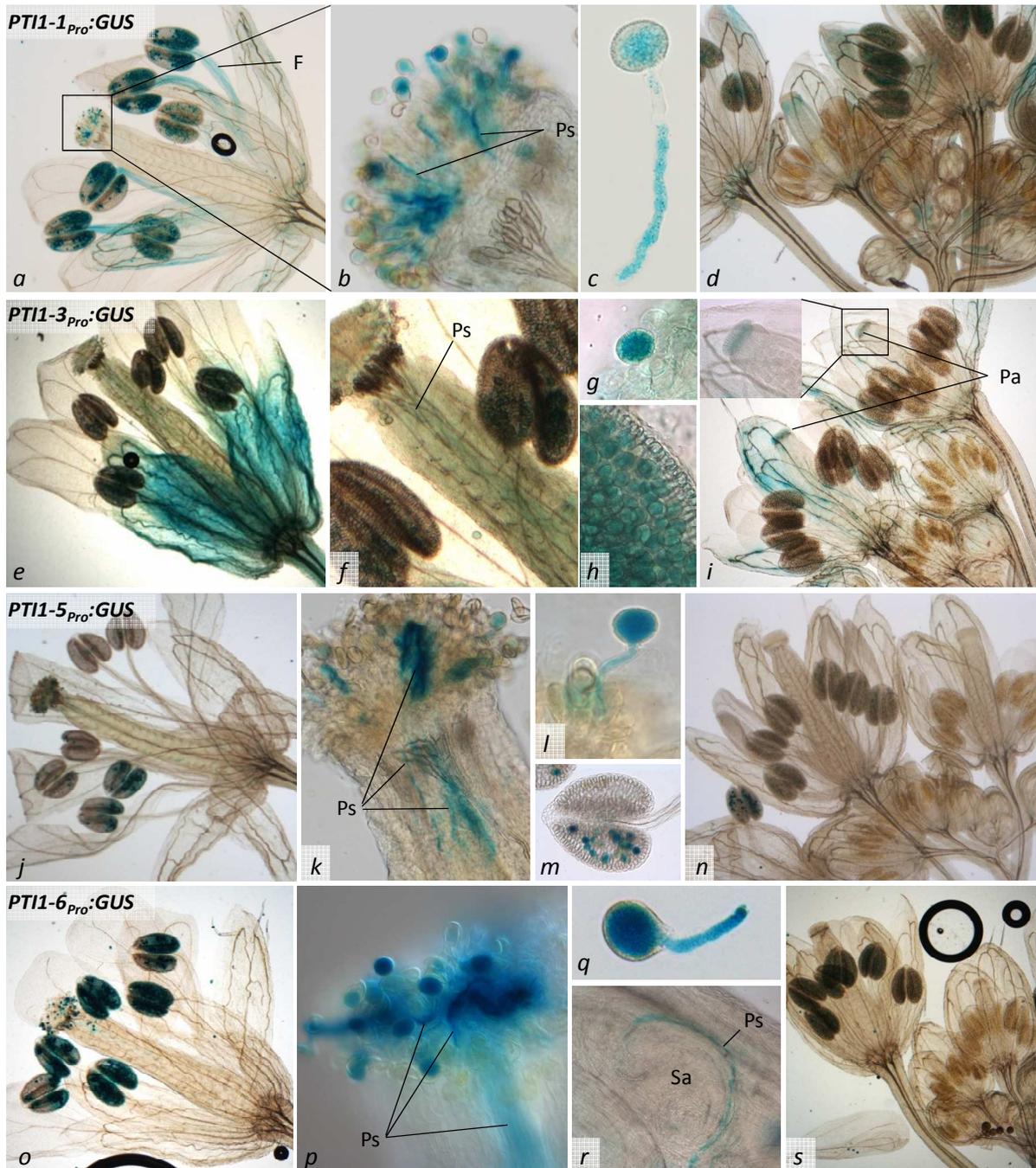
Zur Untersuchung der gewebespezifischen Aktivität der *AtPTI1*-Promotoren sowie der Überprüfung der im vorherigen Kapitel erhobenen Daten wurden Reporter-gen-Konstrukte hergestellt (3.3.2, diese Arbeit; SCHMIDT 2009<sup>5</sup>; WITTFOTH 2009<sup>5</sup>). Diese enthalten das  $\beta$ -Glucuronidase (*GUS*) codierende *uidA*-Gen unter der Kontrolle der jeweiligen *PTI1*-Promotoren. *Arabidopsis* Pflanzen des Ökotyps Col-0 wurden mit den Promotor-*GUS*-Konstrukten mittels *Agrobacterium tumefaciens* stabil transformiert (3.2.6.2). Die Transformanten von zwei bis zwölf unabhängigen Linien der T1-Generation wurden pro Konstrukt anschließend durch Färbung mit X-Gluc-Färbelösung auf ihre *GUS*-Expression untersucht (3.2.7). Die transgenen Pflanzen werden folgend entsprechend ihrer Konstrukte mit *PTI1*<sub>Pro</sub>:*GUS* bezeichnet.

Die Ergebnisse der promotorspezifischen Expressionsanalyse sind für die Gene der *polPTI1*-Kinasen in Abbildung 4-7 und für die Gene der *ubiPTI1*-Kinasen in Abbildung 4-8 dargestellt. Wie erwartet, waren die Promotoren der vier *polPTI1*-Gene, *PTI1-1*, *PTI1-3*, *PTI1-5* und *PTI1-6* vor allem im reifen Pollen aktiv (Abbildung 4-7 a-c, e-h, j-m, o-q). Eine Promotor-Aktivität der *polPTI1*-Gene konnte hingegen nicht in den Antheren junger Blüten detektiert werden (Abbildung 4-7 d, i, n, s). Demnach ist eine Expression dieser Gene in den späteren Stadien der Pollenentwicklung anzunehmen. Dies steht im Einklang mit den Microarray-Daten der Pollenentwicklung, die zeigen, dass die Menge an der *polPTI1*-Transkripte erst mit dem trizellulären Stadium ansteigt (Abbildung 4-6 a). Des Weiteren konnte auch in den Pollenschläuchen der transgenen *polPTI1*<sub>Pro</sub>:*GUS*-Pflanzen *GUS*-Aktivität nachgewiesen werden (Abbildung 4-7 b, c, f, k, l, p, q, r). Die Aktivität der *PTI1-5*- und *PTI1-6*-Promotoren war in den Blüten ausschließlich auf die Pollenkörner begrenzt. Für die Promotoren der Gene *PTI1-1* und *PTI1-3* konnte dagegen auch in weiteren Teilen der Blüte (Filamente, Sepalen) eine schwache *GUS*-Aktivität gefunden werden (Abbildung 4-7 a, d, e, i). In einigen Fällen wiesen auch die Papillen junger Blüten eine *PTI1-3*-Promotor-Aktivität auf (Abbildung 4-7 i).

Die Expression der *ubiPTI1*-Gene zeigte sich sehr variabel in den Blüten (Abbildung 4-8). So war z.B. eine Aktivität der Promotoren von *PTI1-2*, *PTI1-4* und *PTI1-8* in den Filamenten sowie von *PTI1-2* und *PTI1-7* in den Papillen zu erkennen (Abbildung 4-8 a, d, g, h, i). Die Promotoraktivität von *PTI1-7* in den Papillen erschien anhand der intensiven Blaufärbung besonders hoch. Im Bereich des Stylus konnte eine *GUS*-Expression in den Promotor-*GUS*-

---

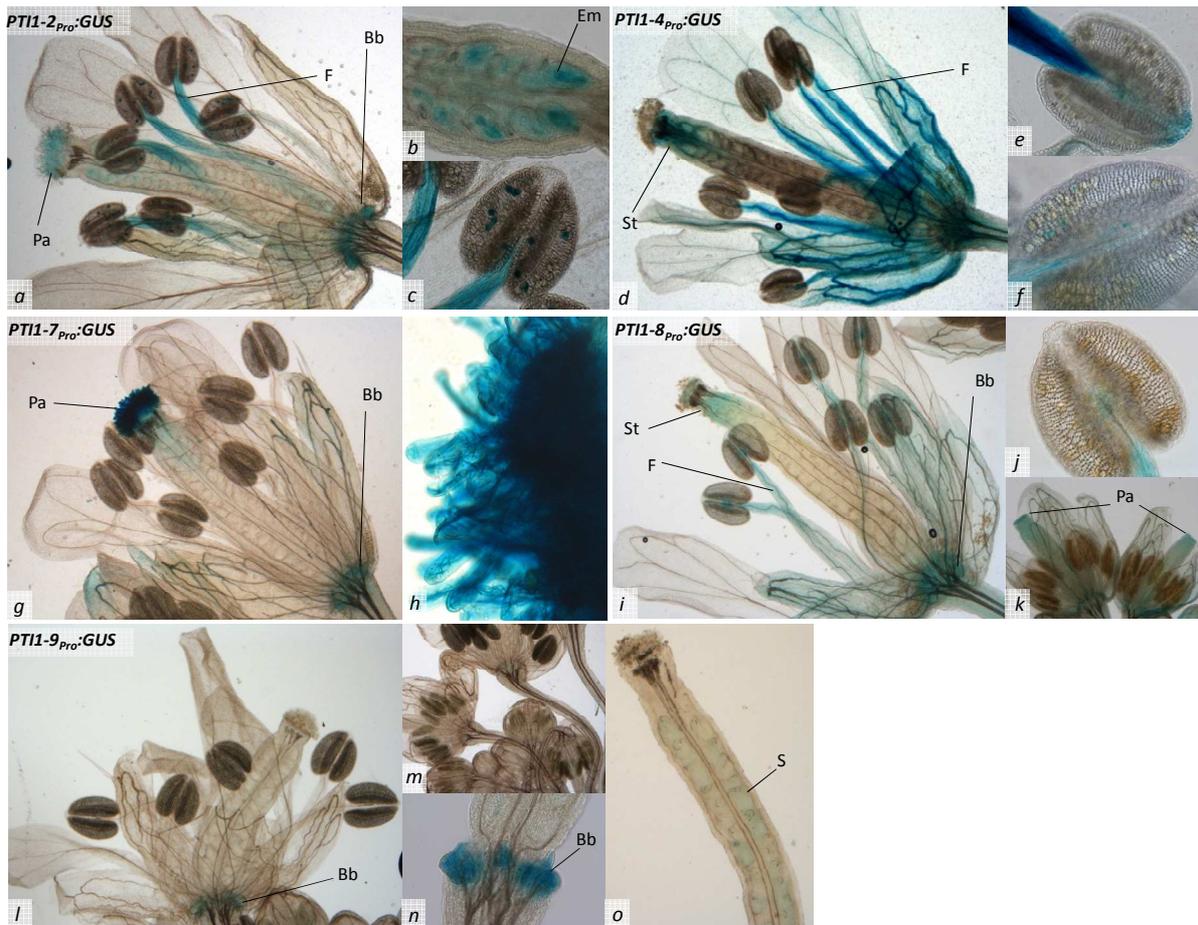
<sup>5</sup> Im Rahmen dieser Arbeit betreute Bachelorarbeiten.



**Abbildung 4-7:** *polPTI1*-Promotorspezifische *GUS*-Expression in Blüten und Infloreszenzen. X-Gluc-Färbung von **a-d)** *PTI1-1<sub>Pro</sub>:GUS*-, **e-i)** *PTI1-3<sub>Pro</sub>:GUS*-, **j-n)** *PTI1-5<sub>Pro</sub>:GUS*- und **o-s)** *PTI1-6<sub>Pro</sub>:GUS*-Pflanzen; **a, e, j, o)** Blüte; **d, i, n, s)** Infloreszenzen; **b, g, k, l, p)** Detailaufnahmen von Stigmata; **c, q)** *in vitro* Pollenschlauchwachstum; **f, h, m)** Antheren; **r)** Detailansicht einer Samenanlage mit Pollenschlauch. F = Filament, Pa = Papillen, Ps = Pollenschlauch, S = Samenanlage.

Pflanzen von *PTI1-4* und *PTI1-8* detektiert werden. Die Promotoren aller *ubiPTI1*-Gene wiesen eine Aktivität im Bereich des Blütenbodens auf. Für den Promotor von *PTI1-9* war dies neben einer schwachen Expression in entwickelnden Samen (Abbildung 4-8 o) die einzige detektierbare Expression. Microarray-Daten von CASSON *et al.* (2005) und LE *et al.*

(2010) bestätigen das Expressionsmuster von *PTI1-9* und grenzen es in den Samen auf die Kotyledonen des Herzstadiums und die Samenhülle ein. Für den Promotor von *PTI1-2* wurde sowohl eine Aktivität in entwickelnden Samen sowie in Pollen bei neun von zehn unabhängigen Linien festgestellt (Abbildung 4-8 b, c). Eine geringe Expression von *PTI1-2* ist in den Samen gemäß der Microarraydaten zu erwarten, während eine Expression in Pollen in drei unabhängigen Microarray-Experimenten nicht nachweisbar war (SCHMID *et al.* 2005; HONYS & TWELL 2004; QIN *et al.* 2009).



**Abbildung 4-8: *ubiPTI1*-Promotorspezifische *GUS*-Expression in Blüten.** X-Gluc-Färbung von **a-c)** *PTI1-2<sub>Pro</sub>:GUS*-, **d-f)** *PTI1-4<sub>Pro</sub>:GUS*-, **g-h)** *PTI1-7<sub>Pro</sub>:GUS*-, **i-k)** *PTI1-8<sub>Pro</sub>:GUS*-, und **l-o)** *PTI1-9<sub>Pro</sub>:GUS*-Pflanzen; **a, d, g, l)** Blüte; **b)** Pistill; **c, e, f, j)** Antheren; **h)** Detailaufnahme Papillen; **k, m)** junge Blüten; **o)** Schote. Bb = Blütenboden, Em = Embryo, F = Filament, Pa = Papillen, S = Samen, St = Stylus.

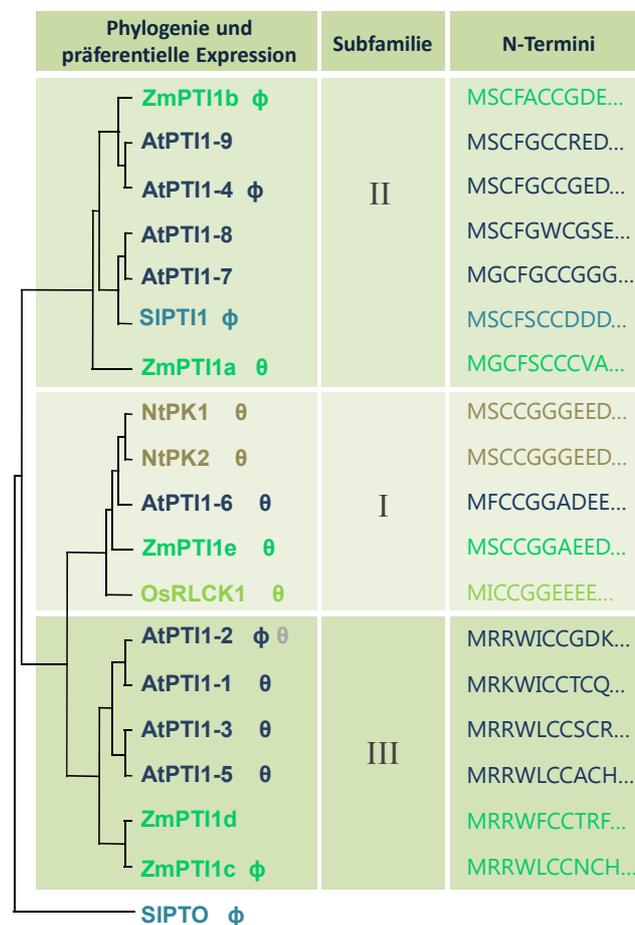
Eine Zusammenfassung der Ergebnisse der Microarray-Auswertung und der Promotor-*GUS*-Studie ergibt, dass alle untersuchten Gene der Familie individuelle und spezifische Expressionsmuster aufweisen. Zudem wird anhand der vielfältigen Expressionsmuster deutlich, dass die Einteilung in *Po1PTI*- und *ubiPTI1*-Kinasen dieser Vielfalt nicht vollständig gerecht wird. Der Übersicht halber wird jedoch diese grobe Einteilung beibehalten.

Die vier *polPTI1*-Gene aus *Arabidopsis* (*PTI1-1*, *PTI1-3*, *PTI1-5* und *PTI1-6*) werden vorwiegend in der späten Pollenentwicklung, im trizellulären Pollen und im reifen Pollenkorn exprimiert. Für diese *PTI1*-Gene zeigten die Microarray-Daten, dass eine große Transkriptmenge auch noch während der Pollenkeimung vorliegt. Ebenfalls konnte eine Aktivität des *PTI1-2*-Promotors in Pollen der Promotor-*GUS*-Pflanzen detektiert werden. Dieses Resultat deckt sich nicht mit den Ergebnissen der Microarray-Studien, möglicherweise aufgrund unterschiedlicher Sensitivität der Nachweismethode. Da jedoch neun von zehn Linien dieses Bild zeigen, können Positionseffekte ausgeschlossen werden. Zwei der vier *polPTI1*-Gene, *PTI1-1*, *PTI1-3* sind präferentiell, aber nicht ausschließlich in Pollen exprimiert. Die Daten der Microarray-Studien, der semi-quantitativen RT-PCR und der Promotor-*GUS*-Studien zeigen, dass eine schwächere Expression von *PTI1-1* und *PTI1-3* zusätzlich in Rosetten- und Stängelblättern, Kelchblättern sowie Wurzeln zu finden ist. Für das Promotor-*GUS*-Konstrukt von *PTI1-1* konnte ebenfalls eine Aktivität in den Filamenten der Antheren detektiert werden. Die Expression der *PTI1-5*- und *PTI1-6*-Gene ist sehr wahrscheinlich auf Pollen limitiert, da auch mittels semi-quantitativer Expressionsanalyse *PTI1-5*- und *PTI1-6*-Transkripte nur in Blütenstadien gefunden werden konnten, die entwickelnde bzw. reife Antheren enthalten und zudem die Transkriptmenge vom Knospenstadium bis zu den reifen Blüten ansteigt. In den ausgewerteten Microarray-Experimenten wurden diese Transkripte nur in geringer Menge in reifen Blüten gefunden. Diese Ergebnisse decken sich mit denen der Promotor-*GUS*-Experimente, in denen die Promotoren von *PTI1-5*- und *PTI1-6* ebenfalls erst in reifen Blüten aktiv waren.

Promotoraktivitäten der *ubiPTI1*-Gene (*PTI1-2*, *PTI1-4*, *PTI1-7*, *PTI1-8* und *PTI1-9*) konnten in verschiedenen Blütengeweben wie Papillen, Filamenten, Stylus, Pollen, Blütenboden und in den Samen gefunden werden. Nahezu jedes Gen der *PTI1*-Familie weist ein eigenes gewebespezifisches Expressionsmuster auf.

Die Daten der Expressionsanalyse wurden dem phylogenetischen Stammbaum von *PTI1*-Kinasen aus *Arabidopsis*, Mais, Reis, Tabak und Tomate gegenüber gestellt und mit den zugeschriebenen Expressionsorten bzw. biologischen Funktionen – soweit bekannt – verglichen (Abbildung 4-9). Es wird deutlich, dass Proteine verschiedener Spezies, die aufgrund der Sequenzähnlichkeit und konservierten N-Termini eine sehr hohe Verwandtschaft besitzen, meist nicht die gleiche Gewebespezifität besitzen. Die *polPTI1*-Kinasen aus *Arabidopsis* finden sich z.B. in den Subfamilien I und III, während sich die beiden präferentiell in Pollen exprimierten *PTI1*-Kinasen aus Mais in den Subfamilien II (*ZmPTI1a*) und I (*ZmPTI1e*) finden. In Subfamilie I sind zudem noch die *PTI1*-Kinasen

NtPK1, NtPK2 und OsRLCK1 eingruppiert, welche ebenfalls hauptsächlich in Pollen exprimiert werden. Die PTI1-Kinasen, denen eine Beteiligung an der Pathogenabwehr bzw. an einer Reaktion auf abiotische und biotische Stressoren zugeschrieben wird, befinden sich in den Subfamilien II (SlPTI1, ZmPTI1b und AtPTI1-4) und III (AtPTI1-2). Demnach ist allein aufgrund der Zuordnung zu einer Subfamilie auf Basis der Aminosäuresequenz nicht zwangsweise auf die *in planta* Expressionsorte der Kinasen zu schließen. Dies trifft bislang allein auf Subfamilie I zu, deren bislang bekannte Vertreter ausschließlich präferentiell in Pollen exprimiert werden.



**Abbildung 4-9: Phylogenie der PTI1-Kinasen aus *Arabidopsis*, Mais, Reis, Tabak und Tomate, inklusive der präferentiellen Expression und ihrer N-terminalen Sequenzen.** Der phylogenetische Baum wurde durch Berechnungen mit *ClustalX2* und Visualisierung mit *Treeview* erstellt. Außengruppe ist SIPTO. Die PTI1-Kinasen sind in drei Subfamilien unterteilt, die sich insbesondere in den konservierten N-terminalen Sequenzen widerspiegeln. Eine Auflistung der ersten zehn Aminosäurereste des jeweiligen N-Terminus befindet sich im rechten Teil der Abbildung. Eine überwiegende Expression in Pollen ist durch den griechischen Buchstaben Theta ( $\theta$ ) gekennzeichnet. AtPTI1-2 ist mit einem grauen Theta markiert, da eine Expression in Pollen nur durch Promotor-*GUS*-Studien belegt ist. Kinasen, denen eine Beteiligung an der Pathogenabwehr bzw. an Reaktionen auf abiotische und/oder biotische Stressoren zugeschrieben wird, sind mit dem griechischen Buchstaben Phi ( $\phi$ ) gekennzeichnet.

#### 4.1.4 Analyse der subzellulären Lokalisation der *Arabidopsis* PTI1-Kinasen

Für einige der bereits charakterisierten PTI1-Kinasen verschiedener Pflanzen wurde die subzelluläre Lokalisation untersucht (Tabelle 4.1-1). Die meisten dieser Kinasen zeigten eine cytoplasmatische Lokalisation bzw. zusätzlich eine Lokalisation im Nukleus (DISSANAYAKE *et al.* 2004; HERRMANN *et al.* 2006; KONG *et al.* 2007). Ausnahmen bilden ZmPTI1a und ZmPTI1e, die an der Plasmamembran bzw. mit cytoplasmatischen Vesikeln assoziiert vorgefunden wurden (HERRMANN *et al.* 2006; REHDERS 2010).

**Tabelle 4.1-1: Subzelluläre Lokalisation der bereits untersuchten PTI1-Kinasen aus Mais, Reis Tabak und Tomate** (DISSANAYAKE *et al.* 2004; HERRMANN *et al.* 2006; KONG *et al.* 2007; REHDERS 2010).

Protein	Subzelluläre Lokalisation
NtPK1	Cytoplasma
NtPK2	Cytoplasma
OsRLCK1	Cytoplasma, Nukleus
SIPTI1	Cytoplasma, Nukleus
ZmPTIa	Plasmamembran
ZmPTIb	Cytoplasma, Nukleus
ZmPTIc	Cytoplasma
ZmPTId	Cytoplasma
ZmPTIe	Vesikel

Die subzelluläre Lokalisation der *Arabidopsis* PTI1-Kinasen war bislang unbekannt. Um diese Lücke experimentell zu schließen, wurden GFP-Fusionskonstrukte hergestellt, welche für biolistische, transiente Transformationen von Zwiebelepidermiszellen (3.2.6.1) sowie für stabile Transformationen in *Arabidopsis* (3.2.6.2) verwendet wurden (diese Arbeit; BAGHERZADEGAN-SARAVI 2008<sup>6</sup>; SCHMIDT 2009; WITTFOTH 2009). Die Klonierung dieser Konstrukte auf Basis des *LAT52<sub>pro</sub>:GFPII-* bzw. *35S<sub>pro</sub>:GFPII-*Vektors ist in Abschnitt 3.3.3 beschrieben.

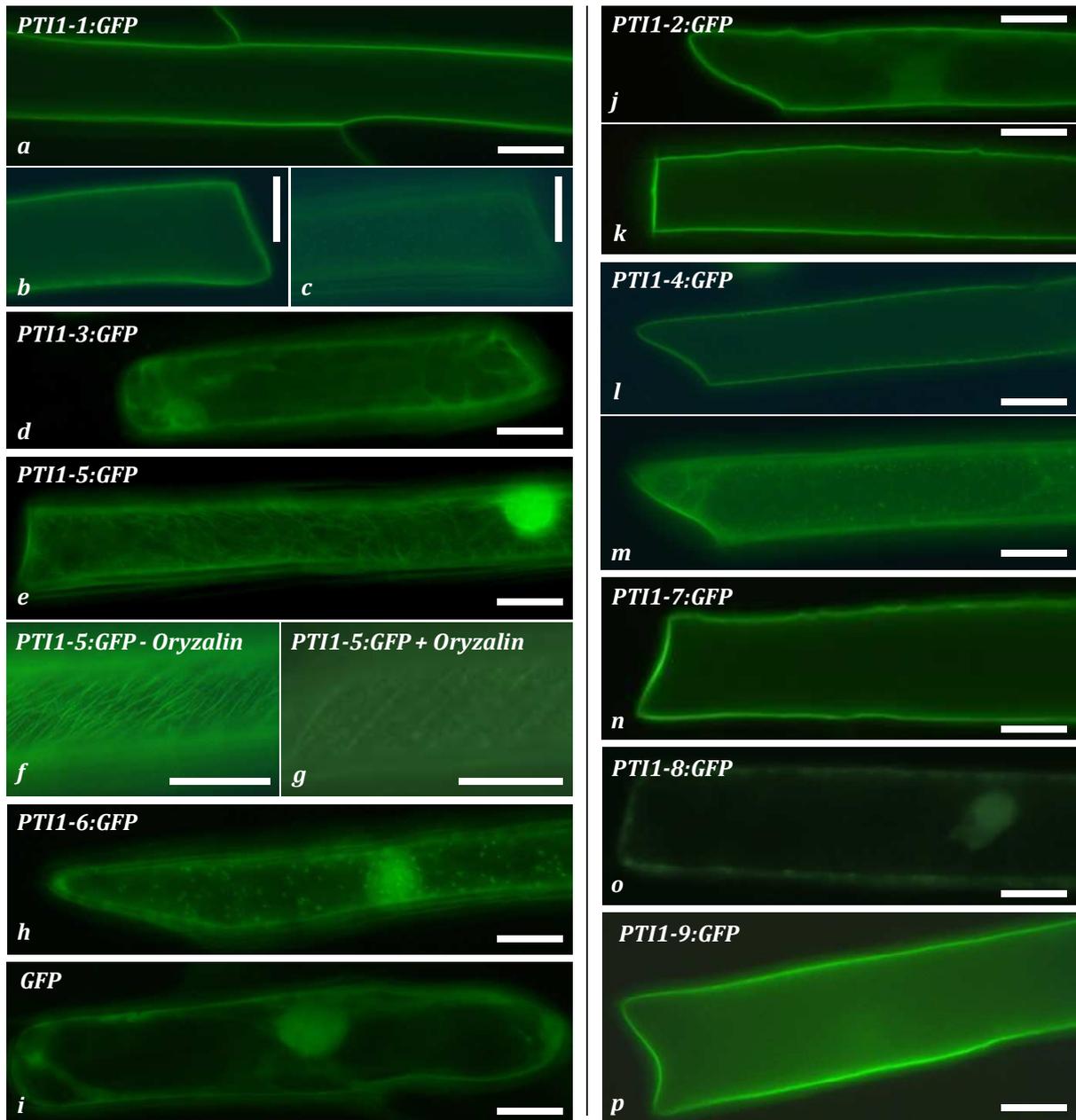
Zunächst wurde die Lokalisation der PTI1:GFP-Fusionskonstrukte in transient transformierten Zellen der Zwiebelepidermis untersucht. *p<sub>ol</sub>*PTI1-Kinasen zeigten dabei unterschiedlich subzelluläre Lokalisationen. Während PTI1-3:GFP, wie ein Großteil der bereits analysierten PTI1-Kinasen, cytoplasmatisch lokalisiert war (Abbildung 4-10 d), zeigte PTI1-1:GFP eine Lokalisation an der Plasmamembran, sowie in einigen Fällen in

<sup>6</sup> An diese Arbeit assoziierte Bachelorarbeit.

kleinen Vesikeln (Abbildung 4-10 a-c). Ebenfalls war PTI1-6:GFP mit Vesikeln assoziiert, diese waren jedoch größer als die Vesikel der PTI1-1:GFP Lokalisation (Abbildung 4-10 h). PTI1-5:GFP wurde an filamentösen Strukturen an der Peripherie der Zelle detektiert. Diese Strukturen glichen denen von kortikalen Mikrotubuli und waren zudem um den Nukleus herum stärker ausgeprägt (Abbildung 4-10 e, f). Um sicher zu stellen, dass es sich hierbei um Mikrotubuli handelt, wurden GFP-positive Zellen mit dem Mikrotubuli-Inhibitors Oryzalin behandelt (Abbildung 4-10 g). Der sukzessive Abbau der Untereinheiten spiegelte sich in einer Veränderung der GFP-Fluoreszenz wieder. Die beobachtete Depolymerisierung deckte sich mit den Angaben der Literatur (HASENSTEIN *et al.* 1999; THITAMADEE *et al.* 2002) und unterstützt die Vermutung, dass PTI1-5 an den Mikrotubuli lokalisiert ist.

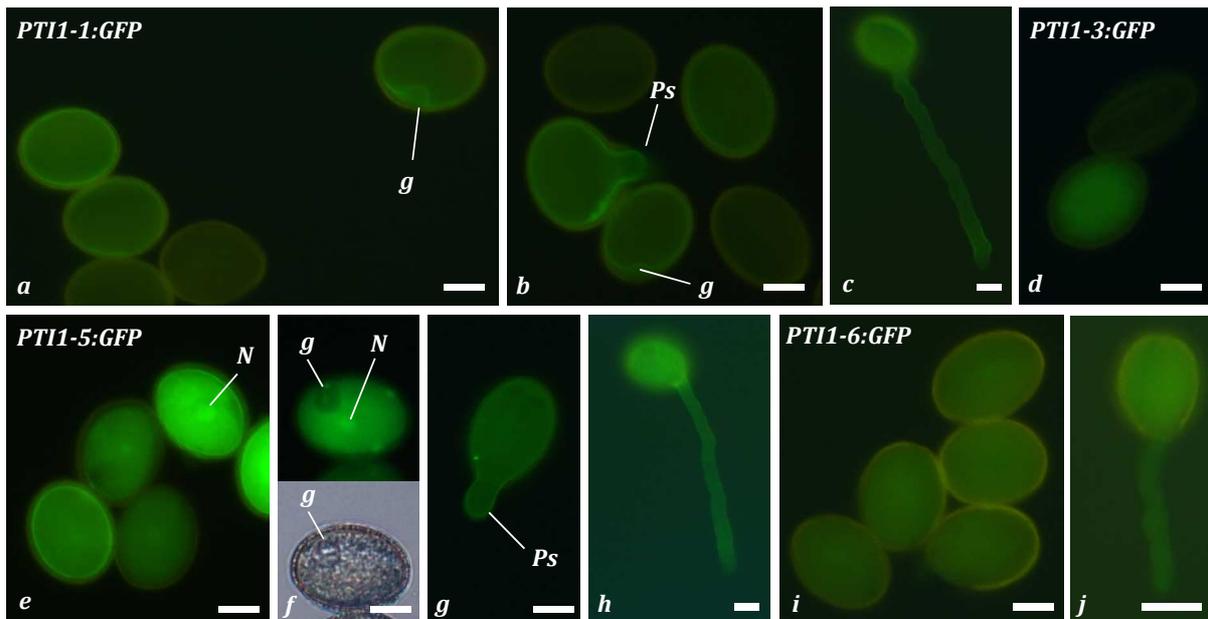
Die <sub>ubi</sub>PTI1-Kinasen zeigten im Gegensatz zu den <sub>pol</sub>PTI1-Kinasen ein einheitlicheres Bild und waren mit Ausnahme von PTI1-8:GFP alle an der Plasmamembran lokalisiert (Abbildung 4-10 j-n, p). PTI1-2:GFP und PTI1-4:GFP wurden in einigen Fällen zusätzlich im Cytoplasma gefunden. Zudem konnte für PTI1-4:GFP eine Lokalisation in/an kleinen Vesikeln detektiert werden. Für das an der Plasmamembran lokalisierte ZmPTI1a von Mais konnten HERRMANN *et al.* (2006) ein N-terminales Glycin an Position 2 als Myristoylierungssignal sowie eine S-Palmitoylierung der Cysteinreste an Position 3, 6 und 7 verantwortlich machen. Die für die N-Myristoylierung und S-Palmitoylierung und somit für die Lokalisation an der Plasmamembran verantwortlichen Aminosäurereste Gly2 und Cys3, 6 und 7 konnten bei den *Arabidopsis* PTI1-Kinasen nur in PTI1-7 gefunden werden, während die übrigen PTI1-Kinasen offenbar über andere membranassoziiierende Mechanismen verfügen. PTI1-8:GFP zeigte im Gegensatz zu den anderen <sub>ubi</sub>PTI1-Kinasen sowohl eine cytoplasmatische als auch eine nukleäre Lokalisation (Abbildung 4-10 o).

Bei der vorangegangenen Lokalisationsstudie handelt es sich um ein heterologes System, in dem die Lokalisation von Proteinen einer dikotyledonen Pflanze in Zellen einer monokotyledonen Pflanze untersucht wurden. Um mögliche Artefakte, hervorgerufen durch dieses heterologe System, auszuschließen, wurden die GFP-Fusionskonstrukte auch mittels *Agrobacterium tumefaciens* stabil in *Arabidopsis* Pflanzen transformiert (3.2.6.2). Die PTI1:GFP Konstrukte der <sub>pol</sub>PTI1-Kinasen wurden unter Kontrolle des *LAT52*-Promotors aus Tomate und die der <sub>ubi</sub>PTI1-Kinasen unter Kontrolle des *35S*-Promotors gestellt. Der *LAT52*-Promotor ermöglicht eine pollenspezifische Expression in *Arabidopsis* (TWELL *et al.* 1990) während der *35S*-Promotor des Blumenkohl-Mosaikvirus zu einer annähernd ubiquitären Expression in *Arabidopsis* führt, jedoch nicht in Pollen aktiv ist.



**Abbildung 4-10: Subzelluläre Lokalisation der Arabidopsis PTI1-Kinasen in transient transformierten Epidermiszellen der Frühlingzwiebel.** Zwiebelepidermis wurde biolistisch mit den Fusionskonstrukten *PTI1-1:GFP* (a, b, c), *PTI1-3:GFP* (d), *PTI1-5:GFP* (e-g), *PTI1-6:GFP* (h), *PTI1-2:GFP* (j, k), *PTI1-4:GFP* (l, m), *PTI1-7:GFP* (n), *PTI1-8:GFP* (o), *PTI1-9:GFP* (p) und *GFP* (i) transformiert. (g) Mit *PTI1-5:GFP* transformierte Zwiebelepidermis wurde mit 10 µM Oryzalin behandelt, um so eine Depolymerisierung der Mikrotubuli hervorzurufen. Balken entspricht 25 µm.

Die Lokalisationsanalysen der  $P_{01}$ PTI1:GFP Konstrukte, *PTI1-1:GFP*, *PTI1-3:GFP*, *PTI1-5:GFP* und *PTI1-6:GFP*, zeigte die GFP-Fluoreszenz nur in Pollen (Abbildung 4-11). Es war deutlich sichtbar, dass die Fusionsproteine *PTI1-3:GFP* und *PTI1-6:GFP* wie schon in den Experimenten zuvor nicht an der Plasmamembran lokalisierten (Abbildung 4-11 d, i, j). Eine Lokalisation von *PTI1-6:GFP* an Vesikeln konnte aber weder im Pollenkorn noch im

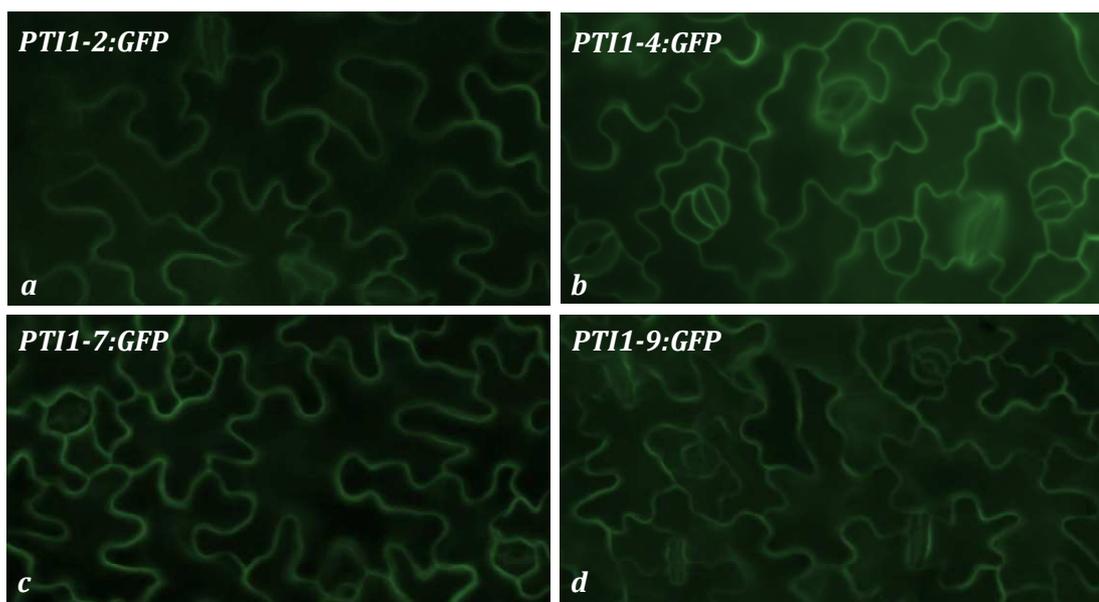


**Abbildung 4-11: Subzelluläre Lokalisation der  $_{\text{Pol}}$ PTI1-Kinasen in stabil transformierten *Arabidopsis* Pflanzen.** *Arabidopsis* Pflanzen des Ökotyps Col-0 wurden durch *Agrobacterium tumefaciens* stabil mit den Fusionskonstrukten *PTI1-1:GFP* (a,b), *PTI1-3:GFP* (c), *PTI1-5:GFP* (d-f), *PTI1-6:GFP* (g,h) unter Kontrolle des *LAT52*-Promotors aus Tomate transformiert. g = generative Zelle, N = Nukleus der vegetativen Zelle, Ps = Pollenschlauch. Balken entspricht 10  $\mu\text{m}$ .

Pollenschlauch beobachtet werden. Für PTI1-1 war, wie bereits in der transient transformierten Zwiebelepidermiszelle, eine Lokalisation in der Plasmamembran sichtbar (Abbildung 4-11 a). Besonders deutlich war dies an den wachsenden Pollenschläuchen zu erkennen (Abbildung 4-11 b, c). In einigen Fällen lagen in den Pollenkörnern der PTI1-1:GFP Linien grün fluoreszierende Vesikel vor. Diese zeigten sich jedoch nur in Pollen mit einem besonders starken Fluoreszenzsignal (Daten nicht gezeigt). Es ist zu vermuten, dass es sich hierbei um Pollenkörner handelt, in denen eine übermäßige Menge an PTI1-1:GFP gebildet wurde und aufgrund dessen eine Fehllokalisierung stattfand. PTI1-5:GFP zeigte in einigen Fällen ein Fluoreszenzsignal, welches dem des PTI1-1:GFP an der Plasmamembran gleich (Abbildung 4-11 e). Eine solche Lokalisation war vor allem in den Pollenschläuchen der PTI1-5:GFP-Pollen zu erkennen (Abbildung 4-11 g, h). In den Pollenkörnern mit einem Fluoreszenzsignal an der Plasmamembran zeigte sich häufig zusätzlich eine punktuelle Lokalisation im Inneren des Pollenkorns, wobei es wahrscheinlich um den Nukleus der vegetativen Zelle handelt. Ebenfalls waren Pollenkörner mit einer eher diffusen Lokalisation des PTI1-5:GFP zu erkennen, in denen ebenfalls der Zellkern der vegetativen Zellen fluoreszierte. Dieses Bild ähnelt dem der mit PTI1-5:GFP transformierten Zwiebelzellen und könnte möglicherweise ebenfalls durch eine Lokalisation von PTI1-5:GFP an den Mikrotubuli hervorgerufen werden. Die Plasmamembranständigkeit von PTI1-1 wird besonders im binukleären Stadium II (kompaktes Callose-Stadium) der Pollenentwicklung

deutlich in welchem die generative Zelle nach Ausbildung der Zellplatte an die Pollenwand andockt und von einer bogenförmigen Schicht aus Callose umgeben ist (Abbildung 4-11 a). Die generative Zelle ist auch als nicht fluoreszierende dunkle Struktur in den Pollenstadien der PTI1-5:GFP Linien sichtbar, da der *LAT52*-Promotor spezifisch in der vegetativen Zelle aktiv ist und in der generativen Zelle inaktiv ist (Abbildung 4-11 f). Um ein noch detaillierteres Bild über die subzelluläre Lokalisation der  $P_{ol}$ PTI-Kinasen in den Pollen und Pollenschläuchen zu erhalten sind weitere Untersuchungen, beispielsweise mittels konfokaler Mikroskopie notwendig.

Die  $ubi$ PTI1-Kinasen PTI1-2, PTI1-4, PTI1-7 und PTI1-9 zeigten in der stabilen Transformation ausschließlich eine Lokalisation an der Plasmamembran (Abbildung 4-12). Dieses Resultat entspricht den Ergebnissen der transienten Lokalisationsstudien (Abbildung 4-10). Die zuvor PTI1-2 und PTI1-4 gefundene Lokalisation im Cytoplasma sowie an kleinen Vesikeln (Abbildung 4-10 i-m, o) konnte durch die stabile Transformation im homologen System nicht bestätigt werden. Es ist zu vermuten, dass die cytoplasmatische Lokalisation von PTI1-2 und PTI1-4 sowie die von PTI1-4 in Vesikeln, Artefakte der transienten Transformation darstellen. Vermutlich wurde dies durch die Verwendung des heterologen Systems hervorgerufen bzw. aufgrund einer übermäßigen Konzentration an PTI1:GFP-Fusionsprotein ausgelöst, die auf eine Überexpression der Fusionskonstrukte durch Verwendung des *35S*-Promotors zurückzuführen ist. Eine stabile PTI1-8:GFP Pflanze konnte bislang nicht generiert werden.



**Abbildung 4-12: Subzelluläre Lokalisation der  $ubi$ PTI1-Kinasen in stabil transformierten *Arabidopsis* Pflanzen.** *Arabidopsis* Pflanzen des Ökotyps Col-0 wurden durch *Agrobacterium tumefaciens* stabil mit den Fusionskonstrukten *PTI1-2:GFP* (a), *PTI1-4:GFP* (b), *PTI1-7:GFP* (c) und *PTI1-9:GFP* (d) unter Kontrolle des *35S*-Promotors transformiert.

Die Zusammenfassung dieser Daten mit denen der vorherigen Kapitel ist in Abbildung 4-13 in den phylogenetischen Stammbaum der PTI1-Kinasen eingegliedert.

Phylogenie und präferentielle Expression	Subfamilie	N-Termini	subzelluläre Lokalisation
	II	ZmPTI1b $\phi$ MSCFACCGDE...	Cytoplasma + Nukleus
		AtPTI1-9 MSCFGCCRED...	Plasmamembran
		AtPTI1-4 $\phi$ MSCFGCCGED...	Plasmamembran
		AtPTI1-8 MSCFGWCGSE...	Cytoplasma + Nukleus
		AtPTI1-7 MGCFGCCGGG...	Plasmamembran
		SIPTI1 $\phi$ MSCFSCDDDD...	Cytoplasma + Nukleus
		ZmPTI1a $\theta$ MGCFSCCVA...	Plasmamembran
	I	NtPK1 $\theta$ MSCCGGGEED...	Cytoplasma
		NtPK2 $\theta$ MSCCGGGEED...	Cytoplasma
		AtPTI1-6 $\theta$ MFCCGGADEE...	Cytoplasma + Vesikel
		ZmPTI1e $\theta$ MSCCGGAEED...	Vesikel
		OsRLCK1 $\theta$ MICCGGEEEE...	Cytoplasma + Nukleus
	III	AtPTI1-2 $\phi$ $\theta$ MRRWICCGDK...	Plasmamembran
		AtPTI1-1 $\theta$ MRKWICCTCQ...	Plasmamembran
		AtPTI1-3 $\theta$ MRRWLCCSCR...	Cytoplasma
		AtPTI1-5 $\theta$ MRRWLCCACH...	Mikrotubuli
		ZmPTI1d MRRWFCCTRF...	Cytoplasma
		ZmPTI1c $\phi$ MRRWLCCNCH...	Cytoplasma
SIPTO $\phi$			

**Abbildung 4-13: Phylogenie der PTI1-Kinasen aus *Arabidopsis*, Mais, Reis, Tabak und Tomate, einschließlich der präferentiellen Expression, der Gruppierung in die drei Subfamilien der PTI1-Kinasen, ihrer N-terminalen Sequenzen und ihrer subzellulären Lokalisation.** Der phylogenetische Baum wurde durch Berechnungen mit *ClustalX2* und Visualisierung mit *Treeview* erstellt. Außengruppe ist SIPTO. Die Unterteilung der PTI1-Kinasen in drei Subfamilien erfolgte anhand ihrer Aminosäuresequenz. Eine Auflistung der ersten zehn Aminosäurereste des jeweiligen N-Terminus und ihrer bisher bekannten sowie der im Rahmen dieser Arbeit ermittelten subzellulären Lokalisationen befinden sich im rechten Teil der Abbildung (DISSANAYAKE *et al.* 2004; HERRMANN *et al.* 2006; KONG *et al.* 2007; REHDERS 2010). Die präferentielle Expression in Pollen ist durch den griechischen Buchstaben Theta ( $\theta$ ) symbolisiert. AtPTI1-2 ist mit einem grauen Theta markiert, da eine Expression in Pollen nur durch Promotor-*GUS*-Studien belegt ist. Eine experimentell gestützte Beteiligung an Pathogenabwehr bzw. an Reaktionen auf abiotische und/oder biotische Stressoren ist durch den griechischen Buchstaben Phi ( $\phi$ ) gekennzeichnet.

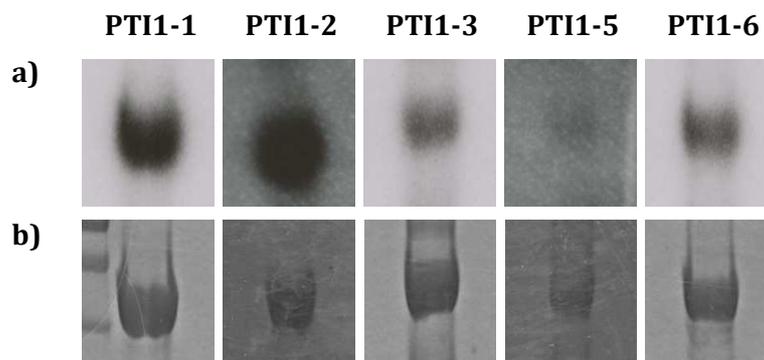
Wie bereits erwähnt, handelt es sich bei den Proteingruppen, die sich aufgrund der Sequenzähnlichkeit aus den bereits bekannten PTI1-Kinasen gebildet haben, nicht zwangsweise um putativ funktionsorthologe Proteine mit demselben Transkriptionsmuster. Dies trifft nur auf die Mitglieder der Subfamilie I zu, die bisher alle präferentiell in Pollen exprimiert sind. Anhand der bereits bekannten subzellulären Lokalisationen sowie der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Lokalisationsstudien (Abbildung 4-10, Abbildung 4-11, Abbildung 4-12) ist sichtbar, dass die Sequenzhomologien der jeweiligen Subfamilien nicht in einer einheitlichen subzellulären Lokalisation resultieren. Jedoch zeichnet sich ab, dass einige PTI1-Kinasen, die eine hohe Homologie zueinander teilen, häufig die gleiche subzelluläre Lokalisation besitzen. So weisen AtPTI1-4 und AtPTI1-9 aus Subfamilie II sowie AtPTI1-1 und AtPTI1-2 aus Subfamilie III eine Lokalisation an der Plasmamembran auf. AtPTI1-7 und ZmPTI1a aus Subfamilie II befinden sich ebenfalls beide an der Plasmamembran und besitzen als einzige ein Myristoylierungssignal. In Subfamilie I zeigen nur die beiden sehr ähnlichen PTI1-Kinasen aus Tabak eine Korrelation zwischen dem Grad der Sequenzähnlichkeit, der Expression und der Proteinlokalisierung.

Nach Auswertung der Daten ist eine artübergreifende funktionelle Korrelation zwischen einheitlicher subzellulärer Lokalisation und einer gleichartig gewebespezifischen Expression der PTI1-Kinasen innerhalb einer Subfamilie sehr unwahrscheinlich.

#### 4.1.5 Funktionalität der *Arabidopsis* PTI1-Proteinkinasen

Sowohl die beiden Serin/Threonin-Proteinkinasen SIPTO und SIPTI1 aus Tomate (LOH UND MARTIN 1995; ZHOU *et al.* 1995), als auch ZmPTI1a, ZmPTI1b und ZmPTI1e aus Mais (HERRMANN *et al.* 2006; BUCHERT 2007; REHDERS 2010), besitzen *in vitro* Autophosphorylierungsaktivität. Für ZmPTI1c und ZmPTI1d konnte jedoch nur eine sehr schwache *in vitro* Autophosphorylierungsaktivität gezeigt werden (persönliche Mitteilung E. Ellinghaus<sup>7</sup>). Anthony *et al.* (2006) zeigten, dass PTI1-1 und PTI1-2 ebenfalls zur Autophosphorylierung *in vitro* in der Lage sind, im Gegensatz zu PTI1-3. Da für die übrigen  $p_{ol}$ PTI1-Kinasen bisher noch keine Daten vorlagen, wurde in der vorliegenden Arbeit die *in vitro* Autophosphorylierungsaktivität von PTI1-5 und PTI1-6 untersucht. Die bereits beschriebenen  $p_{ol}$ PTI1-Kinasen PTI1-1, PTI1-2 und PTI1-3 wurden ebenfalls in die Untersuchungen eingeschlossen. Die Klonierung der Expressionsvektoren auf Basis des *pET30a*-Vektors ist in Kapitel 3.3.5 beschrieben.

Zum Nachweis der *in vitro* Autophosphorylierungsaktivität der PTI1-Kinasen aus *Arabidopsis* wurden die rekombinanten His-Tag-Fusionsproteine im *E. coli*-Stamm Rosetta (DE3) überexprimiert (3.2.5.1), über *Ni-NTA Magnetic Agarose Beads* nativ aufgereinigt und mit radioaktiv markiertem  $\gamma$ -[<sup>32</sup>P]-ATP inkubiert. Nicht eingebaute Radionukleotide wurden durch wiederholtes Waschen entfernt (3.2.5.5.1). Nach Auftrennung der Proteine durch SDS-PAGE (3.2.5.6) wurde die Autophosphorylierungsaktivität mittels Autoradiografie bestimmt.



**Abbildung 4-14: *In vitro* Autophosphorylierungsaktivität der PTI1-Kinasen PTI1-1, PTI1-2, PTI1-3, PTI1-5, PTI1-6. a) Phosphorylierung und b) Coomassie-Färbung.** Größen der eingesetzten His-Tag-Fusionsproteine: PTI1-1 = 40,9 kDa, PTI1-2 = 41,5 kDa, PTI1-3 = 46,9 kDa, PTI1-5 = 46,4 kDa und PTI1-6 = 40,7 kDa.

<sup>7</sup> Insitut für Klinische Molekularbiologie, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel.

Die PTI1-Kinasen PTI1-1 und PTI1-2 besitzen, wie bereits von ANTHONY *et al.* (2006) gezeigt, *in vitro* Autophosphorylierungsaktivität (Abbildung 4-14 a). Die weiteren getesteten PTI1-Kinasen PTI1-3, PTI1-5 und PTI1-6 waren ebenfalls zur *in vitro* Autophosphorylierung fähig, jedoch zeigten sie relativ gesehen schwächere Phosphorylierungssignale. Im Gegensatz zu den Ergebnissen von ANTHONY *et al.* (2006) konnte in dieser Arbeit eine *in vitro* Autophosphorylierung von PTI1-3 gezeigt werden. Die Proteingröße der von ANTHONY *et al.* verwendeten PTI1-3-Kinase deutet daraufhin, dass die Autoren eine aminoterminal um 42 Aminosäurereste kürzere und ca. 5 kDa kleinere Spleißvariante des PTI1-3 verwendet haben, während in der vorliegenden Arbeit die Spleißvariante mit der längeren Proteinsequenz verwendet wurde (vgl. Abbildung 4-2). Denkbar ist, dass beide Varianten eine unterschiedliche *in vitro* Autophosphorylierungsaktivität besitzen.

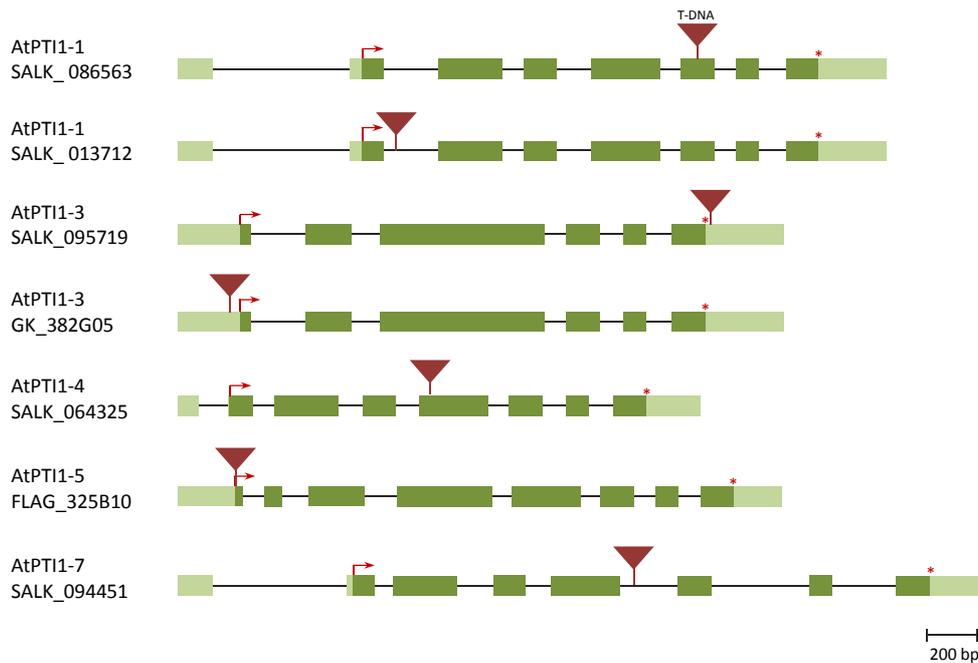
Im Rahmen dieser Arbeit konnten zusätzlich zu den bereits als *in vitro* autophosphorylierungsaktiv beschriebenen Kinasen PTI1-1 und PTI1-2, die Kinasen PTI1-3 und PTI1-6 als *in vitro* autophosphorylierungsaktiv und folglich als funktionell charakterisiert werden. Für PTI1-5 wurde ebenfalls eine *in vitro* Autophosphorylierungsaktivität angezeigt, diese war jedoch schwächer und bedarf weiterer Optimierung des Kinase-Assays.

#### 4.1.6 T-DNA-Insertionsmutanten der PTI1-Kinasen

Wie zuvor erwähnt wurden PTI1-Kinasen mit einer präferentiellen Expression in Pollen bereits in Tabak, Mais und Reis untersucht (DISSANAYAKE *et al.* 2004; HERRMANN *et al.* 2006; KONG *et al.* 2007). Für diese PTI1-Kinasen wurde eine Beteiligung an einem Signalweg diskutiert, der mit der Pollinierungs-Effizienz assoziiert ist. HERRMANN *et al.* (2006) analysierten den Knockdown von ZmPTI1a mittels stabiler RNAi-Pflanzen und zeigten, dass dieser nicht in einem morphologisch sichtbaren Pollen-Phänotyp resultierte. Kreuzungsstudien zeigten jedoch, dass eine Expression von ZmPTI1a dem männlichen Gametophyten einen deutlichen Vorteil gegenüber Pollen verschafft in denen eine ZmPTI1a-Expression nicht nachweisbar ist. Somit scheint ZmPTI1a eine wichtige Komponente für die Fortpflanzung von Mais zu sein. Ähnliches konnten KONG *et al.* (2007) berichten, die den Knockdown einer  $P_{ol}$ PTI1-Kinase aus Reis, der OsRLCK1, untersuchten. Jedoch konnten auch sie keine morphologische Veränderung von Pollen der OsRLCK1 Knockdown-Pflanzen ausmachen.

Um möglicherweise Aufschluss über die Funktion der PTI1-Kinasen aus *Arabidopsis* zu erhalten, wurden zunächst T-DNA-Insertionslinien von PTI1-1, PTI1-3, PTI1-4, PTI1-5 und PTI1-7 aus der SALK-, GabiKat- und FLAG-Kollektion (ALONSO *et al.* 2003; ROSSO *et al.* 2003; SAMSON *et al.* 2002) untersucht (Abbildung 4-15). Zur Analyse der T-DNA-Insertion wurde das aus heterozygoten Pflanzen stammende Saatgut ausgesät und der Genotyp der Sämlinge mittels PCR bestimmt. Die Lage der T-DNA innerhalb des zu untersuchenden Gens wurde durch Sequenzanalyse der amplifizierten PCR-Produkte bestätigt. Mittels RT-PCR konnte ein Verlust der PTI1-Transkripte in den homozygoten Pflanzen der Linien SALK\_086563 und SALK\_013712 für PTI1-1 sowie der Linie FLAG\_325B10 für PTI1-5 nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Für die homozygoten Pflanzen der Linien SALK\_064325 (PTI1-4) und SALK\_094451 (PTI1-7) konnte die Abwesenheit von Transkripten auch mittels Northern Blot bestätigt werden (Daten nicht gezeigt). Einige der T-DNA-Insertionen führten jedoch nicht zu einem Knockout der Gene, was auf die Position der Insertionen zurückzuführen ist. Hierzu gehören die Linien SALK\_095719 und GK\_382G05 deren T-DNA-Insertion sich im 3'-UTR bzw. im 5'-UTR befindet. Da in diesen Linien die Expression des jeweiligen *PTI1*-Gens unverändert ist, stehen diese Gene wohl weiterhin unter Kontrolle des endogenen Promotors (bei 3'-UTR Insertion) bzw. eines auf der inserierten T-DNA lokalisierten Promotors (bei 5'-UTR Insertion). Letzteres wurde bereits häufiger bei vergleichbaren T-DNA-Insertionslinien beobachtet (persönliche Mitteilung R. Lorbiecke, Biozentrum Klein Flottbek). Die entsprechenden Linien wurden bei der weiteren Charakterisierung nicht beachtet.

Für die verbliebenen Linien konnte eine Insertion der T-DNA im Exon VI für SALK\_086563, im Intron II für SALK\_013712, im Exon V für SALK\_064325, im Exon II (vgl. 4.1.2) für FLAG\_325B10 und im Intron V von SALK\_094451 bestimmt werden. Um insbesondere den Verlust der *PolPTI1*-Kinasen zu untersuchen, wurden die weiteren Charakterisierungen mit den homozygoten Knockout-Linien der *PolPTI1*-Gene durchgeführt (SALK\_086563, SALK\_013712 und FLAG\_325B10). Diese zeigten jedoch, wie auch die Knockdown-Pflanzen von *ZmPTI1a* und *OsRLCK1* in Mais bzw. Reis (HERRMANN *et al.* 2006; KONG *et al.* 2007), keinen veränderten Phänotyp der Pollen während der *in vitro* Keimung. Denkbar ist, dass der Knockdown nur eines *PolPTI1*-Gens aufgrund funktioneller Redundanz der *PolPTI1*-Gene in *Arabidopsis*, zu keinem sichtbaren Pollen-Phänotyp führt.

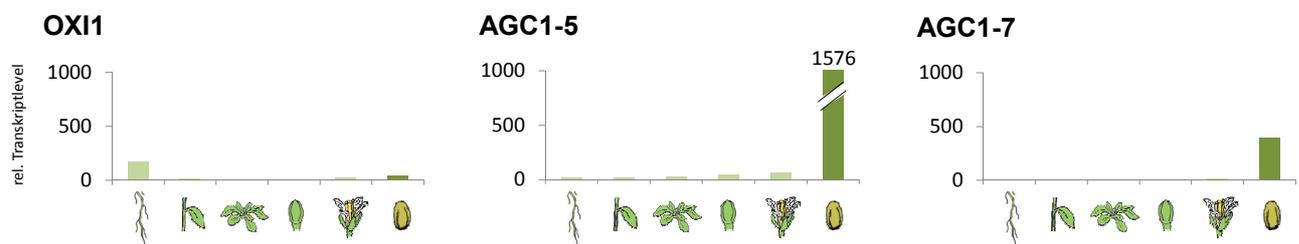


**Abbildung 4-15: T-DNA-Insertionslinien der *Arabidopsis* PTI1-Gene.** Für PTI1-1 wurden die Linien SALK\_086563 und SALK\_013712, für PTI1-3 die Linien SALK\_095719 und GK\_382G05, für PTI1-4 die Linie SALK\_064325, für PTI1-5 die Linie FLAG\_325B10 und für PTI1-7 die Linie SALK\_094451 untersucht. Die Position der T-DNA-Insertion ist durch ein rotes Dreieck vermerkt. Die dunkelgrünen Boxen stellen Exonbereiche des ORFs und die hellgrünen Boxen Exonbereiche der UTRs dar. Der Translationsstart ist mit einem Pfeil gekennzeichnet, das Translationsende mit einem Stern.

## 4.2 Pollen exprimierte AGC-Kinasen als mögliche Interaktionspartner der $P_{ol}$ PTI1-Kinasen

Da die Analyse der Mutanten keine neuen Hinweise über die möglichen Funktionen der PTI1-Kinasen lieferten, wurde mittels Identifizierung von PTI1-Interaktionspartnern versucht mehr über die Funktion dieser Kinasefamilie herauszufinden. Zu diesem Zweck wurden im Rahmen dieser Arbeit verschiedene Experimente durchgeführt, so wurden z.B. mittels eines radioaktiven Phosphoprotein-Screenings nach FUKUNAGA UND HUNTER (2004) ca. 250.000  $\lambda$ -Phagen einer cDNA-Bank nach potentiellen Substraten der PTI1-1-Kinase durchgemustert. Leider konnten mit dieser Methode keine solchen Proteine gefunden werden. Die Suche nach einem potentiellen Interaktionspartner für PTI1-1 mittels rekombinanten PTI1-1 und *Pulldown* aus *Arabidopsis*-Gesamtprotein sowie anschließender Maldi-TOF Identifizierung konnte ebenfalls keinen aussichtsreichen Kandidaten hervorbringen. In früheren Arbeiten (KLUTH 2004; PINTO 2005; BUCHERT 2007; PUSUNC 2007) wurde mittels eines Hefe-2-Hybrid-Ansatzes nach Interaktionspartnern der

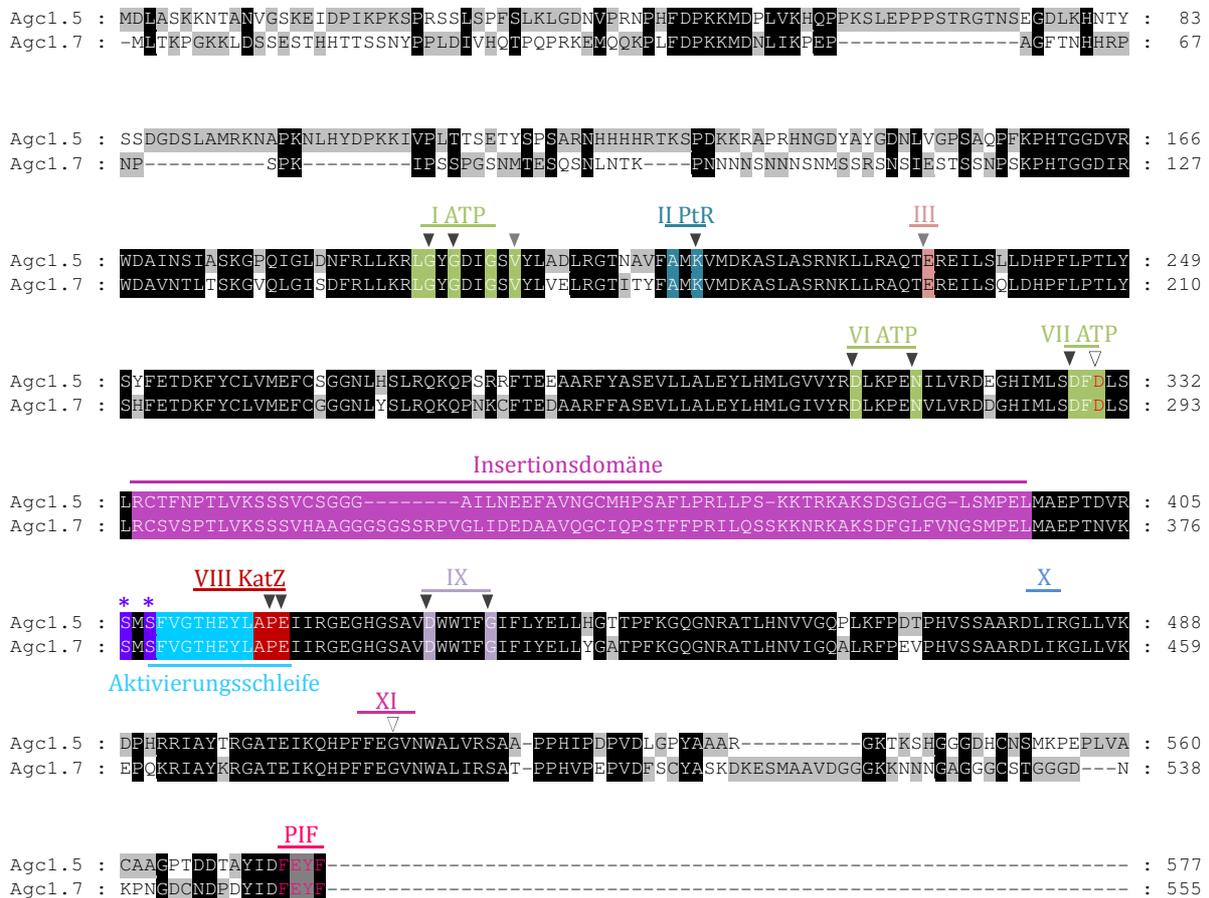
pollenspezifischen ZmPTI1a-Kinase gesucht. Anschließende Verifizierungen der gefundenen Kandidaten konnten eine *in vitro* Interaktion mit ZmPTI1a jedoch nicht bestätigen (BUCHERT 2007 und diese Arbeit). ANTHONY *et al.* (2006) konnten mittels eines Hefe-2-Hybrid-Ansatzes PTI1-1, PTI1-2 und PTI1-3 als Interaktionspartner der AGC-Kinase OXI1 (AGC2-1) identifizieren. Die weiteren Analysen bestätigten PTI1-1 und PTI1-2 als *in vitro* Phosphorylierungssubstrate von OXI1. Eine ähnliche Aktivierung nach Behandlung mit u.a. PA, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und Xylanase wie OXI1 zeigte jedoch nur PTI1-2. OXI1 weist allerdings laut *in silico* Daten nur eine geringe mRNA Expression in Pollen auf (Abbildung 4-16), weshalb OXI1 eher kein *in vivo* Interaktionspartner der *pol*PTI1-Kinase PTI1-1 in Pollen ist. In der vorliegenden Arbeit wurde daher der Frage nachgegangen, ob es AGC-Kinasen gibt, die ebenfalls vorwiegend in Pollen exprimiert sind und als mögliche Interaktionspartner der *pol*PTI1-Kinasen in Frage kommen. Durch *in silico* Analysen konnten zwei potentielle Proteine, AGC1-5 und AGC1-7 gefunden werden (Abbildung 4-16). ZHANG *et al.* (2009) konnten bereits anhand von RT-PCR und Promotor-YFP-Studien (*yellow fluorescent protein*, YFP) verifizieren, dass AGC1-5 und AGC1-7 vornehmlich in Pollen exprimiert sind. Darüber hinaus zeigten die Autoren, dass diese beiden AGC-Kinasen wichtig für das gerichtete Wachstum von Pollenschläuchen sind.



**Abbildung 4-16: *In silico* Analyse von Microarray-Daten der *Arabidopsis* AGC-Kinasen OXI1, AGC1-5 und AGC1-7 in verschiedenen Geweben.** Die relativen Transkriptlevel der Gene sind in den Geweben Wurzeln, Stängelblättern, Rosettenblättern, Knospen, reifen Blüten und reifen Pollen dargestellt (von links nach rechts). Microarray-Daten stammen von SCHMID *et al.* (2005).

Die drei Serin/Threonin-Kinasen, OXI1 (At3g25250), AGC1-5 (At3g12690) und AGC1-7 (At1g79250), werden in die pflanzenspezifische Unterfamilie AGCVIII der AGC-Kinasen eingeordnet, welche sich durch zwei Charakteristika von den anderen AGC-Unterfamilien unterscheidet. Zum einen besitzen sie ein DFD-Motiv in der Kinasesubdomäne VII anstelle des konservierten DFG-Motivs und zum anderen besitzen sie eine kleine variable Sequenzregion, welche zwischen den katalytischen Subdomänen VII und VIII inseriert ist (Abbildung 4-17). Das DFD-Motiv ist auch in anderen Proteinkinasen zu finden. In Verbindung mit der Insertion der variablen Sequenz ist es aber spezifisch für die

pflanzlichen AGCVIII-Kinasen. Die AGCVIII Unterfamilie wurde wiederum von BÖGRE *et al.* (2003) anhand der Aminosäuresequenzen in die zwei Subfamilien AGCVIIIa und AGCVIIIb unterteilt. Während AGC1-5 und AGC1-7 zur Subfamilie AGCVIIIa gehören, ist OXI1 der Subfamilie AGCVIIIb zugeordnet.



**Abbildung 4-17: Aminosäurealignment der AGCVIIIa-Kinasen AGC1-5 und AGC1-7.** Das Alignment wurde mit Hilfe von *ClustalX2* erstellt. Subdomänen der Proteinkinasen nach Hanks *et al.* (1988). Pfeile markieren die Positionen der 14 hochkonservierten Aminosäuren (nach HANKS *et al.* 1988 und HANKS & QUINN 1991). Gefüllte Pfeile kennzeichnen die hochkonservierten Aminosäuren, offene Pfeile die nicht konservierten Aminosäuren. ATP = ATP-Bindungsstelle, PtR = Phosphotransfer-Reaktion, KatZ = Katalytisches Zentrum, PIF = PDK1 interagierendes Fragment. Mit Stern (\*) markierte Serinreste sind bevorzugtes Ziel der pflanzlichen PDK1-Phosphorylierung.

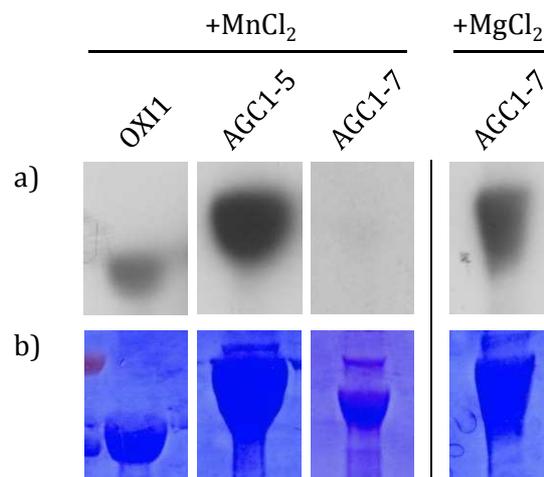
Um eine mögliche Interaktion zwischen den  $P_{01}$ PTI1-Kinasen und den AGC-Kinasen AGC1-5 und AGC1-7 zu prüfen, wurde zunächst die Funktionalität der beiden AGC-Kinasen anhand ihrer *in vitro* Autophosphorylierungsaktivität untersucht (4.2.1). In weiteren Ansätzen wurde anschließend eine mögliche Interaktion mit den  $P_{01}$ PTI1-Kinasen sowohl durch *in vitro* Interaktions-Kinase-Assays (4.2.2.1) als auch mit *in vitro* Bindungsstudien (4.2.2.2)

erforscht. Da AGC1-5 eine deutlich höhere Expression in Pollen besitzt als AGC1-7, wurden diese Studien zunächst mit AGC1-5 durchgeführt.

#### 4.2.1 Funktionalität der AGC-Kinasen AGC1-5 und AGC1-7

Zum Nachweis der *in vitro* Autophosphorylierungsaktivität von AGC1-5 und AGC1-7 wurden die zu testenden rekombinanten His-Tag-Fusionsproteine im *E. coli*-Stamm Rosetta (DE3) überexprimiert (3.2.5.1) und über *Ni-NTA Magnetic Agarose Beads* nativ aufgereinigt. Der Phosphorylierungsassay wurde wie bereits unter 4.1.5 für die PTI1-Kinasen beschreiben durchgeführt.

Als Positivkontrolle des hier verwendeten Systems diente das bereits von FORZANI *et al.* (2011) als autophosphorylierungsaktiv getestete OXI1. Im Unterschied zu dem von FORZANI *et al.* (2011) getesteten OXI1 mit N-terminalem His-Tag wurden in der vorliegenden Arbeit OXI1 sowie auch AGC1-5 und AGC1-7 mit einem C-terminalen His-Tag versehen (OXI1•HIS, AGC1-5•HIS und AGC1-7•HIS).



**Abbildung 4-18: *In vitro* Kinase Assay mit den rekombinanten AGCVIII-Kinasen OXI1, AGC1-5 und AGC1-7.** Die überexprimierten His-Tag-Fusionsproteine wurden nativ aufgereinigt und mit radioaktiv markiertem  $\gamma$ -[ $^{32}$ P]-ATP und dem Cofaktor  $MnCl_2$  bzw.  $MgCl_2$  inkubiert. **a)** Autophosphorylierungsaktivität. Die Expositionszeit für den Nachweis der Phosphorylierung lag bei 4 h bzw. 18 h für AGC1-7 in Verbindung mit dem Cofaktor  $MnCl_2$ . **b)** Coomassie-Färbung der aufgetrennten Proteinproben. Die Größen der eingesetzten His-Tag-Fusionsproteine sind: OXI1 = 49,1 kDa, AGC1-5 = 64,8 kDa und AGC1-7 = 62,2 kDa.

Die Kinasen OXI1, AGC1-5 und AGC1-7 sind mit dem hier verwendeten Protokoll zur *in vitro* Autophosphorylierung in der Lage (Abbildung 4-18). AGC1-7 besaß allerdings nur bei Verwendung von  $MgCl_2$  als Cofaktor *in vitro* Autophosphorylierungsaktivität und war

autophosphorylierungsinaktiv wenn alternativ  $MnCl_2$  verwendet wurde. OXI1 und AGC1-5 hingegen waren in Gegenwart von  $MnCl_2$  zur *in vitro* Autophosphorylierung fähig.

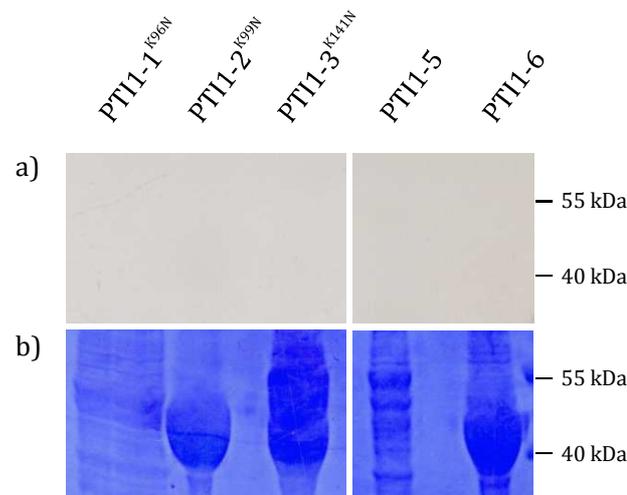
#### 4.2.2 $P_{ol}$ PTI1-Kinasen und PTI1-2 interagieren *in vitro* mit AGC1-5

Um die Phosphorylierung der PTI1-Kinasen durch die AGCVIIIa-Kinase AGC1-5 zu untersuchen, wurden als Substrat unter anderem PTI1-Kinasen eingesetzt, die keine Autophosphorylierungsaktivität besitzen. Dies ist sinnvoll, um bei einem Phosphorylierungssignal zwischen Autophosphorylierung und *trans*-Phosphorylierung unterscheiden zu können. Hierzu wurden modifizierte PTI1-Fusionsproteine eingesetzt (PTI1-1<sup>K96N</sup>•HIS, PTI1-2<sup>K99N</sup>•HIS, PTI1-3<sup>K141N</sup>•HIS). In diesen PTI1-Kinasen ist das hochkonservierte Lysin in der Kinasesubdomäne II, welches essentiell bei PTI1-Kinasen für eine putative Autophosphorylierung zu sein scheint, durch ein Asparagin ersetzt. Daher handelt es sich bei diesen modifizierten PTI1-Kinasen höchstwahrscheinlich um inaktive Kinasen, wie es bereits für SlPTI1<sup>K96N</sup> und ZmPTI1a<sup>K100N</sup> gezeigt wurde (SESSA *et al.* 2000; HERRMANN *et al.* 2006). Der Austausch der Aminosäuren fand durch punktgerichtete Mutagenese statt und ist genauer in Abschnitt 3.3.5.1 beschrieben (diese Arbeit und LINNEMANN 2011<sup>8</sup>).

Überdies wurden die PTI1-Kinasen PTI1-5•HIS und PTI1-6•HIS verwendet, die abgesehen von einem His-Tag der aktiven Form der beiden Kinasen entsprechen. Beide PTI1-Kinasen besitzen zwar *in vitro* Autophosphorylierungsaktivität (vgl. 4.1.5), diese ist jedoch über den kurzen Zeitraum des Assays nicht detektierbar. Daher eignen sich beide Proteine trotz eigener schwacher Autophosphorylierungsaktivität als Substrate im Kinase-Assay.

Wie erwartet zeigen die modifizierten Kinasen PTI1-1<sup>K96N</sup>, PTI1-2<sup>K99N</sup> und PTI1-3<sup>K141N</sup> keine Autophosphorylierungsaktivität. Ebenso konnte für Kinasen PTI1-5 und PTI1-6 innerhalb der Expositionszeit keine Autophosphorylierungsaktivität detektiert werden (Abbildung 4-19). Die Aufreinigung von PTI1-1<sup>K96N</sup> und PTI1-5 ist nicht sehr erfolgreich gewesen und bedarf weiterer Optimierung. Die Aufreinigung von PTI1-3<sup>K141N</sup> führte indes zur Anreicherung von zwei Banden, deren Molekulargewichte bei ca. 42 kDa bzw. 47 kDa liegen. Ursache der zwei Translationsprodukte könnte ein alternativer Translationsstart sein, der 42 Aminosäurereste stromabwärts des ersten Translationsstarts liegt. Laut TAIR entsprechen diese beiden Translationsprodukte Spleißvarianten in *Arabidopsis*.

<sup>8</sup> Im Rahmen dieser Arbeit betreute Bachelorarbeit.

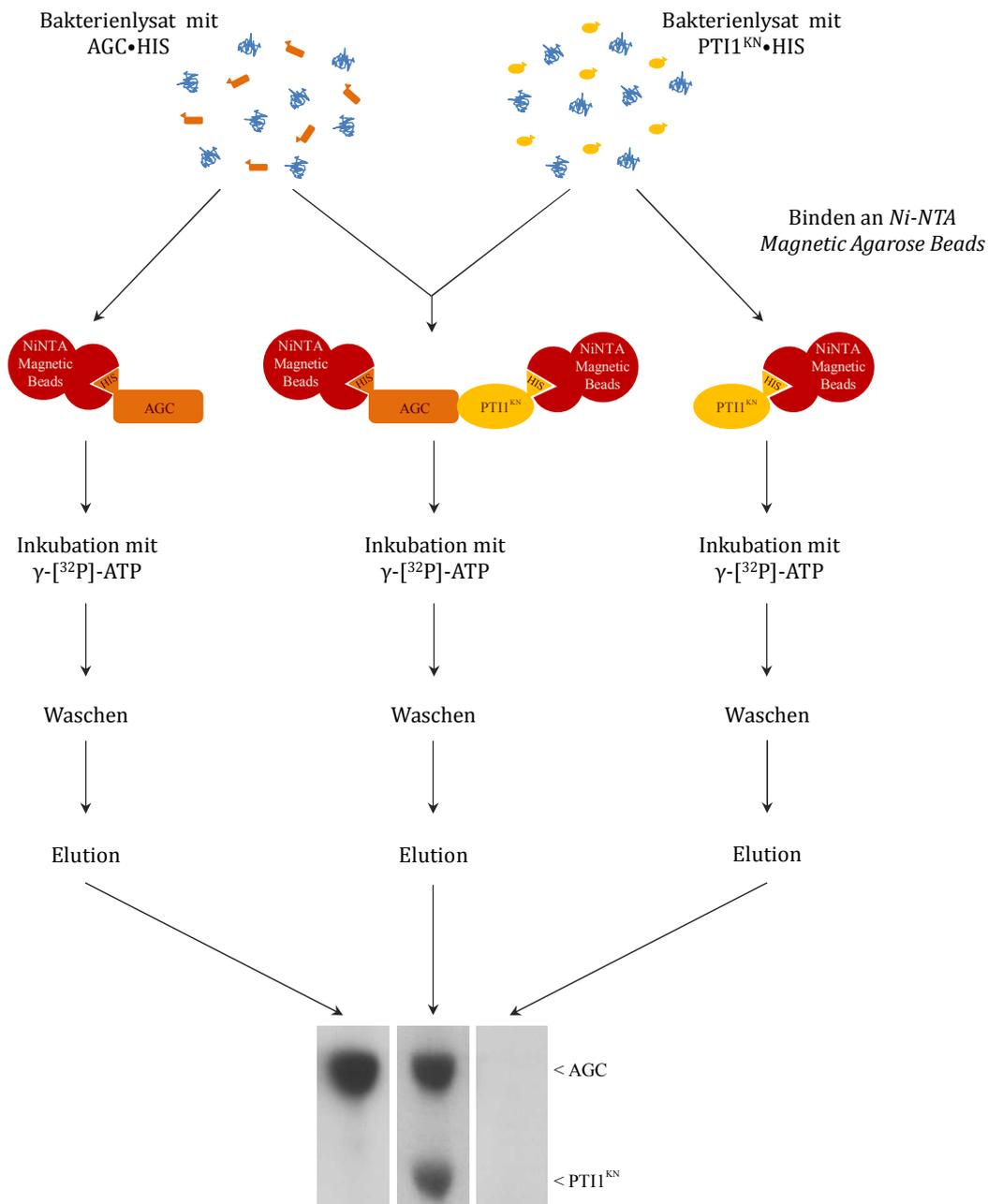


**Abbildung 4-19: *In vitro* Kinase Assay mit den modifizierten PTI1-Kinasen PTI1-1<sup>K96N</sup>, PTI1-2<sup>K99N</sup> und PTI1-3<sup>K141N</sup> und den PTI1-Kinasen PTI1-5 und PTI1-6.** Die überexprimierten His-Tag-Fusionsproteine wurden nativ aufgereinigt und mit radioaktiv markiertem  $\gamma$ -[<sup>32</sup>P]-ATP und dem Cofaktor MnCl<sub>2</sub> inkubiert. **a)** Autoradiogramm mit einer Expositionszeit von 4 h. **b)** Coomassie-Färbung der aufgetrennten Proteinproben. Die Größen der eingesetzten His-Tag-Fusionsproteine sind: PTI1-1<sup>K96N</sup> = 40,9 kDa, PTI1-2<sup>K99N</sup> = 41,5 kDa, PTI1-3<sup>K141N</sup> = 46,9 kDa bzw. 42,0 kDa, PTI1-5 = 46,4 kDa und PTI1-6 = 40,7 kDa.

#### 4.2.2.1 Interaktions-Kinase-Assays

Zur Durchführung der Interaktions-Kinase-Assays wurden die rekombinanten His-Tag-Fusionsproteine zunächst einzeln überexprimiert (3.2.5.1). Die geklärten Gesamtproteinlysate wurden anschließend entweder vereinigt oder blieben getrennt voneinander. Nach nativer Aufreinigung mittels *Ni-NTA Magnetic Agarose Beads* wurden die rekombinanten Proteine in Anwesenheit von radioaktiv markiertem  $\gamma$ -[<sup>32</sup>P]-ATP inkubiert (3.2.5.5.2). Die Auftrennung der Proteine erfolgte durch SDS-PAGE (3.2.5.6) und die Phosphorylierungsaktivität wurde mittels Autoradiografie bestimmt. Der Versuchsablauf ist schematisch in Abbildung 4-20 dargestellt.

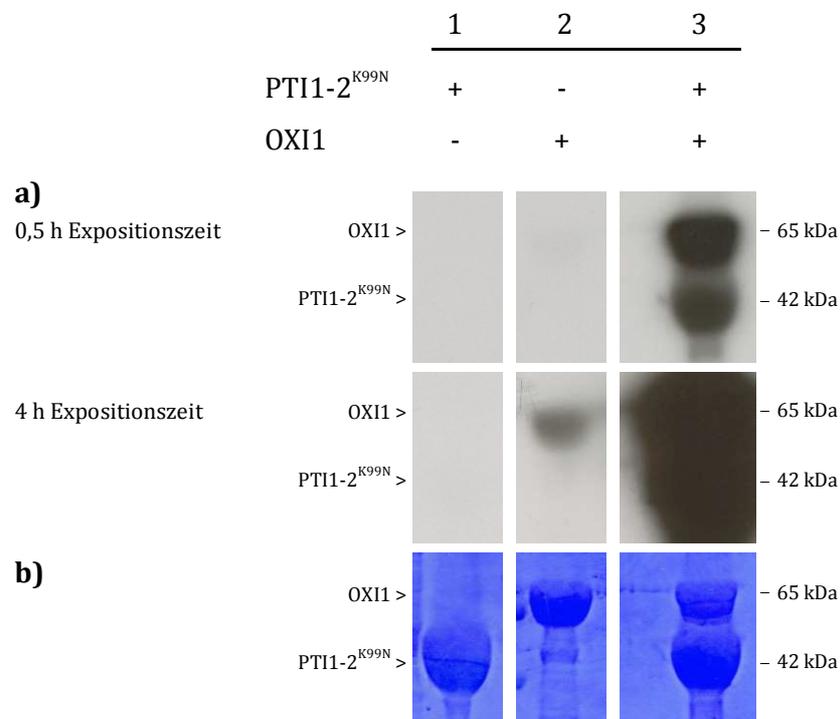
Als Positivkontrolle für die Interaktion einer AGC-Kinase und einer PTI1-Kinase wurden die von ANTHONY *et al.* (2006) verwendeten Kinasen OXI1 und PTI1-2 eingesetzt. PTI1-2 wurde allerdings in der autophosphorylierungsdefizienten Form PTI1-2<sup>K99N</sup> verwendet. Im Unterschied zu den von ANTHONY *et al.* (2006) verwendeten rekombinanten Fusionsproteinen mit N-terminalem GST-Tag wurden in diesem Versuch rekombinante Fusionsproteine mit einem C-terminalen His-Tag eingesetzt.



**Abbildung 4-20: Versuchsablauf der *in vitro* Interaktions-Kinase-Assays.** Die Bakterienlysate der überexprimierten Fusionsproteine wurden vereinigt oder getrennt voneinander weiterbehandelt. Die rekombinanten His-Tag-Proteine wurden über *Ni-NTA Magnetic Agarose Beads* nativ aufgereinigt und mit radioaktiv markiertem  $\gamma$ -[<sup>32</sup>P]-ATP und dem Cofaktor  $MnCl_2$  inkubiert. Nach Entfernen der nicht eingebauten Radionukleotide durch zweimaliges Waschen wurden die Proteine von den *Ni-NTA Magnetic Agarose Beads* durch abkochen mit 4x SDS-Probenpuffer eluiert. Die Auftrennung der Proteine erfolgte durch SDS-PAGE und die Phorylierungssignale wurde durch Autoradiografie detektiert.

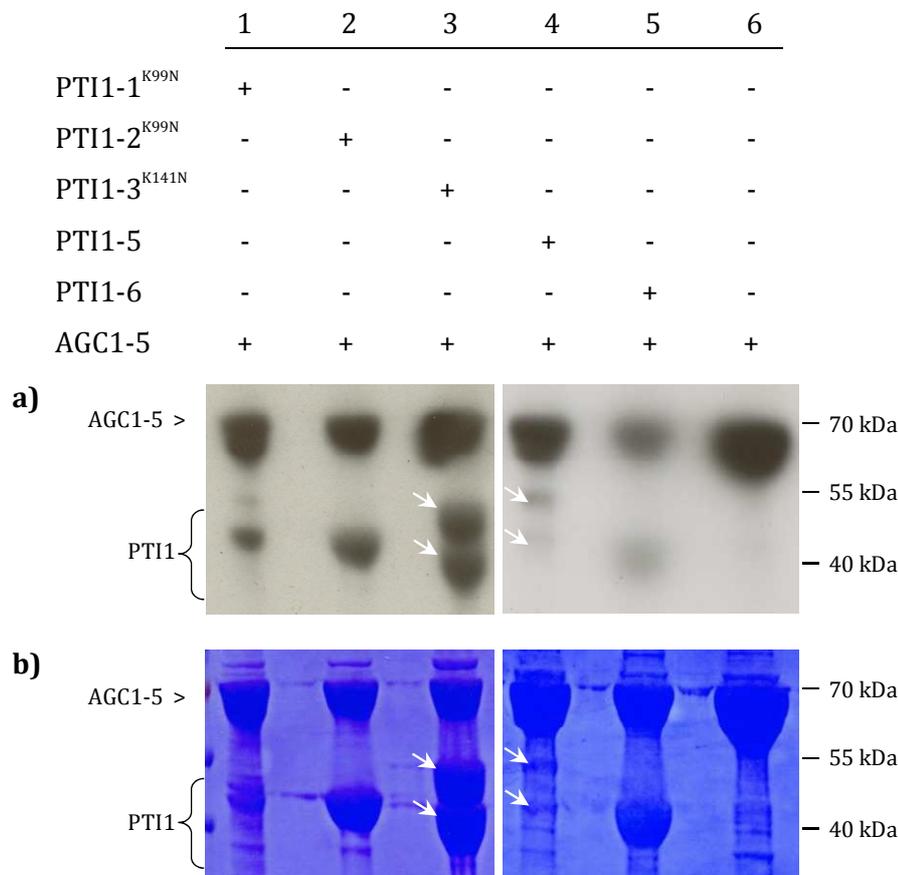
Wie schon für OXI1 und PTI1-2 ANTHONY *et al.* (2006) gezeigt, kann OXI1 das modifizierte PTI1-2<sup>K99N</sup>, welches selber keine Autophosphorylierungsaktivität zeigt (Abbildung 4-21 a, Spur 1), phosphorylieren. Bereits nach einer kurzen Expositionszeit von 0,5 h zeigen sich im Autoradiogramm Phosphorylierungssignale bei einer Größe von ca. 65 kDa und 42 kDa

(Spur 3). Die Höhe dieser Signale entspricht in etwa der Größe der rekombinanten His-Tag-Fusionsproteine OXI1•HIS und PTI1-2<sup>K99N</sup>•HIS. OXI1 allein zeigt zu diesem Zeitpunkt noch kein Phosphorylierungssignal (Spur 2), obwohl es eine *in vitro* Autophosphorylierungsaktivität besitzt (Abbildung 4-18) und bei Co-Inkubation mit PTI1-2<sup>K99N</sup> zu diesem Zeitpunkt schon ein Phosphorylierungssignal zeigt (Spur 3). Erst nach einer Expositionszeit von 4 h ist ein Phosphorylierungssignal von OXI1 zu erkennen, welches zum gleichen Zeitpunkt allerdings deutlich schwächer ist als das Signal von OXI1 bei Co-Inkubation mit PTI1-2<sup>K99N</sup> (Spur 3). Ähnliches wurde von FORZANI *et al.* (2011) bei der Untersuchung der Interaktion von PTI1-4 und OXI1 beobachtet. Die Gegenwart des rekombinanten PTI1-4-Proteins, welches selber keine Autophosphorylierungsaktivität zeigte, führte nach Inkubation mit OXI1 zu einer erhöhten *in vitro* Autophosphorylierungsaktivität von OXI1. In weiteren Kinase Assays konnten FORZANI *et al.* (2011) anschließend zeigen, dass eine Verlängerung der gemeinsamen Inkubation sowie eine erhöhte Menge an PTI1-4-Protein die Autophosphorylierungsaktivität von OXI1 ebenfalls ansteigen lässt. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deuten daraufhin, dass auch PTI1-2 die OXI1 Kinaseaktivität aktivieren kann, wie es zuvor schon für PTI1-4 gezeigt wurde. Des Weiteren konnten in diesem Experiment die publizierten Ergebnisse und damit die Funktionalität des durchgeführten Systems bestätigt werden.



**Abbildung 4-21: *In vitro* Phosphorylierung von PTI1-2<sup>K99N</sup> durch OXI1.** Die überexprimierten His-Tag-Fusionsproteine wurden nativ zusammen bzw. getrennt voneinander aufgereinigt und mit radioaktiv markiertem  $\gamma$ -[<sup>32</sup>P]-ATP und dem Cofaktor MnCl<sub>2</sub> inkubiert. **a)** Autoradiogramm: oberer Teil zeigt kurze Exposition von 0,5 h, unterer Teil längere Exposition von 4 h. **b)** Coomassie-Färbung. Größen der eingesetzten His-Tag-Fusionsproteine: PTI1-2<sup>K99N</sup> = 41,5 kDa und OXI1 = 49,1 kDa.

Durch Co-Inkubation der modifizierten PTI1-Kinasen PTI1-1<sup>K96N</sup>•HIS, PTI1-2<sup>K99N</sup>•HIS, PTI1-3<sup>K141N</sup>•HIS bzw. der nichtmodifizierten PTI1-Kinasen PTI1-5•HIS und PTI1-6•HIS mit AGC1-5•HIS sollte untersucht werden, ob diese PTI1-Kinasen durch AGC1-5 phosphoryliert werden können. Die modifizierten PTI1-Kinasen PTI1-1<sup>K96N</sup>, PTI1-2<sup>K99N</sup> und PTI1-3<sup>K141N</sup> zeigten deutliche Phosphorylierungssignale nach 18 h Expositionszeit (Spuren 1 bis 3). Eine Phosphorylierung der Kinasen PTI1-5 und PTI1-6 wurde bereits nach 4 h Expositionszeit detektiert (Spuren 5 und 6). Infolgedessen ist die AGCVIII-Kinase AGC1-5 in der Lage die PTI1-Kinasen PTI1-1, PTI1-2, PTI1-3, PTI1-5 und PTI1-6 *in vitro* zu phosphorylieren.



**Abbildung 4-22: *In vitro* Phosphorylierung der PTI1-Kinasen PTI1-1<sup>K96N</sup>, PTI1-2<sup>K99N</sup>, PTI1-3<sup>K141N</sup>, PTI1-5 und PTI1-6 durch AGC1-5.** Die überexprimierten His-Tag-Fusionsproteine wurden zusammen bzw. getrennt voneinander nativ aufgereinigt und mit radioaktiv markiertem  $\gamma$ -[<sup>32</sup>P]-ATP und dem Cofaktor MnCl<sub>2</sub> inkubiert. Die Expositionszeit der Spuren 1 bis 3 entsprach 18 h und die der Spuren 4 bis 6 4 h. Die Größen der His-Tag-Fusionsproteine sind wie folgt: PTI1-1<sup>K96N</sup> = 40,9 kDa, PTI1-2<sup>K99N</sup> = 41,5 kDa, PTI1-3<sup>K141N</sup> = 46,9 kDa bzw. 42,0 kDa, PTI1-5 = 46,4 kDa bzw. 41,9 kDa, PTI1-6 = 40,7 kDa und AGC1-5 = 64,8 kDa. Pfeile verweisen auf die Doppelbanden infolge alternativer Translationsstarts. **a)** Autoradiogramm und **b)** Coomassie Färbung.

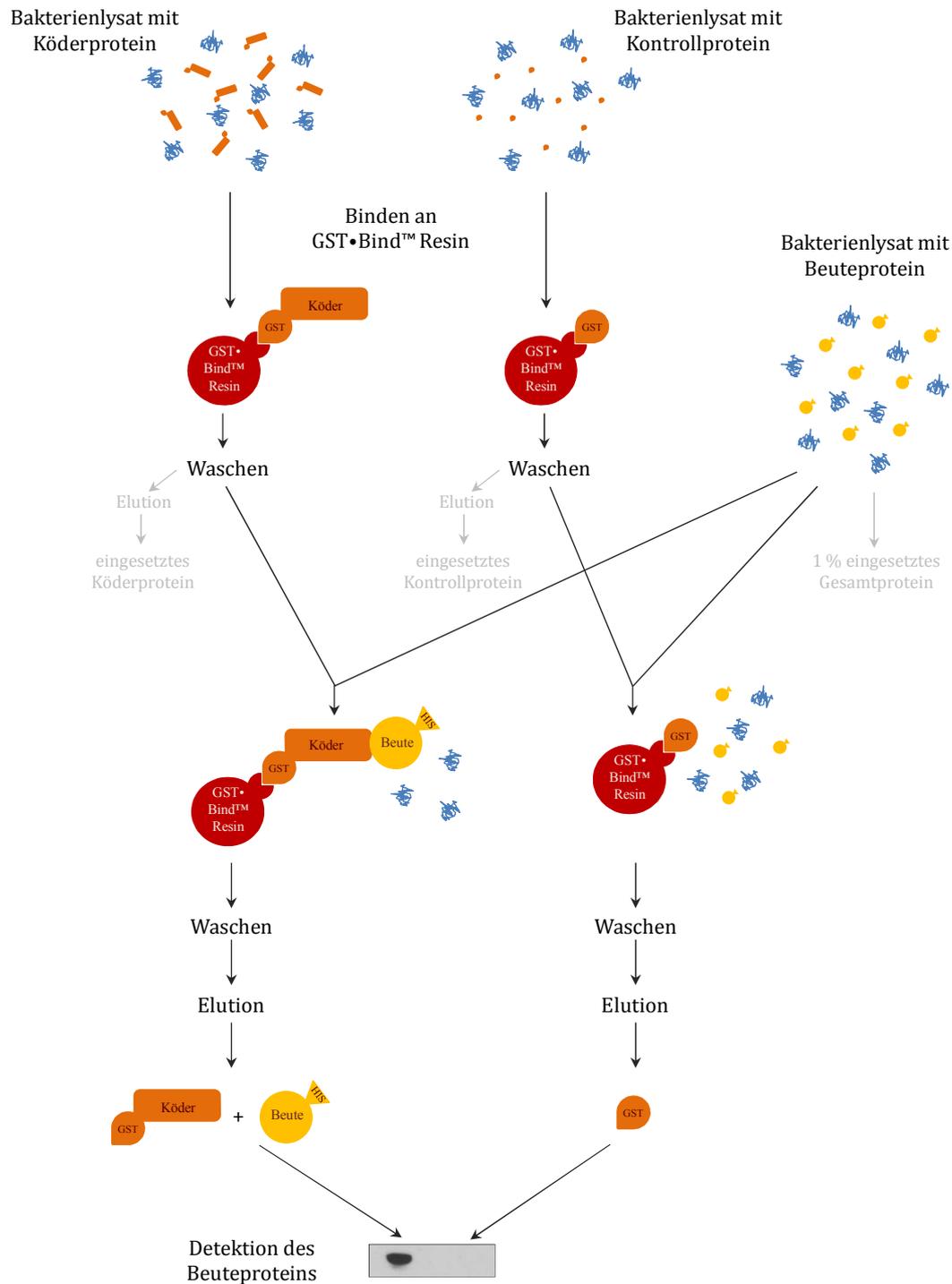
Aufgrund der Unterschiede in der Menge der eingesetzten Proteine sowie der Expositionszeit ist nicht auf eine Substratspezifität von AGC1-5 zu schließen.

Die Aufreinigung von PTI1-5•HIS führte, wie bei PTI1-3<sup>K141N</sup>•HIS, zur Anreicherung von zwei Translationsprodukten. PTI1-5 besitzt ebenfalls ein Methionin stromabwärts des ersten Translationsstarts (Abbildung 4-2), welches vermutlich die Ursache für Expression des kürzeren Proteins in *E. coli* ist. Das trunkierte Protein von PTI1-5 entspricht laut *TAIR* im Gegensatz zu dem von PTI1-3 nicht einer der in *Arabidopsis* vorkommenden Spleißvarianten, und ist somit wahrscheinlich ein durch das heterologe System hervorgerufenen Artefakt. Wie dem Autoradiogramm zu entnehmen ist, wurden sowohl die kürzere als auch die längere Form von PTI1-3 und PTI1-5 durch AGC1-5 phosphoryliert.

#### 4.2.2.2 *In vitro* GST-Bindungsstudien

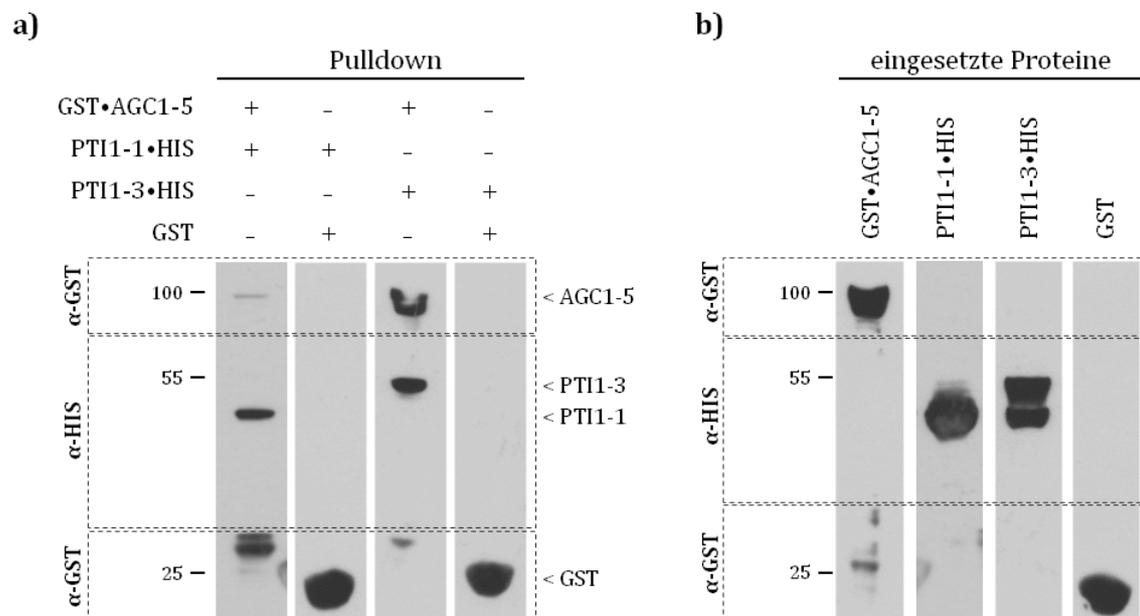
Um die physikalische *in vitro* Interaktion zwischen der Kinase AGC1-5 und den <sub>Pol</sub>PTI1-Kinasen durch ein weiteres Experiment zu bestätigen, wurde ein *in vitro* Gluthation-S-Transferase-Bindungsassay (GST-Pulldown) durchgeführt. Die einzelnen Schritte dieses GST-Bindungsassays sind in Abbildung 4-23 schematisch dargestellt. Als Köderprotein (*Bait*) wurde das rekombinante GST-*Tag*-Fusionsprotein GST•AGC1-5 verwendet. Als Negativkontrolle diente unfusioniertes GST. Die His-*Tag*-Fusionsproteine PTI1-1•HIS bzw. PTI1-3•HIS wurden als Beuteproteine (*Prey*) eingesetzt. Die rekombinanten GST- bzw. His-*Tag*-Fusionsproteine wurden in *E. coli*-Zellen des Stammes Rosetta (DE3) überexprimiert (3.2.5.1). Zunächst wurden die Köderproteine GST•AGC1-5 und GST mittels *GST•Bind™ Resin* unter nativen Bedingungen aufgereinigt und nicht gebundene bzw. unspezifisch gebundene Proteine wurden durch mehrfaches Waschen entfernt. Anschließend wurden die an der *GST•Bind™ Resin* immobilisierten Proteinen mit geklärtem Gesamtproteinextrakt aus der Überexpression von PTI1-1•HIS bzw. PTI1-3•HIS im Verhältnis 1:4,5 (PTI1 : AGC1-5) bzw. 1:1,5 (PTI1 : GST) versetzt. Nach 2-stündiger Inkubation wurden erneut die ungebundenen bzw. unspezifisch gebundenen Proteine durch mehrfaches Waschen entfernt und die Proteine mittels SDS-PAGE anhand ihres Molekulargewichts aufgetrennt. Der Nachweis von GST•AGC1-5 und GST sowie von PTI1-1•HIS und PTI1-3•HIS erfolgte mittels immunologischer Detektion mit einem GST-Antikörper bzw. einem His-Antikörper.

Die durchgeführten GST-Pulldown-Assays (Abbildung 4-24) zeigen, dass sowohl PTI1-1 als auch PTI1-3 in Anwesenheit von GST•AGC1-5 über die *GST•Bind™ Resin* aufgereinigt wurden. Dies war nicht der Fall, wenn nur GST alleine als Köderprotein verwendet wurde. Diese Ergebnisse zeigen, dass AGC1-5 ein physikalischer Interaktionspartner von PTI1-1 und PTI1-3 ist.



**Abbildung 4-23: Versuchsablauf der *in vitro* Bindungsstudien.** Die überexprimierten GST-Köderproteine (GST•AGC1-5 bzw. GST) wurden nativ über *GST•Bind™ Resin* aufgereinigt. Nach Entfernen der ungebundenen bzw. unspezifisch gebundenen Proteine durch mehrmaliges Waschen wurden die immobilisierten Köderproteine mit geklärtem Bakterienlysat inkubiert, welches die überexprimierten Beuteproteine (PTI1-x•HIS) enthielt. Nach erneutem Entfernen von ungebundenen Proteinen wurden die immobilisierten Proteine von der *GST•Bind™ Resin* durch abkochen mit 4x SDS-Probenpuffer eluiert. Zur Kontrolle der eingesetzten Proteine und Proteinmengen wurden zusätzlich GST-Köderproteine über *GST•Bind™ Resin* nativ aufgereinigt und mit 4x SDS-Probenpuffer eluiert. Ebenfalls wurde 1% des eingesetzten Gesamtproteins aus dem geklärten Bakterienlysat mit Beuteprotein mit 4x SDS-Probenpuffer versetzt. Die Auftrennung der Proteine erfolgte durch SDS-PAGE und der Nachweis der Köder- und Beuteproteine wurde mittels Western Blot und Immunodetektion durchgeführt.

Interessanterweise wurde nur die obere der beiden PTI1-3-Proteinbanden (ca. 47 kDa) von AGC1-5 gebunden, obwohl im Kinase Assay beide PTI1-3-Banden von AGC1-5 phosphoryliert wurden (4.2.2.1). Dass keine Bindung zwischen der kürzeren Variante des PTI1-3 und AGC1-5 stattfindet ist überraschend, da der N-Terminus der kurzen Variante dem von PTI1-1 ähnelt (Abbildung 4-2), welches wiederum von AGC1-5 gebunden wurde. Die selektive Bindung an die längere Spleißvariante könnte auf eine hohe Substratspezifität der AGC1-5-Kinase hindeuten. Zudem scheinen die zusätzlichen 42 Aminosäurereste der längeren PTI1-3-Spleißvariante notwendig zu sein, um eine Bindedomäne für das AGC1-5 zu schaffen. Deutlich wird außerdem, dass es Unterschiede zwischen der phosphorylierenden Interaktion und der physikalischen Interaktion gibt.

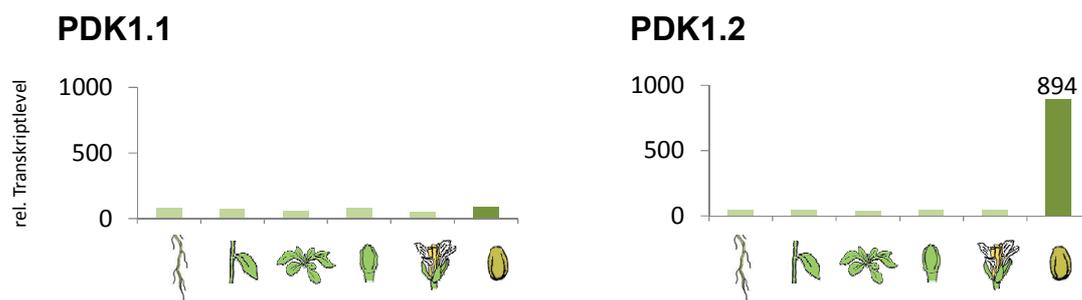


**Abbildung 4-24: *In vitro* GST-Pull-down von PTI1-1 und PTI1-3 durch GST•AGC1-5.** **a)** Die überexprimierten GST-Köderproteine (GST•AGC1-5 bzw. GST) wurden nativ aufgereinigt. Nach Entfernen der ungebundenen Proteine wurden die immobilisierten Köderproteine mit geklärtem Bakterienlysat, welches die überexprimierten Beuteproteine (PTI1-1•HIS bzw. PTI1-3•HIS) enthielt, inkubiert. **b)** Zur Kontrolle der eingesetzten Proteine wurden GST-Köderproteine nativ aufgereinigt sowie 1% des eingesetzten Gesamtproteins aus dem geklärten Bakterienlysat mit dem jeweiligen Beuteprotein (PTI1-1•HIS bzw. PTI1-3•HIS) entnommen. **a + b)** Der Nachweis der Köder- und Beuteproteine wurde mittels Western Detektion mit einem GST- und einem His-Antikörper durchgeführt. Die Größen der eingesetzten rekombinanten Fusionsproteine sind wie folgt: PTI1-1•HIS = 40,9 kDa, PTI1-3•HIS = 46,9 kDa bzw. 42,0 kDa, GST•AGC1-5 = 89,9 kDa und GST = 26,0 kDa. Artifizielle Abbauprodukte von GST•AGC1-5 finden sich zwischen ca. 25 bis 30 kDa.

### 4.2.3 PDK1.2 interagiert *in vitro* mit AGC1-5

Ein bereits identifizierter Interaktionspartner vieler AGCVIII-Kinasen in *Arabidopsis* ist die PDK1.1-Kinase (3-Phosphoinositid-abhängige Proteinkinase 1). In *in vitro* Pull-down-Studien interagierte PDK1.1 mit 16 der 17 AGCVIIIa Kinasen aus *Arabidopsis*. Bis auf WAG1, WAG2 und KIPK wurden diese auch von PDK1.1 phosphoryliert (ZEGZOUTI *et al.* 2006a;b). Dass auch Mitglieder der AGCVIIIb-Unterfamilie aus *Arabidopsis in vitro* Interaktionspartner von PDK1.1 sind zeigten ANTHONY *et al.* (2006) mit einem Hefe-2-Hybrid-Ansatz für OXI1 (AGC2-1) und AGC2-2. Für PINOID und PDK1.1 konnte zudem eine *in vivo* Interaktion in transgenen *Arabidopsis*-Pflanzen nachgewiesen werden (ZEGZOUTI *et al.* 2006a).

PDK1.1 ist ebenfalls eine Serin/Threonin-Kinase, die selbst zu den AGC-Kinasen gehört. Ursprünglich wurde die PDK1 in Säugerzellen als ein Aktivator der Proteinkinase B (PKB) identifiziert. Unter Eukaryoten sind PDK1-Kinasen hochkonserviert und Vertreter kommen sowohl in Tieren, Hefen und Pflanzen vor. In Pflanzen agiert PDK1 stromabwärts von Phospholipiden wie Phosphatidsäure (PA) und Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat (PI(4,5)P<sub>2</sub>) und aktiviert AGC Kinasen, die in verschiedene Prozesse involviert wie z.B. Pathogenabwehr und Wurzelhaarwachstum (BÖGRE *et al.* 2003; GALVÁN-AMPUDIA & OFFRINGA 2007; ZHANG & MCCORMICK 2009). PDK1.1 wird in Pflanzen zudem als wichtiger, aber nicht universeller, Regulator der AGCVIIIa Kinase-Aktivität diskutiert (ZEGZOUTI *et al.* 2006b). *In silico* Studien der vorliegenden Arbeit zeigen jedoch, dass PDK1.1 relativ schwach in Pollen und den übrigen betrachteten Geweben exprimiert ist (Abbildung 4-25).

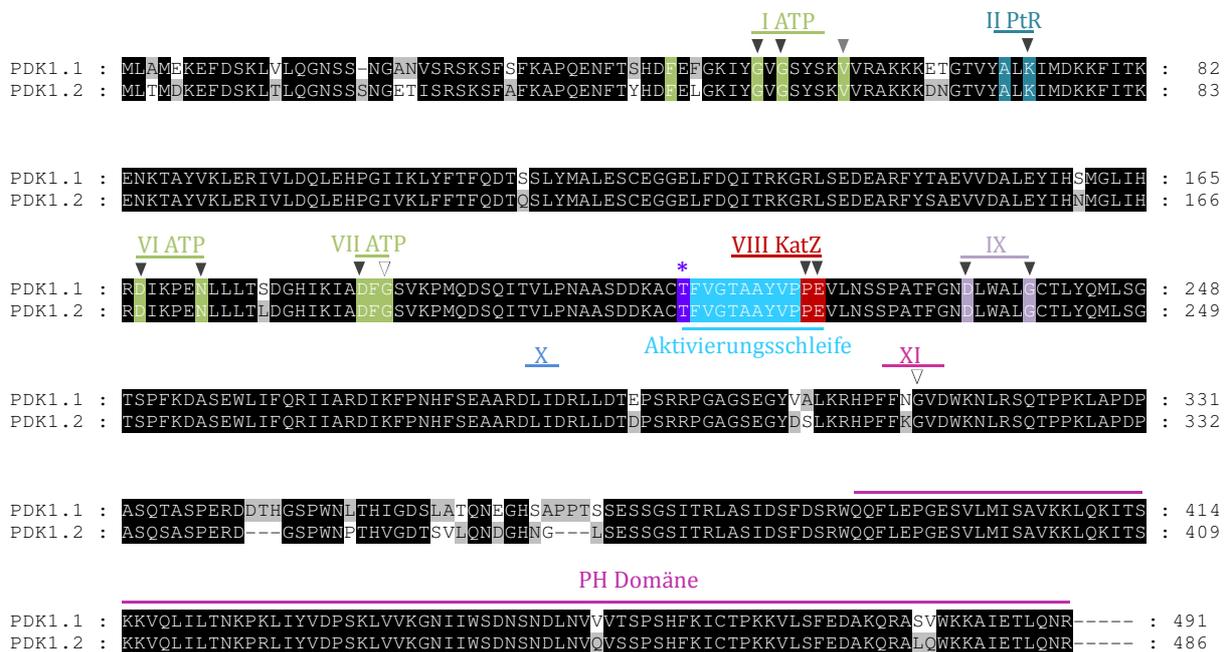


**Abbildung 4-25: *In silico* Auswertung von Microarray-Daten der PDK1-Kinasen PDK1.1 (At5g04510) und PDK1.2 (At3g10540) in verschiedenen Geweben.** Die Transkriptmengen der Gene sind von links nach rechts in den Geweben Wurzeln, Stängelblättern, Rosettenblättern, Knospen, reifen Blüten und reifen Pollen dargestellt. Microarray-Daten stammen von SCHMID *et al.* (2005).

PDK1.1 ist somit zwar als *in vivo* Interaktionspartner für die vornehmlich in Pollen exprimierten Kinasen AGC1-5 und AGC1-7 nicht auszuschließen, ein vermutlich spezifischerer Kandidat ist allerdings, bedingt durch eine präferentielle Expression in

Pollen, die Kinase PDK1.2. Diese zeigt eine 91%ige Sequenzidentität auf Aminosäureebene zu PDK1.1 (Abbildung 4-26) und gruppiert zusammen mit dieser in die PDK1-Unterfamilie der AGC-Kinasen (BÖGRE *et al.* 2003).

Eine mögliche *in vitro* Interaktion zwischen den beiden AGC-Kinasen PDK1.2 und AGC1-5 sollte mittels eines Interaktions-Kinase-Assays (4.2.3.1) und einer GST-Pulldown-Studie (4.2.3.2) nachgewiesen werden. Wie bereits im vorangegangenen Kapitel wurde bei diesen Experimenten aufgrund der deutlich höheren Expression von AGC1-5 in Pollen im Vergleich zu AGC1-7 zunächst die Interaktion zwischen AGC1-5 und PDK1.2 untersucht.



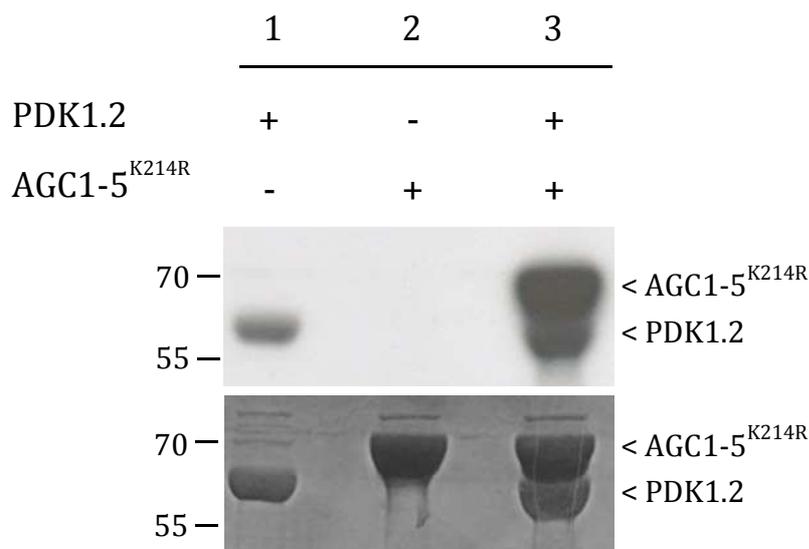
**Abbildung 4-26: Aminosäurealignment der PDK1-Kinasen PDK1.1 und PDK1.2.** Das Alignment wurde mit *ClustalX2* erstellt. Subdomänen der Proteinkinasen nach HANKS *et al.* (1988). Pfeile markieren die Positionen der 14 hochkonservierten Aminosäuren (nach HANKS *et al.* 1988 und HANKS & QUINN 1991). Gefüllte Pfeile kennzeichnen die hochkonservierten Aminosäuren, offene Pfeile die nicht konservierten Aminosäuren. ATP = ATP-Bindung, PtR = Phosphotransfer-Reaktion, KatZ = Katalytisches Zentrum, PH Domäne = Pleckstrin-Homologie Domäne. Mit Stern (\*) markierter Threonin-Rest unterliegt der Autophosphorylierung.

#### 4.2.3.1 Phosphorylierung von AGC1-5<sup>K214R</sup> durch PDK1.2

Die Interaktions-Kinase-Assays wurden nach demselben Prinzip durchgeführt, wie im vorangegangenen Kapitel für AGC1-5 und die PTI1-Kinasen beschrieben (4.2.2.1.). Für die Untersuchung der *in vitro* Phosphorylierung von AGC1-5 durch PDK1.2 wurde als Substrat die Kinase-inaktive Form von AGC1-5 als His-Tag-Fusionsprotein eingesetzt

(AGC1-5<sup>K214R</sup>•HIS), um bei einem Phosphorylierungssignal zwischen Autophosphorylierung und *trans*-Phosphorylierung unterscheiden zu können. Der für diese Klonierung notwendige Austausch des hochkonservierten Lysins in der Kinasesubdomäne II an Position 214 gegen Arginin erfolgte durch punktgerichtete Mutagenese und ist im Abschnitt 3.3.5.1 beschrieben.

Abbildung 4-27 (Spur 1) zeigt, dass die PDK1.2-Kinase, eine funktionelle Kinase mit *in vitro* Autophosphorylierungsaktivität ist. Die modifizierte Kinase AGC1-5<sup>K214R</sup> besitzt wie erwartet keine *in vitro* Autophosphorylierungsaktivität (Spur 2). Die Co-Inkubation der beiden Fusionsproteine AGC1-5<sup>K214R</sup>•HIS und PDK1.2•HIS führte bereits nach einer Expositionszeit von 0,5 h zu einem zusätzlichem Phosphorylierungssignal bei ca. 65 kDa und in etwa der Größe des rekombinanten Fusionsproteins AGC1-5<sup>K214R</sup> entspricht (Spur 3). Demzufolge wird AGC1-5 durch PDK1.2 *in vitro* phosphoryliert und somit ist PDK1.2 ein stromaufwärts gelegener *in vitro* Interaktionspartner der AGC1-5-Kinase.

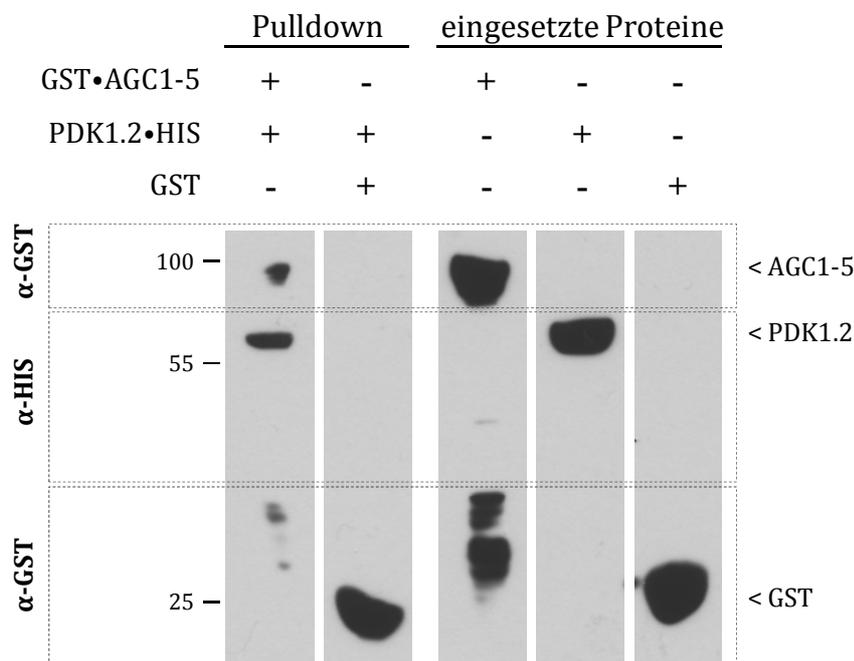


**Abbildung 4-27: *In vitro* Phosphorylierung von AGC1-5<sup>K214R</sup> durch PDK1-2.** Die überexprimierten His-Tag-Fusionsproteine wurden getrennt voneinander (Spur 1 und 2) oder zusammen (Spur 3) nativ aufgereinigt und mit radioaktiv markiertem  $\gamma$ -[<sup>32</sup>P]-ATP und dem Cofaktor MnCl<sub>2</sub> inkubiert. Die Größen der eingesetzten His-Tag-Fusionsproteine: AGC1-5<sup>K214R</sup> = 64,8 kDa und PDK1.2 = 56,2 kDa. Oben: Autoradiogramm nach 0,5 h Expositionszeit. Unten: Coomassie Färbung der im Gel aufgetrennten Proteine.

#### 4.2.3.2 *In vitro* GST-Bindungsstudien mit AGC1-5 und PDK1.2

Um die physikalische Interaktion zwischen den Kinasen PDK1.2 und AGC1-5 zu verifizieren, wurde mit den beiden rekombinanten Kinasen GST•AGC1-5 und PDK1.2•HIS zusätzlich ein *in vitro* GST-Bindungsassay (*GST-Pulldown*) durchgeführt. Der *GST-Pulldown* erfolgte nach demselben Prinzip wie bereits für GST•AGC1-5 und PTI1-1•HIS bzw. PTI1-3•HIS unter 4.2.2.2 beschrieben. Als Köderprotein wurde ebenfalls das rekombinante GST•AGC1-5 verwendet. GST allein diente als Negativkontrolle. Als Beuteprotein wurde PDK1.2•HIS verwendet. Der Gesamtproteinextrakt aus der Überexpression von PDK1.2•HIS und GST•AGC1-5 bzw. GST wurde im Verhältnis 1:4,5 (PDK1.2 : AGC1-5) bzw. 1:1,5 (PDK1.2 : GST) eingesetzt.

Wie dem durchgeführten *GST-Pulldown*-Assay zu entnehmen ist (Abbildung 4-28), wird PDK1.2 nur in Anwesenheit von GST•AGC1-5 über die *GST•Bind™ Resin* aufgereinigt. Durch GST allein erfolgte keine Aufreinigung. Über die *GST•Bind™ Resin*. Demnach konnte mit diesem Versuchsansatz bestätigt werden, dass PDK1.2 ebenfalls ein physikalischer Interaktionspartner von AGC1-5 ist.

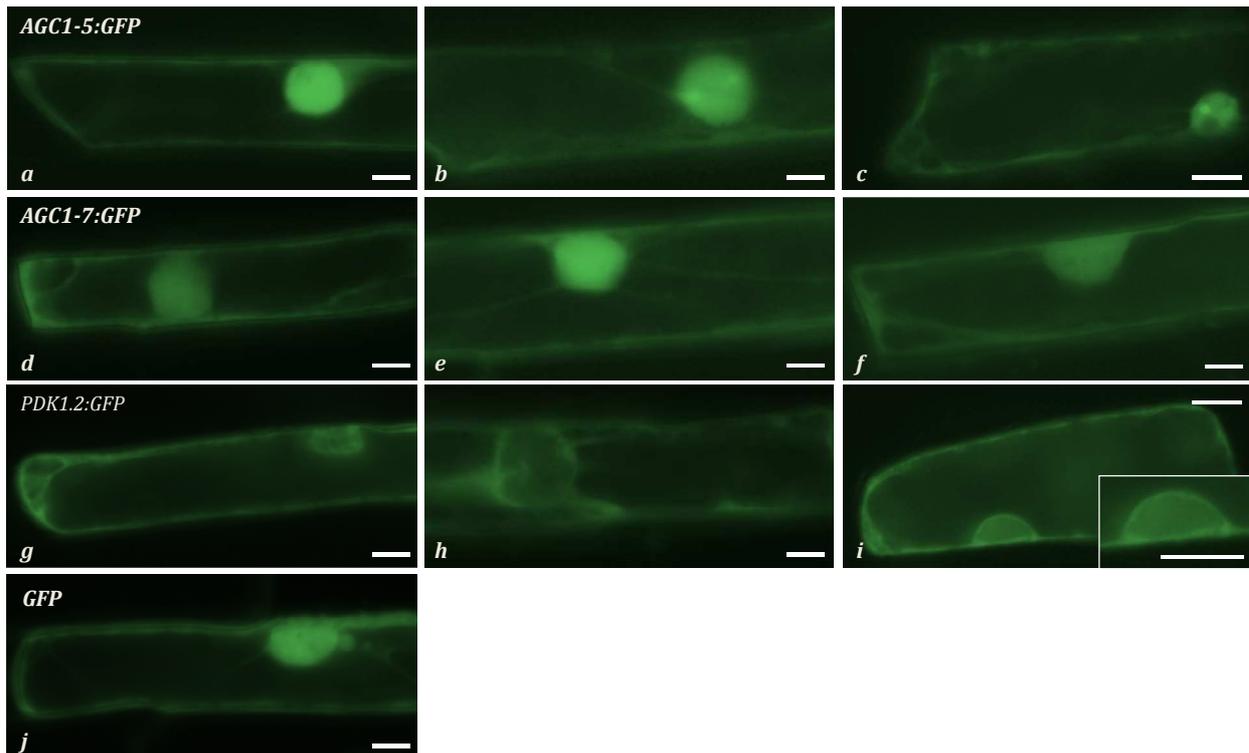


**Abbildung 4-28: *In vitro* GST-Pulldown von PDK1.2•HIS durch GST•AGC1-5.** Die überexprimierten GST-Köderproteine (GST•AGC1-5 bzw. GST) wurden nativ aufgereinigt und nach Entfernen der ungebundenen Proteine mit geklärtem Bakterienlysat, welches die überexprimierte Beuteproteine (PDK1.2•HIS) enthielt, inkubiert. Zur Kontrolle der eingesetzten Proteine wurden die GST-Köderproteine nativ aufgereinigt sowie 1% des eingesetzten Gesamtproteins aus dem geklärten Bakterienlysat mit Beuteprotein (PDK1.2•HIS) entnommen. Der Nachweis der Köder- und Beuteproteine erfolgte durch Western Blot Detektion mit GST- und His-Antikörpern. Größen der eingesetzten Fusionsproteine sind wie folgt: PDK1.2•HIS = 56,2 kDa, GST•AGC1-5 = 89,9 kDa und GST = 26,0 kDa. Artifizelle Abbauprodukte von GST•AGC1-5 finden sich zwischen ca. 25 bis 30 kDa.

### 4.3 Subzelluläre Lokalisation von AGC1-5, AGC1-7 und PDK1.2

ZEGZOUTI *et al.* (2006b) untersuchte die subzelluläre Lokalisation von AGC1-7 und anderen AGCVIII-Kinasen in Hefe und in BY-2-Tabakzellen. Dabei wurde eine cytoplasmatische Lokalisation von AGC1-7 festgestellt. In diesen Experimenten war die Lokalisation von AGC1-7 und GFP allein nicht zu unterscheiden, da letzteres in diesem System keine Lokalisation im Zellkern zeigte. ZHANG *et al.* (2009) hingegen untersuchten die subzelluläre Lokalisation von AGC1-5:YFP und AGC1-7:YFP in Pollenschläuchen stabiler transgener Pflanzen unter Kontrolle des *LAT52*-Promoters. Für beide wurde eine cytoplasmatische Lokalisation unter Vorbehalt berichtet, da gezeigt werden konnte, dass YFP sowohl als Fusions- als auch als Abbauprodukt vorlag. Somit konnte nicht zwischen einem Signal der Fusionskonstrukte AGC1-5:YFP bzw. AGC1-7:YFP und dem YFP alleine unterschieden werden. Um die subzelluläre Lokalisation von AGC1-5 und AGC1-7 in der vorliegenden Arbeit zu überprüfen bzw. für PDK1.2 zu bestimmen, wurden GFP-Fusionskonstrukte unter Kontrolle des *35S*-Promotors kloniert (diese Arbeit und LINNEMANN 2011) und durch biolistische Transformation transient in Zwiebelepidermis exprimiert. Eine Beschreibung der verwendeten Vektoren sowie deren Klonierung ist in Kapitel 3.3.3 zu finden.

Die AGCVIII-Kinasen AGC1-5 und AGC1-7 zeigten, wie in den vorangegangenen Studien, eine cytoplasmatische Lokalisation (Abbildung 4-29 a-c, d-f). Im Unterschied zu den vorangegangenen Untersuchungen zeigten sie jedoch zusätzlich eine Lokalisation im Zellkern. Da dieses Lokalisationsmuster dem von GFP allein entspricht (Abbildung 4-29 j) ist nicht auszuschließen, dass GFP als Abbauprodukt getrennt von den AGC-Kinasen in der Zwiebelzelle vorlag. Eine andersartige Lokalisation konnte jedoch anhand dieser Lokalisationsstudie nicht identifiziert werden. Das Heranziehen von Vorhersage-Programmen für die subzelluläre Lokalisation von Proteinen war nicht von Nutzen, da diese Programme untereinander keinerlei Übereinstimmungen zeigten und folglich keine einheitliche Lokalisation auf diesem Wege bestimmt werden konnte. PDK1.2:GFP war ebenfalls im Cytoplasma lokalisiert (Abbildung 4-29 g-i). Im Gegensatz zu den AGCVIII-Kinasen kam PDK1.2:GFP aber ausschließlich im Cytoplasma und nicht im Zellkern vor. Dies deutet daraufhin, dass PDK1.2:GFP vollständig exprimiert wurde und keine GFP Abbauprodukte die Lokalisation verfälschen. Somit ist von einer cytoplasmatischen Lokalisation von PDK1.2:GFP auszugehen.



**Abbildung 4-29: Subzelluläre Lokalisation der AGC-Kinasen AGC1-5, AGC1-7 und PDK1.2 in Epidermiszellen von *Allium fistulosum*.** Die Plasmide  $35S_{Pro}:AGC1-5:GFP$ ,  $35S_{Pro}:AGC1-7:GFP$  und  $35S_{Pro}:PDK1.2:GFP$  wurden mittels transienter, biolistischer Transformation in die Zwiebelepidermiszellen eingebracht. **a-c)** AGC1-5:GFP, **d-f)** AGC1-7:GFP, **g-i)** PDK1.2:GFP und **j)** GFP. Balken entspricht 10  $\mu$ m.

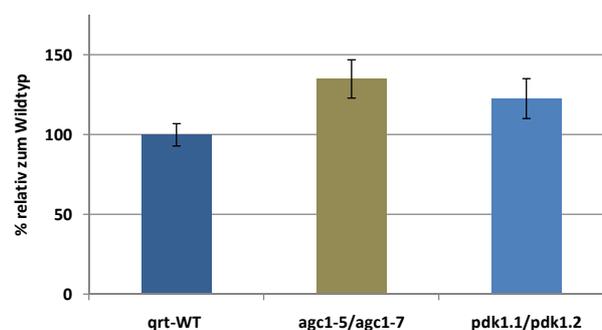
#### 4.4 Phänotyp der T-DNA-Insertionslinien *agc1-5/agc1-7* und *pdk1.1/pdk1.2*

Sollte *in vivo* ebenfalls eine Interaktion zwischen den AGCVIII-Kinasen AGC1-5 bzw. AGC1-7 und PDK1.2 vorliegen, so ist zu erwarten, dass ein Knockout dieser Kinasen in ähnlichen Phänotypen resultiert. Zu diesem Zweck wurden die Einzelknockout-Mutanten *pdk1.1* und *pdk1.2* sowie die bereits beschriebenen Doppelknockout-Mutanten (*d.ko.*) *pdk1.1/pdk1.2* (CAMEHL *et al.* 2011) und *agc1-5/agc1-7* (ZHANG *et al.* 2009) jeweils im *Quartet*-Hintergrund (*qrt*<sup>9</sup>) sowohl mit dem *qrt*- als auch mit dem Col-0-Wildtyp phänotypisch verglichen. Der Fokus lag hierbei auf dem *in vitro* und *in vivo* Pollenschlauchwachstum. ZHANG *et al.* (2009) zeigten, dass die Nullmutation von AGC1-5/AGC1-7 einen Effekt auf das Pollenschlauchwachstum hat. Die von ihnen untersuchten *agc1-5/agc1-7 d.ko.* Pollen zeigte einen deutlichen Mutantenphänotyp. Im Gegensatz dazu zeigten die Einzelknockout-Mutanten *agc1-5* (Salk\_073610 im Col-0-Hintergrund) und *agc1-7* (Sail\_151\_B12 im *qrt*-

<sup>9</sup> Die *Arabidopsis qrt*-Mutation hat ein aneinanderhaften der Pollenkörner nach der Cytokinese zur Folge (Preuss *et al.* 1994).

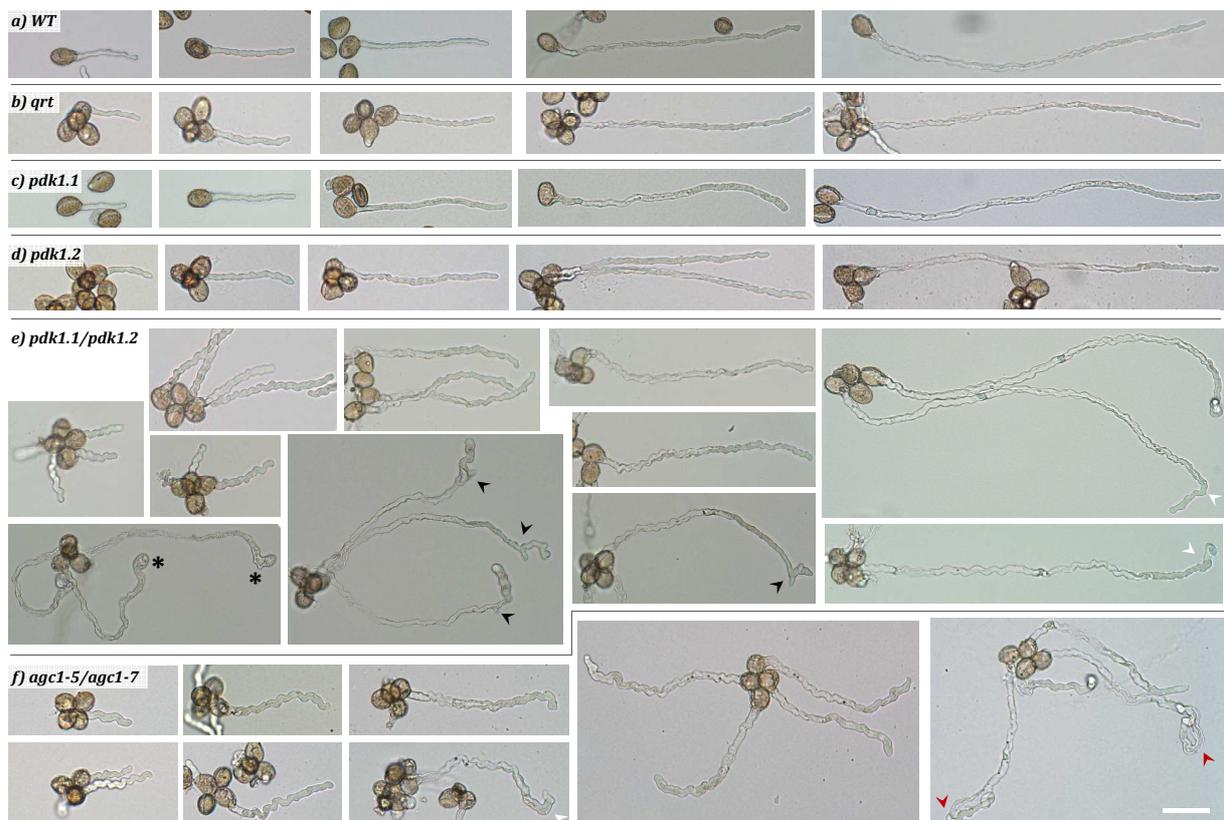
Hintergrund) keinen Phänotyp im Vergleich zum *qrt*-Wildtyp. Die *in vitro* gekeimten Pollenschläuche der *agc1-5/agc1-7 d.ko.* sind aufgrund häufiger Richtungsänderungen breiter und gewundener. Zudem zeigten sie ein reduziertes Wachstum und sind vermutlich in ihrer Zielsteuerung beeinträchtigt. CAMEHL *et al.* (2011) hingegen untersuchten den Effekt der Nullmutation von OXI1 bzw. PDK1.1/PDK1.2 auf die Wachstumsförderung von *Arabidopsis*, hervorgerufen durch die Besiedelung mit dem Wurzelendophyten *Piriformospora indica*. Dabei stellten die Autoren fest, dass die *pdk1.1/pdk1.2 d.ko.* Pflanzen mit *qrt*-Hintergrund kleiner waren als der Col-0 Wildtyp. Zudem waren die Schoten verglichen mit denen des Wildtyps kürzer und es wurden nur 41% Samen verglichen mit dem Wildtyp produziert. Die Einzelknockout-Mutanten *pdk1.1* (Salk\_1113251 im Col-0-Hintergrund) und *pdk1.2* (Sail\_450\_B01 im *qrt*-Hintergrund) wurden in der Studie von CAMEHL *et al.* (2011) nicht weiter untersucht.

Zum Vergleich des *in vitro* Pollenschlauchwachstums wurden in dieser Arbeit Pollenkörner der Linien Col-0, *qrt*, *pdk1.1*, *pdk1.2*, *pdk1.1/pdk1.2* und *agc1-5/agc1-7* auf Pollenkeimungsmedium ausgelegt (3.2.1.1) und bei 20°C in einer feuchten Kammer im Dunkeln inkubiert. Die Pollenschläuche von *pdk1.1* bzw. *pdk1.2* unterschieden sich rein äußerlich nicht von den *qrt* bzw. Wildtyp Pollenschläuchen (Abbildung 4-31 a-d). Sie zeigten ein relativ gerades Wachstum mit definierten Apikal- und Lateral-Regionen. Im Gegensatz dazu ähnelten die Pollenschläuche der *pdk1.1/pdk1.2*-Pflanzen denen der *agc1-5/agc1-7*-Pflanzen (Abbildung 4-31 e bzw. f), sie waren ebenfalls breiter ( $122,7\% \pm 12,5\%$ ,  $n=38$ ) als die Schläuche der *qrt*-Pollen ( $100\% \pm 6,9\%$ ). Jedoch waren sie nicht so breit wie die der *agc1-5/agc1-7*-Pollen ( $134,9\% \pm 12\%$ ,  $n=38$ ) (Abbildung 4-31). Der in dieser Arbeit ermittelte Durchmesser der *agc1-5/agc1-7* Pollenschläuche unterscheidet sich etwas von dem von ZHANG *et al.* (2009) ermittelten Durchmesser, welcher um ca. 61% breiter war als der des *qrt*-Wildtyp. Eine Ursache hierfür könnte die Verwendung unterschiedlicher Pollenkeimungsmedien sein.



**Abbildung 4-30: Durchmesser der *agc1-5/agc1-7*- und *pdk1.1/pdk1.2*- Pollenschläuche relativ zu denen des *qrt*-Wildtyps.** Je Pollenschlauch wurden zwei Messungen mittels *ImageJ* durchgeführt,  $n=38$ .

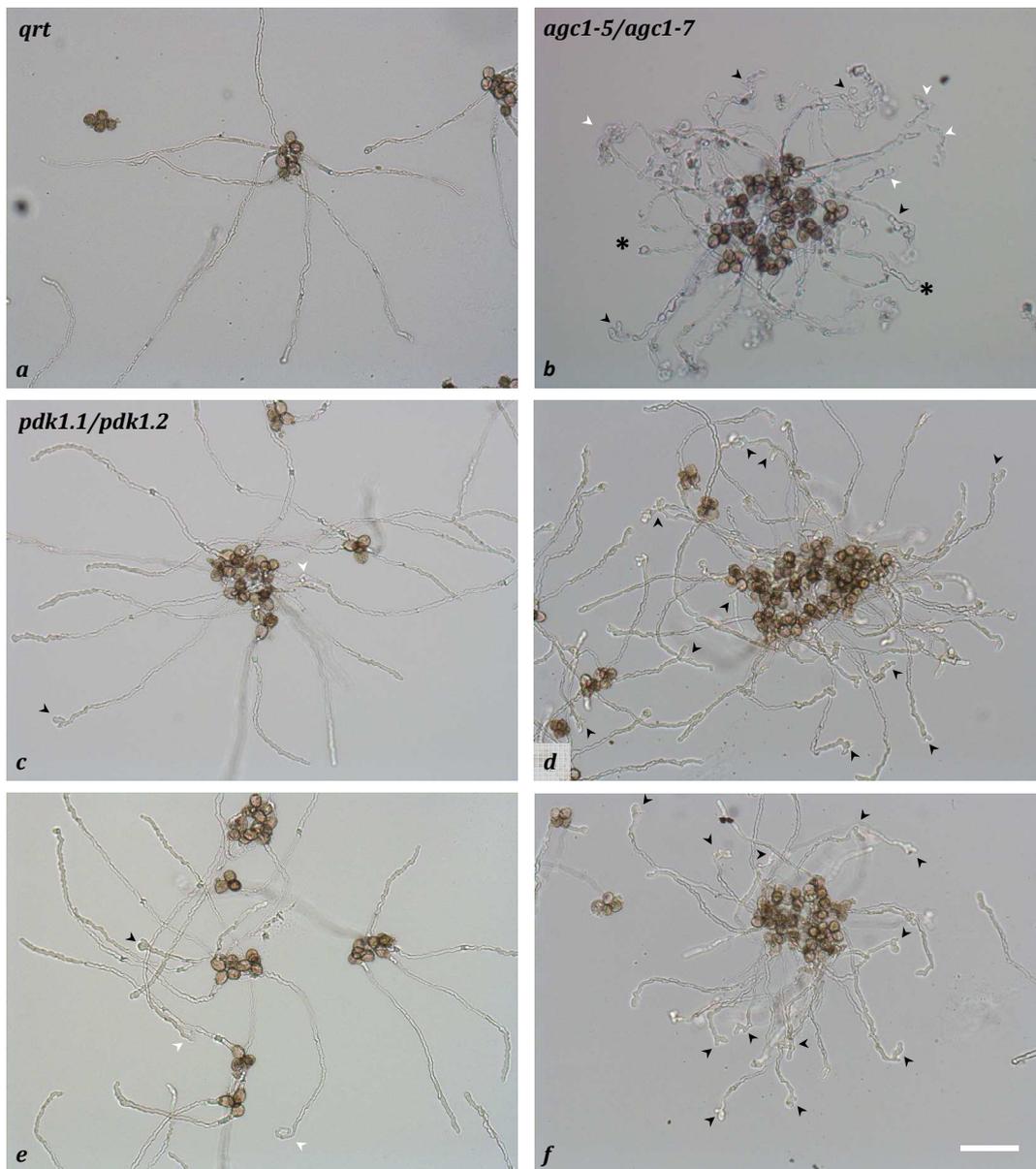
Des Weiteren wiesen die Pollenschläuche der *pdk1.1/pdk1.2*-Pollen Ausbeulungen an den lateralen Regionen auf, die zu einem gewundenen Aussehen des Pollenschlauchs führten. Stärkere dieser Windungen führten zu Richtungsänderungen (Abbildung 4-31 e, Abbildung 4-32 c, e, weiße Pfeilspitzen). Vereinzelt hatten diese Windungen Knäuelbildungen zur Folge. Dies wurde bei den *agc1-5/agc1-7*-Pollenschläuchen häufiger beobachtet (Abbildung 4-31 f, Abbildung 4-32 b, rote Pfeilspitzen). In einigen Fällen waren die Pollenschläuche der *pdk1.1/pdk1.2 d.ko.* in der apikal Region vakuolisiert wie es bereits von ZHANG *et al.* (2009) für die *agc1-5/agc1-7* Pollenschläuche beschrieben wurde (Abbildung 4-31 e, Stern).



**Abbildung 4-31: In vitro Pollenkeimung von (a) Wildtyp-, (b) *qrt*-, (c) *pdk1.1*- (d) *pdk1.2*-, (e) *pdk1.1/pdk1.2*- und (f) *agc1.5/agc1.7*-Pollen.** Pollenkörner der jeweiligen Linien wurden auf Pollenkeimungsmedium ausgestrichen und in einer feuchten Kammer im Dunkeln inkubiert. Vakuolisierte Bereiche an der Pollenschlauchspitze sind mit einem Stern (\*), Abzweigungen der Pollenschläuche sind mit einer schwarzen Pfeilspitze, starke Windungen der Pollenschläuche mit einer weißen Pfeilspitze und Knäuelbildung mit einer roten Pfeilspitze gekennzeichnet. Der Balken entspricht 25 µm und ist für die gesamte Abbildung gültig.

Im Vergleich mit den Pollenschläuchen der *qrt*-Linie stoppte das Wachstum der *agc1-5/agc1-7* Pollenschläuche verfrüht (ZHANG *et al.* 2009). Dies wurde bei *pdk1.1/pdk1.2* Pollen nicht beobachtet (Abbildung 4-32). Ein weiterer Unterschied zwischen den Pollenschläuchen der *pdk1.1/pdk1.2 d.ko.* und der *agc1-5/agc1-7 d.ko.* ist die Häufigkeit mit der sie Verzweigungen ausbilden. Die Pollenschläuche der *pdk1.1/pdk1.2 d.ko.* bildeten diese

verglichen mit denen der *agc1-5/agc1-7 d.ko.* häufiger aus (Abbildung 4-31, Abbildung 4-32, schwarze Pfeilspitzen). Die Pollenschläuche der Wildtyp zeigten hingegen nur sehr selten Verzweigungen. Verschiedene Faktoren scheinen für die Ausbildung der Verzweigungen verantwortlich zu sein, zum Beispiel traten sie mit zunehmender Pollen-Dichte häufiger auf.

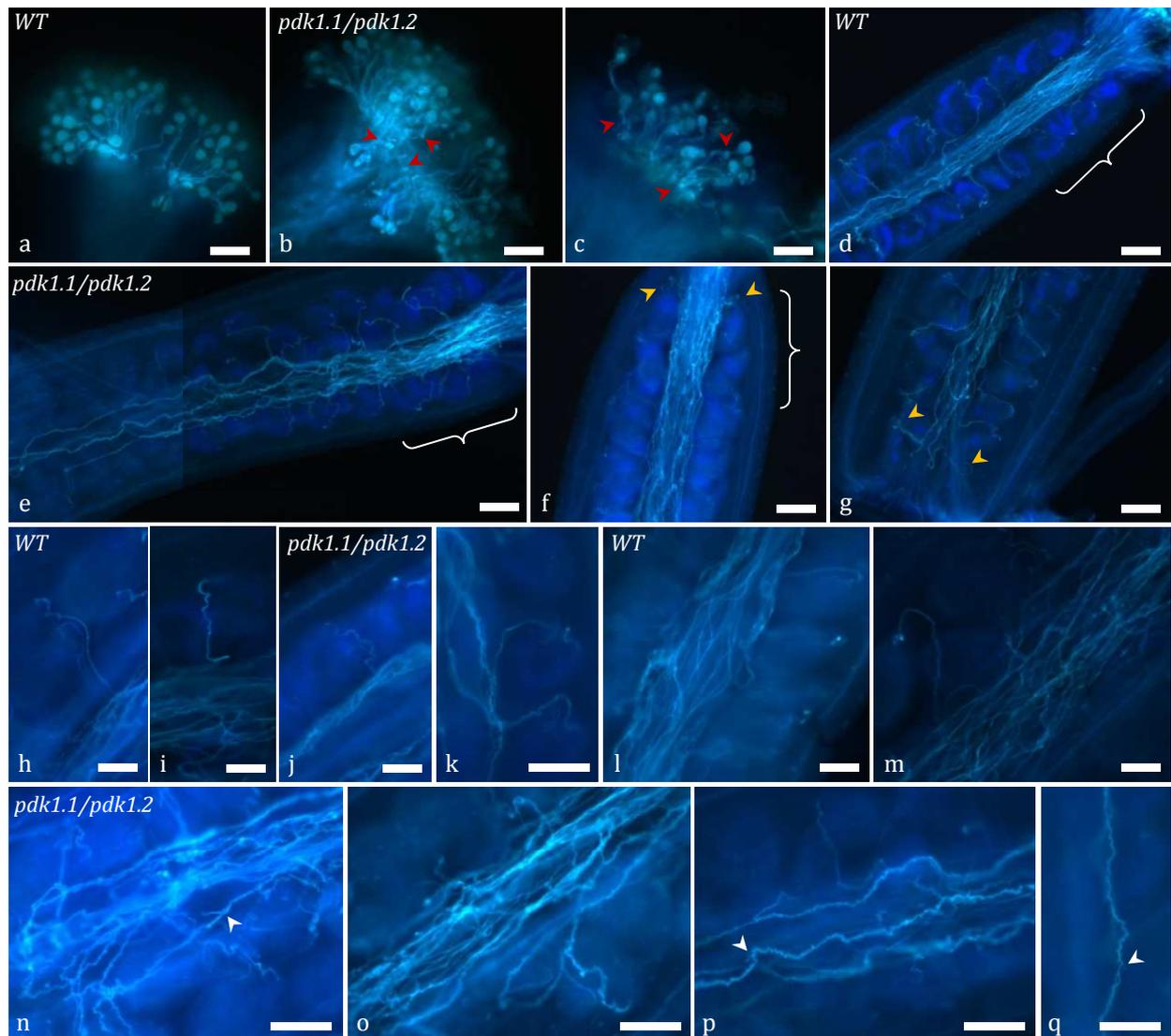


**Abbildung 4-32: In vitro Pollenkeimung von (a) *qrt* -, (b) *agc1.5/agc1.7*- und (c-f) *pdk1.1/pdk1.2*-Pollen.** Pollenkörner der jeweiligen Linien wurden auf Pollenkeimungsmedium ausgestrichen und in einer feuchten Kammer im Dunkeln inkubiert. Vakuolisierte Bereiche an der Pollenschlauchspitze sind mit einem Stern (\*), Abzweigungen der Pollenschläuche mit einer schwarzen Pfeilspitze, starke Windungen der Pollenschläuche mit einer weißen Pfeilspitze und Knäuelbildung mit einer roten Pfeilspitze gekennzeichnet. Der Balken entspricht 50 µm und ist für die gesamte Abbildung gültig.

Zur Untersuchung des *in vivo* Pollenschlauchwachstums wurden die Pollenschläuche der *pdk1.1/pdk1.2 d.ko.* Mutantenlinie und der Col-0 Linie in den Pistillen mit Anilinblau (*decolorized aniline blue* = DAB) gefärbt (3.2.9). Die Resultate wurden mit denen für die *agc1-5/agc1-7 d.ko.* Linie publizierten Daten verglichen (ZHANG *et al.* 2009). Diese zeigten, dass die Pollen der *agc1-5/agc1-7 d.ko.* auf dem Stigma wie die des Wildtyps keimten. Jedoch waren die Pollenschläuche der *agc1-5/agc1-7 d.ko.* dicker und stärker gewunden sowie im Bereich des Stigmas und des Transmissionstrakts manchmal sogar geknäuel. Zudem zeigten sie *in vivo*, wie schon bei der *in vitro* Keimung, ein schlechteres Wachstum als die des Wildtyps, denn nur einige wenige Pollenschläuche erreichten den unteren Teil der Pistille. Dieser Effekt führte zu unbefruchteten Samenanlagen vor allem im unteren Bereich der Pistille. Sogar im oberen Teil der Pistille lagen unbefruchtete Samenanlagen vor, obwohl Pollenschläuche in diesem Bereich vorkamen. ZHANG *et al.* (2009) postulierte daraufhin, dass die Doppelknockout-Mutation zu einer verschlechterten Reaktion der Pollenschläuche gegenüber weiblicher Richtungshinweise führt.

Wie die Pollen der *agc1-5/agc1-7 d.ko.* keimten auch die Pollen der *pdk1.1/pdk1.2 d.ko.* unverändert zum Wildtyp auf den Stigmata (Abbildung 4-33 a-c). Die Breite der Pollenschläuche konnte bei der verwendeten Methode nicht exakt bestimmt werden. Es hatte jedoch den Anschein, dass die Pollenschläuche der *pdk1.1/pdk1.2 d.ko.* im Bereich der Stigmata etwas gewundener bzw. ungerichteter wuchsen als die des Wildtyps (rote Pfeile). Im Bereich der Pistille der *pdk1.1/pdk1.2 d.ko.* kamen stark gewundene bzw. gezackte Pollenschläuche indes sehr häufig vor. Diese waren auch in den Pistillen des Wildtyps zu identifizieren, allerdings wesentlich seltener (Abbildung 4-33 d-g sowie in den Detailaufnahmen h-q). Ein Unterschied im Windungsverhalten der Pollenschläuche war vor allem unterhalb des Stylus im Transmissionstrakt zu finden. Die Pollenschläuche des Wildtyp zeigten in diesem Bereich eine strukturierte, geradlinige Form (Abbildung 4-33 d, Bereich durch Klammer hervorgehoben), während die Pollenschläuche von *pdk1.1/pdk1.2* in dieser Region wirr verliefen (Abbildung 4-33 e, f, Bereiche durch Klammern hervorgehoben). Des Weiteren konnten mehrfach Abzweigungen an den Pollenschläuchen der *pdk1.1/pdk1.2* Mutante gefunden werden (Abbildung 4-33 n, p und q, weiße Pfeile). Dieser Phänotyp steht im Einklang mit dem der *in vitro* gekeimten *pdk1.1/pdk1.2 d.ko.* Pollen, die vor allem zu späteren Zeitpunkten Verzweigungen ausbildeten (Abbildung 4-31 e, Abbildung 4-32 c-f, schwarze Pfeilspitzen). Die Pollenschläuche der *pdk1.1/pdk1.2* Mutante schienen in der Lage zu sein alle Samenanlagen eines Ovars zu erreichen (Abbildung 4-33 f, g). Jedoch setzten sie weniger Samen an als der Wildtyp was im Einklang

steht mit den Daten von CAMEHL *et al.* (2011), die zeigten, dass nur 41% der Samen im Vergleich zum Wildtypen produziert wurden.



**Abbildung 4-33: : Pollenschläuche in den Pistillen der *pdk1.1/pdk1.2* Doppelknockout-Mutante und des Wildtyps.** Färbung der Callose der Pollenschläuche erfolgte mittels Anilinblau (DAB). **a-c)** Detailaufnahme der Pollenschläuche am Stigma. **a)** Wildtyp, **b-c)** *pdk1.1/pdk1.2*. Rote Pfeile deuten auf gewundene Pollenschläuche auf Stigma hin. **d-g)** Pistille. **d)** Wildtyp, **e-g)** *pdk1.1/pdk1.2*. Gelbe Pfeile verweisen auf Pollenschläuche, die zu den oberen und unteren Samenanlagen wachsen. Weiße Klammern markieren Region unterhalb des Stylus im Transmissionstrakt in dem die *pdk1.1/pdk1.2*-Pollenschläuche ungeordneter wachsen als die des Wildtyps. **h-q)** Detailaufnahmen der Pollenschläuche innerhalb der Pistille, **h, i, l, m)** Wildtyp. **j, k, n - q)** *pdk1.1/pdk1.2*. Weiße Pfeile markieren Verzweigungen in *pdk1.1/pdk1.2*-Pollenschläuchen. Balken entsprechen bei a-c, h-q = 25  $\mu$ m und bei d-g = 50  $\mu$ m.

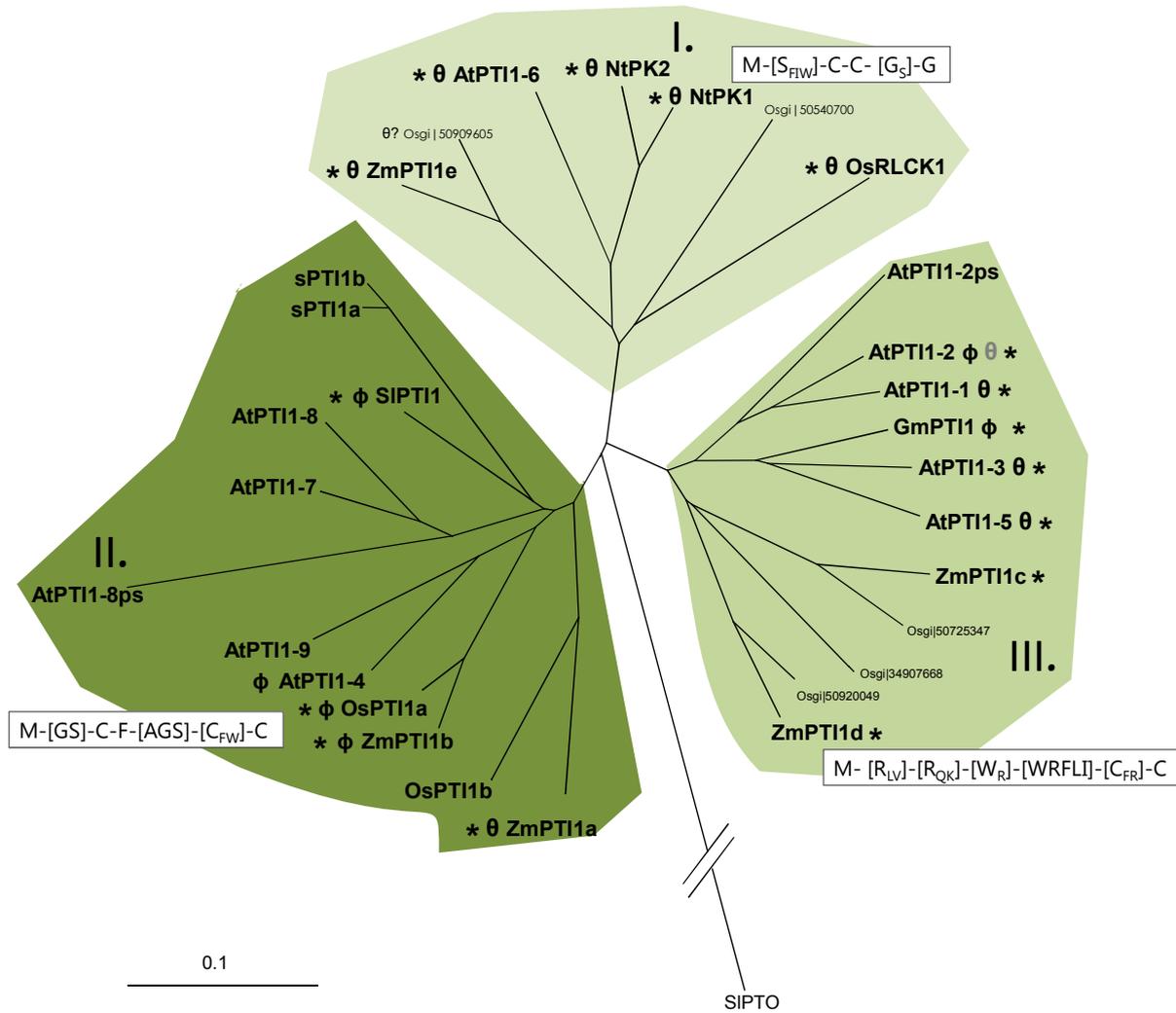
Zusammenfassend ist zur Untersuchung des *in vivo* Pollenschlauchwachstums festzuhalten, dass sowohl beim Wildtyp als auch bei der *pdk1.1/pdk1.2* Mutante gewundene und gerade Pollenschläuche vorkommen. Jedoch unterscheiden sich diese in der Häufigkeit der jeweiligen Erscheinungsform deutlich in beiden Linien. Die *pdk1.1/pdk1.2 d.ko.*

Pollenschläuche scheinen weitaus häufiger einen gewundenen bzw. gezackten Verlauf zu nehmen als die Pollenschläuche des Wildtyps, dessen Pollenschläuche vor allem im oberen Bereich des Pistills wesentlich gerader wachsen. Diese Untersuchungen zeigen, dass ein Verlust beider PDK1-Gene zu einem veränderten Wachstum der Pollenschläuche sowohl *in vitro*, als auch *in vivo* führt.

## 5. Diskussion

Der erste Vertreter der PTI1-Kinasen, SIPTI1 aus Tomate, wurde im Zusammenhang mit der SIPTO-vermittelten Resistenz gegen *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* entdeckt (ZHOU *et al.* 1995). Es folgte die Identifizierung weiterer PTI1-homologer Serin/Threonin-Kinasen aus *Arabidopsis*, Mais, Reis, Soja und Tabak (ANTHONY *et al.* 2006; FORZANI *et al.* 2011; HERRMANN *et al.* 2006; ZOU *et al.* 2006; REHDERS 2010; TAKAHASHI *et al.* 2007; KONG *et al.* 2007; TIAN *et al.* 2004; STASWICK 2000; DISSANAYAKE *et al.* 2004). Diese PTI1-Kinasen sowie weitere bislang unbekannte PTI1-Kinasen wurden anhand ihrer Aminosäuresequenzen in drei Subfamilien gegliedert. Jede dieser Subfamilien setzt sich aus PTI1-Vertretern mono- und dikotyledoner Pflanzen zusammen und zeichnet sich durch einen konservierten N-Terminus mit spezifischer Konsensussequenz aus (Abbildung 5-1, HERRMANN *et al.* 2006). Vermutlich wurden die konservierten N-Termini der verschiedenen Subfamilien während der Evolution aufgrund ihrer spezifischen biologischen Funktion beibehalten (HERRMANN *et al.* 2006). Eine Beteiligung an Signalkaskaden der Pathogenabwehr bzw. von abiotischen Stressreaktionen wird für SIPTI1, AtPTI1-2, AtPTI1-4, ZmPTI1b, ZmPTI1c, OsPTI1a und GmPTI1 angenommen. Einige andere Vertreter der PTI1-Kinasen konnten hingegen mit Prozessen der Pollinierung in Zusammenhang gebracht werden, zu diesen zählen ZmPTI1a, ZmPTI1e, OsRLCK1, NtPK1 und NtPK2. Die postulierten Funktionen der PTI1-Kinasen unterstützen demnach die Vermutung von HERRMANN *et al.* (2006), dass PTI1-Kinasen an Signalkaskaden mindestens zwei verschiedener Prozesse beteiligt sind, u.zw. der Reaktion auf biotische/abiotische Stressoren und der Pollinierung. Die genaue Bedeutung der PTI1-Kinasen für diese Prozesse ist bislang jedoch ungeklärt.

Um weitere Einblicke in die Familie der PTI1-Kinasen zu erhalten, wurde in der vorliegenden Arbeit die PTI1-Kinasefamilie der dikotyledonen Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* untersucht, um die Vorzüge dieser Pflanze für die weitere funktionelle und molekulare Charakterisierung der PTI1-Kinasen zu nutzen. Zu diesen Vorzügen gehören u. a. ein vollständig sequenziertes Genom, ein kurzer Generationszyklus, die Verfügbarkeit von T-DNA-Insertionsmutanten, ein umfangreiches Netzwerk an Genom- und Expressionsdatenbanken sowie die einfache Durchführbarkeit von genetischen Manipulationen z.B. durch Agrobakterien vermittelte Transformation. Im Fokus der Arbeit stand dabei die biochemische und funktionelle Charakterisierung solcher PTI1-Kinasen, denen möglicherweise eine Bedeutung bei der Pollinierung zukommt sowie die Identifizierung potentieller stromaufwärts und/oder stromabwärts gelegener Interaktionspartner.



**Abbildung 5-1: Phylogenie PTI1-homologer Proteine aus mono- und dikotyledonen Pflanzen.** Phylogenetische Beziehung von PTI1-Kinasen aus *Arabidopsis*, Mais, Reis, Soja, Tabak und Tomate, als *outgroup* diente SIPTO. Die Konsensussequenz der N-Termini ist für die Subfamilien angezeigt: hochkonservierte Aminosäurereste sind fett gedruckt, während in Klammern angegebene Aminosäuren weniger konserviert sind; Aminosäurereste mit seltenem Auftreten sind mit tiefgestellten Buchstaben gekennzeichnet. Die präferentielle Expression in Pollen ist durch den griechischen Buchstaben Theta ( $\theta$ ), eine postulierte Funktion bei biotischem bzw. abiotischem Stress ist durch den griechischen Buchstaben Phi ( $\phi$ ) und die Fähigkeit zur *in vitro* Autophosphorylierung durch einen Stern (\*) gekennzeichnet. AtPTI1-2 ist mit einem grauen Theta markiert, da die Expression in Pollen allein durch Promotor-GUS-Studien belegt ist. Für Osgj|50909605 wurde mittels *EST Profile* eine Expression ausschließlich in Blüten vorhergesagt, weshalb eine spezifische Expression in Pollen denkbar ist. Der phylogenetische Baum wurde durch Berechnungen mit *ClustalX2* und Visualisierung mit *Treeview* erstellt.

## 5.1 Die PTI1-Kinasefamilie aus *Arabidopsis*

Das *Arabidopsis* Genom kodiert für elf *SIPTI1*-homologe Gene, *PTI1-1* bis *PTI1-9* sowie *PTI1-2ps* und *PTI1-8ps*. Die abgeleiteten Proteine verteilen sich aufgrund ihrer Aminosäuresequenzen auf alle drei bekannten Subfamilien der PTI1-Kinasefamilie (Abbildung 5-1). Zwei *PTI1*-Gene, *PTI1-2ps* und *PTI1-8ps*, sind aufgrund von Mutationen in

hochkonservierten Bereichen und kaum detektierbarer Expression höchstwahrscheinlich funktionslose Pseudogene (vgl. 4.1.1). Die konservierte Exon-Intron-Struktur der funktionellen *Arabidopsis PTI1*-Gene zueinander sowie zu den *PTI1*-Genen aus Mais untermauert die Annahme, dass es sich bei *PTI1*-Genen um Mitglieder einer monophyletisch entstandenen Genfamilie handelt (vgl. 4.1.2). Vor allem die Exons III bis VII sind in ihren Längen und Grenzen nahezu konstant konserviert (Anhang A3, Tabelle A 3-1).

### 5.1.1 Expression und Evolution der *PTI1*-Kinasen aus *Arabidopsis*

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte mittels Promotor-*GUS*-Studien und *in silico* Auswertung von Microarray-Daten für vier der neun *PTI1*-Kinasen aus *Arabidopsis* eine präferentielle Expression in Pollen nachgewiesen werden (vgl. 4.1.3). Zu ihnen gehören *PTI1-1*, *PTI1-3*, *PTI1-4* und *PTI1-6*, welche entsprechend ihrer Expression als  $_{pol}PTI1$ -Kinasen bezeichnet wurden. Eine Aktivität der  $_{pol}PTI1$ -Promotoren wurde erst in reifen Pollen der stabilen Promotor-*GUS*-Pflanzen detektiert (Abbildung 4-7). Dies steht im Einklang mit den Microarray-Daten von HONYS UND TWELL (2004), deren Auswertung zeigt, dass die Transkriptmenge der  $_{pol}PTI1$ -Gene erst mit dem trizellulären Pollenstadium signifikant ansteigt (Abbildung 4-6 a). Die Gene der  $_{pol}PTI1$ -Kinasen können demnach zu den „späten“ Genen der Pollenentwicklung gezählt werden, von denen angenommen wird, dass ihre Genprodukte in den Prozessen der Pollenkeimung und dem Pollenschlauchwachstum involviert sind (MASCARENHAS 1990). Die  $_{pol}PTI1$ -Gene reihen sich somit in die Gruppe der  $_{pol}PTI1$ -Gene anderer Pflanzen ein, beispielsweise *NtPK1*, *NtPK2*, *OsRLCK1*, *ZmPTI1a* und *-e*, die ebenfalls zu den „späten“ Genen der Pollenentwicklung gehören (DISSANAYAKE *et al.* 2004; KONG *et al.* 2007; HERRMANN *et al.* 2006; REHDERS 2010).

Die durch Promotor-*GUS*-Studien ermittelte gewebespezifische Expression der  $_{pol}PTI1$ -Kinasen aus *Arabidopsis* zeigt bereits in den Blüten ein individuelles und spezifisches Expressionsmuster für die einzelnen *PTI1*-Kinasen. Im Gegensatz zu *PTI1-5* und *PTI1-6*, werden *PTI1-1* und *PTI1-3* neben der Expression in Pollen auch schwach in den übrigen Pflanzenteilen exprimiert. Die weiteren *PTI1*-Kinasen, *PTI1-2*, *PTI1-4*, *PTI1-7*, *PTI1-8* und *PTI1-9*, zeigten generell nur eine schwache ubiquitäre Expression in den analysierten Geweben und wurden daher als  $_{ubi}PTI1$ -Kinasen bezeichnet (vgl. 4.1.3, Abbildung 4-5 b). Für *PTI1-2* konnte durch Promotor-*GUS*-Studien mit mehreren unabhängigen Linien auch eine Promotoraktivität in Pollen bestimmt werden. Diese Daten werden jedoch nicht durch verfügbare Microarray-Studien gestützt (SCHMID *et al.* 2005; HONYS & TWELL 2004; QIN *et al.*

2009). Wie die Expression der *pol*PTI1-Kinasen, ist das Expressionsmuster jeder *ubi*PTI1-Kinase spezifisch und unterscheidet sich von dem der anderen Familienmitglieder. Allerdings konnte für nahezu alle Gewebe eine Überlappung der verschiedenen Genexpressionen festgestellt werden. In Ergänzung zu den vorliegenden Ergebnissen konnte von ANTHONY *et al.* (2006) gezeigt werden, dass die Expression des *PTI1-2* Gens als Reaktion auf biotischen Stress bzw. Entwicklungssignale wie Elicitoren, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und Phosphatidsäure (PA) induziert wird. Des Weiteren zeigten FORZANI *et al.* (2011) für *PTI1-4* eine Expression in Wurzeln und Wurzelhaaren sowie einen Anstieg der *PTI1-4*-Transkripte in Reaktion auf H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und Elicitoren.

Anhand des vielfältigen Expressionsmuster der *Arabidopsis* PTI1-Kinasen wird deutlich, dass die anfängliche Einteilung in *pol*PTI1- und *ubi*PTI1-Kinasen diesem nicht gerecht wird. Aus Gründen der Übersicht wurde diese grobe Einteilung allerdings beibehalten.

Die PTI1-Kinasen aus *Arabidopsis* sind somit wahrscheinlich ebenfalls, wie bereits für die PTI1-Kinasen aus Mais und Reis vermutet, an sehr vielschichtigen Prozessen während der Pollinierung, Pathogenabwehr und/oder der Entwicklung beteiligt. Hierbei scheint die Induktion der Promotoren durch einen biotischen, abiotischen und/oder entwicklungspezifischen Reiz bei vielen Familienmitgliedern eine übergeordnete Rolle zu spielen.

Die für die *Arabidopsis* PTI1-Kinasen gewonnenen Erkenntnisse untermauern die These, dass die Mechanismen, die an den Prozessen der Pollinierung und Pathogenabwehr beteiligt sind (vgl. 2.4), einen gemeinsamen Ursprung besitzen und es sich dabei um verwandte molekulare Prozesse handelt (HERRMANN *et al.* 2006; KONG *et al.* 2007; DRESSELHAUS & MÁRTON 2009). KONG *et al.* (2007) postulieren, dass sich diese Prozesse evolutionär konservierte Signalwege teilen und belegen dies mit der Überschneidung differentiell exprimierter Gene während der Pollinierung/Befruchtung und Abwehr-/Stressreaktionen. DRESSELHAUS UND MÁRTON (2009) postulieren, dass zur Etablierung neuer Spezies-spezifischer Mechanismen der gametophytischen Kommunikation in Landpflanzen bereits vorhandene Gene als molekulare Ausgangsmodule verwendet wurden. Diese molekulare Basis könnte in den Ur-Wasserpflanzen aufgrund eines evolutionären Wettrüstens mit Angreifern bereits in Form von hochentwickelten, polymorphen Liganden und Rezeptorproteinen in großer Vielfalt verfügbar gewesen sein (DOLAN 2009). Vor dem Hintergrund dieser Thesen scheint es plausibel, dass eine Entwicklung der Signalkaskaden während der Pollinierung durch eine Rekrutierung von Genen erfolgte, deren Genprodukte zuvor in Signalkaskaden der

Pathogenabwehr involviert waren. Diese Subspezialisierung könnte durch die genomische Expansion von Genfamilien begünstigt worden sein. Im *Arabidopsis* Genom können Hinweise auf eine solche Expansion der PTI1-Genfamilie gefunden werden:

Große Bereiche des *Arabidopsis* Genoms (60%) sind aus Duplikationen des Genoms hervorgegangen. Durch die Auswertung der Synteniekarten (BLANC *et al.* 2000) ist zu vermuten, dass die elf *PTI1*-Gene von *Arabidopsis* aus fünf Vorläufergenen entstanden sind (vgl. 4.1, Abbildung 4-1 c). Jede der aus den Genduplikationen hervorgegangenen syntenischen Gruppen, *PTI1-1/PTI1-2/PTI1-2ps*, *PTI1-3/PTI1-5*, *PTI1-4/PTI1-9* und *PTI1-7/PTI1-8*, zeichnet sich durch eine hohe Sequenzähnlichkeit zwischen ihren Mitgliedern aus. Alle Mitglieder einer Gruppe befinden sich deshalb in der gleichen Subfamilie. Die vermutlich artspezifische Expansion der *Arabidopsis PTI1*-Genfamilie könnte erklären, warum bislang die Anzahl der *Arabidopsis PTI1*-Kinasen größer ist, als z.B. in Mais. Dort sind bislang nur fünf *PTI1*-Kinasen bekannt, obwohl der größte Teil des Maisgenoms bereits sequenziert ist und das allopolyploide Maisgenom ebenfalls zahlreiche Genduplikationen aufweist. Aufgrund seiner genomischen Struktur besitzt Mais sogar ca. 5000 Gene mehr als *Arabidopsis* (TANG *et al.* 2008). Da der Prozess der Genomsequenzierung bei Mais noch nicht abgeschlossen ist, kann jedoch die endgültige Anzahl *PTI1*-ähnlicher Sequenz in dieser Pflanze noch weiter ansteigen. Zum jetzigen Zeitpunkt kann spekuliert werden, ob *Arabidopsis*, bzw. nahe mit *Arabidopsis* verwandte Arten, vielleicht eine größere *PTI1*-Kinasefamilie besitzen, als z.B. Gräser. Möglicherweise ist dies ein Resultat unterschiedlich starken biotischen bzw. abiotischen Selektionsdrucks und damit verbunden einer Spezies-spezifischen Subspezialisierung der *PTI1*-Genfamilie. Dies könnte auch für die Gene der PTO-Kinasen zutreffen, da es deutliche Hinweise gibt, dass diese Genfamilie z.B. in den *Solanaceae* eine von anderen Pflanzen abweichende Evolution durchlaufen sein könnte (vgl. 2.5.1).

Die Vermutung eines gemeinsamen molekularen Ursprungs von Signalkaskaden der Pollinierung und Pathogen-/Stressantwort wird außerdem durch die signifikante Ähnlichkeit der *PTI1*-Kinasen und der SIPTO-Kinase zu der humanen IRAK-Kinase sowie dem Pelle-Protein aus *Drosophila* gestützt. Letztere Kinasen besitzen eine zentrale Rolle bei Signaltransduktionsmechanismen der angeborenen Immunabwehr (TROFIMOVA *et al.* 1996; SESSA & MARTIN 2000). Der phylogenetische Ursprung solcher Serin/Threonin-Proteinkinasen, zu denen auch *PTI1* und PTO zu zählen sind, ist daher weit vor der evolutiven Trennung von Pflanzen und Tieren anzunehmen.

### 5.1.2 Funktionalität der *Arabidopsis* PTI1-Kinasen

Die Funktionalität von fünf der neun PTI1-Kinasen aus *Arabidopsis*, PTI1-1, PTI1-2, PTI1-3, PTI1-5 und PTI1-6, konnte im Rahmen dieser Arbeit anhand ihrer *in vitro* Autophosphorylierungsaktivität bewiesen werden (vgl. 4.1.5, Abbildung 4-14). Dabei wurden auch die Ergebnisse von ANTHONY *et al.* (2006) für die Kinasen PTI1-1 und PTI1-2 bestätigt. Zudem konnte hier erstmals eine *in vitro* Autophosphorylierung für PTI1-3 nachgewiesen werden, welche in den Experimenten von ANTHONY *et al.* (2006) nicht gefunden wurde. Ursache für die von ANTHONY *et al.* (2006) abweichenden Resultate könnte die Verwendung einer um 42 Aminosäurereste längeren Spleißvariante des PTI1-3 in der vorliegenden Arbeit sein. Eine Mutation des hochkonservierten Lysins in Kinasesubdomäne II zu Asparagin führte für die Kinasen PTI1-1<sup>K96N</sup>, PTI1-2<sup>K99N</sup> und PTI1-3<sup>K141N</sup> erwartungsgemäß zum Verlust der *in vitro* Autophosphorylierungsaktivitäten (Abbildung 4-19).

FORZANI *et al.* (2011) berichteten, dass unter den von ihnen verwendeten Bedingungen PTI1-4 keine *in vitro* Autophosphorylierungsaktivität besaß, PTI1-4 jedoch trotzdem die Kinaseaktivität von OXI1 stimulieren kann. Eine vergleichbare Aktivierung der Kinaseaktivität von OXI1 konnte im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls durch die Kinase-inaktive Form von PTI1-2, PTI1-2<sup>K99N</sup>, beobachtet werden (Abbildung 4-21). Möglicherweise handelt es sich hierbei um ein grundlegendes Prinzip der *upstream*-Regulation, dass auch *in vivo* eine Relevanz besitzen könnte.

### 5.1.3 Subzelluläre Lokalisation der *Arabidopsis* PTI1-Kinasen

Die aufgrund der postulierten Funktionen, Expressionsprofile und variablen N-Termini vielschichtige Familie der PTI1-Kinasen offenbart diese Vielfalt auch in der subzellulären Lokalisation ihrer Mitglieder. Die bislang mit Hilfe von GFP-Reporterkonstrukten und Immunodetektion untersuchten PTI1-Kinasen weisen eine cytoplasmatische Lokalisation (NtPK1, NtPK2, ZmPTI1c und ZmPTI1d) bzw. zusätzlich eine Lokalisation im Zellkern auf (SIPTI1, OsRLCK1, ZmPTI1b). ZmPTI1a ist mit der Plasmamembran assoziiert und ZmPTI1e wurde in Form kleiner cytoplasmatischer Vesikel gefunden (DISSANAYAKE *et al.* 2004; HERRMANN *et al.* 2006; KONG *et al.* 2007; REHDESS 2010). Die PTI1-Kinasen aus *Arabidopsis* schließen sich in ihren subzellulären Lokalisationen dieser Vielfalt an (vgl. 4.1.4). In der vorliegenden Arbeit sowie im Rahmen der an diese Arbeit assoziierten Bachelorarbeiten konnte die subzelluläre Lokalisation von acht der neun PTI1-Kinasen aus *Arabidopsis*

bestimmt werden (BAGHERZADEGAN-SARAVI 2008; SCHMIDT 2009; WITTFOTH 2009). PTI1-3:GFP zeigte in transient transformierten Zwiebelzellen sowie in Pollen stabil transformierter Pflanzen eine cytoplasmatische Lokalisation (Abbildung 4-10 d, Abbildung 4-11 d). PTI1-6:GFP war in transgenen Pollen ebenfalls cytoplasmatisch lokalisiert, zeigte aber nach transienter Transformation in Zwiebelepidermis eine Assoziation mit Vesikeln, die in PTI1-6:GFP-Pollen nicht beobachtet wurde (Abbildung 4-10 h, Abbildung 4-11 i, j). Es ist daher davon auszugehen, dass PTI1-3 und PTI1-6 im Cytoplasma der *Arabidopsis* Pollen lokalisiert sind, wie es z.B. auch für die  $P_{ol}$ PTI1-Kinasen aus Tabak NtPK1 und NtPK2 gezeigt werden konnte. Eine z.B. nur zeitweilige Lokalisation an Vesikeln ist jedoch nicht auszuschließen, da beispielsweise die  $P_{ol}$ PTI1-Kinase ZmPTI1e, welche eine hohe Sequenzähnlichkeit zu PTI1-6 besitzt, ebenfalls in transienten Assays assoziiert an cytoplasmatischen Vesikeln gefunden wurde (REHDESS 2010).

In transient transformierten Zwiebelzellen wurde eine Co-Lokalisation von PTI1-5:GFP mit den kortikalen Mikrotubuli gefunden (Abbildung 4-10 e-f). Diese Lokalisation wurde durch Depolymerisierung der Mikrotubuli nach Behandlung mit dem Mikrotubuli-Inhibitor Oryzalin bestätigt (Abbildung 4-10 g). In stabil PTI1-5:GFP exprimierenden Pollen konnte diese Lokalisation aufgrund der geringen Objektgröße und des zur Verfügung stehenden Mikroskops nicht verifiziert werden. PTI1-5:GFP wurde allerdings in den Pollenschläuchen und in den meisten Pollen vermehrt im Bereich der Plasmamembran gefunden. Dieses Bild ähnelte dem der mit PTI1-5:GFP transient transformierten Zwiebelzellen, wenn die Fokusebene mittig in der Zelle lag. In den transient transformierten Zwiebelzellen wurde zudem eine PTI1-5:GFP Lokalisation um den Nukleus beobachtet, welche in den stabil transformierten Pollen ebenfalls am Nukleus der vegetativen Zelle gefunden wurde (4.1.4, Abbildung 4-10 e, Abbildung 4-11 e, f).

Die übrigen PTI1-Kinasen PTI1-1, PTI1-2, PTI1-4, PTI1-7 und PTI1-9 weisen, wie ZmPTI1a, eine Lokalisation an der Plasmamembran auf (vgl. 4.1.4, Abbildung 4-10, Abbildung 4-11, Abbildung 4-12). Jedoch besitzt nur PTI1-7 eine putative N-Myristoylierungsstelle (Gly an Pos. 2) und zusätzliche putative S-Palmitoylierungsstellen (Cys an Pos. 3, 6 und 7), wie sie für ZmPTI1a typisch sind. HERRMANN *et al.* (2006) konnten diese Motive mittels punktgerichteter Mutagenese als für die Assoziation von ZmPTI1a mit der Plasmamembran essentiell nachweisen. Es ist daher wahrscheinlich, dass auch PTI1-7 über eine vergleichbare N-Myristoylierung mit der Plasmamembran assoziiert ist, und dass diese Interaktion durch S-Palmitoylierungen stabilisiert wird. Möglicherweise handelt es sich hierbei um einen reversiblen Mechanismus, wie er bereits für andere N-myristoylierte

Kinasen bei Tieren und Pflanzen gezeigt wurde. So ändert ein GFP-Konstrukt der pflanzlichen Serin/Threonin-Kinase CDPK aus *Mesembryanthemum crystallinum* in Abhängigkeit von Trockenstress reversibel seine Lokalisation zwischen Plasmamembran, Nukleus, ER und Aktinfilamenten (CHEHAB *et al.* 2004).

N-Myristoylierungen können zusätzlich zur Vermittlung der reversiblen Membranbindung verschiedene weitere Funktionen erfüllen: So sind Myristatreste bei intra- oder intermolekularen Wechselwirkungen wichtig, die sowohl regulatorische als auch assemblierende Funktionen haben können (VRIES *et al.* 2006). Die N-Myristoylierung der löslich im Cytoplasma lokalisierten SIPTO aus Tomate hat z.B. keine membranbindende Wirkung, übt aber eine negative Regulation der eigenen Kinaseaktivität aus. Dabei bindet der myristoylierte N-Terminus von SIPTO an einen hydrophoben Bereich, der die katalytische Spalte umspannt. Auf diese Weise wird der Zugang der Substrate zum katalytischen Zentrum inhibiert (VRIES *et al.* 2006; ANDRIOTIS & RATHJEN 2006).

Obschon die übrigen membranassoziierten PTI1-Kinasen aus *Arabidopsis* ebenfalls potentielle S-Palmitoylierungssignale besitzen, fehlt ihnen ein N-terminales Myristoylierungs- sowie ein C-terminales Prenylierungssignal, welches ebenfalls eine Membranassoziation begünstigen könnte (ZHANG & CASEY 1996). Aufgrund der Zwei-Signal-Hypothese ist unsicher, ob die S-Palmitoylierungen alleine für eine Assoziation mit der Plasmamembran ausreichen (DUNPHY & LINDER 1998). So konnten auch HERRMANN *et al.* (2006) zeigen, dass ZmPTI1a:GFP bereits seine Plasmamembranständigkeit verliert, wenn nur die Myristoylierungsstelle, nicht jedoch die Palmitoylierungsstellen des Proteins mutiert werden. Demnach stellt sich die Frage, ob in den *Arabidopsis* PTI1-Kinasen PTI1-1, PTI1-2, PTI1-4 und PTI1-9 ein zusätzliches Signal neben einer S-Palmitoylierung für die Membranassoziation notwendig ist und wenn ja, welche Sequenz dies sein könnte. Denkbar ist, dass die beiden benachbarten Argininreste in den N-Termini der Subgruppe III PTI1-Kinasen hierbei eine Rolle spielen. Beispielsweise konnte eine Beteiligung C-terminal gelegener Arginin-Motive an der Assoziation mit Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PI(4,5)P<sub>2</sub>) enthaltenden Membranen, insbesondere der ER-Membran, bereits experimentell in Pflanzen und Tieren nachgewiesen werden (JOHNSON *et al.* 2012). Hervorzuheben ist, dass bislang sowohl in *Arabidopsis* als auch in Mais membranständige *Pol*PTI1-Kinasen gefunden werden konnten. Diese gehören jedoch nicht einer einheitlichen Untergruppe der PTI1-Kinasefamilie an (Abbildung 5-1). Eine asymmetrische Akkumulation eines GFP-Konstrukts, wie sie für ZmPTI1a:GFP in Maispollen spezifisch ist (HERRMANN *et al.* 2006), konnte jedoch für PTI1-1 nicht gefunden werden (Abbildung 4-11 a-c). Im Vergleich zwischen *Arabidopsis*

und Mais könnte dies z.B. auch auf unterschiedliche Anatomie des Pollens – Mais besitzt z.B. nur eine Keimpore, während *Arabidopsis* zahlreiche besitzt – zurückzuführen sein.

#### 5.1.4 Funktionelle Redundanz der PTI1-Kinasen aus *Arabidopsis*

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die Genduplikationen der PTI1-Kinasen in *Arabidopsis* neun funktionsfähige Gene und vier syntenisch assoziierte Gruppen hervorgebracht haben. Diese neun PTI1-Kinasen weisen jeweils individuelle Merkmale hinsichtlich ihrer Sequenz, Expression und subzellulären Lokalisation auf. In mehreren Fällen überschneiden sich die Muster zweier oder mehrerer Kinasen entweder hinsichtlich ihrer gewebespezifischen Expression und/oder ihrer subzellulären Lokalisation. Dies kann als ein typisches Merkmal für funktionsfähige Gene gelten, die aus Genduplikationen hervorgegangen sind: Die theoretische Populationsgenetik sagt vorher, dass sich Gene, die nach einer Duplikation funktionell bleiben, in einigen Aspekten ihrer Funktion voneinander unterscheiden müssen (NOWAK *et al.* 1997). Im Fall von PTI1-3/PTI1-5 besitzen beide PTI1-Kinasen aufgrund der hohen Expression in Pollen vermutlich eine Funktion in diesem Gewebe. Ihre unterschiedliche subzelluläre Lokalisation im Cytoplasma bzw. an den Mikrotubuli legt jedoch unterschiedliche Funktionen innerhalb der Pollen nahe. Für die Synteniegruppe PTI1-1/PTI1-2 scheinen die Funktionen dieser PTI1-Kinasen räumlich auseinander zu liegen, da die Daten verschiedener Studien für PTI1-1 auf eine Funktion innerhalb der Pollinierung und für PTI1-2 auf eine Funktion während der Pathogenabwehr hin deuten (vgl. 4.1.3 und ANTHONY *et al.* 2006). Die eigenen Ergebnisse der Promotor-GUS-Studien schließen allerdings eine zusätzliche Aktivität von PTI1-2 in Pollen nicht aus (vgl. 4.1.3). Für die Synteniegruppen PTI1-4/PTI1-9 und PTI1-7/PTI1-8 ist aufgrund der bisher bekannten Daten keine Aussage zur gemeinsamen oder unterschiedlichen Expression zu treffen. Eine Übereinstimmung der subzellulären Lokalisation an der Plasmamembran konnte innerhalb der Synteniegruppen PTI1-1/PTI1-2 und PTI1-4/PTI1-9 gezeigt werden.

Die Anwesenheit von nahe verwandten Genen spielt womöglich eine wichtige Rolle um biologische Systeme gegen genetische Turbulenzen robust zu machen (ZHANG 2003). Daher scheint es nicht unwahrscheinlich, dass bislang der Knockout einzelner *PTI1*-Gene aufgrund der verschiedenen Überschneidungen in Expression und/oder Lokalisation zu keinem sichtbaren Phänotyp führte (4.1.6). Der Knockdown von *OsRLCK1* aus Reis, einem Gen mit zwei weiteren relativ nahe verwandten PTI1-Genen in Reis (Abbildung 5-1), resultierte ebenfalls in keinem sichtbaren Phänotyp (KONG *et al.* 2007). Der Knockdown von *ZmPTI1a*

aus Mais, einem Gen ohne bisher bekannte nahe verwandte Gene, führte dagegen zu einer verminderten Konkurrenzfähigkeit des Pollens im Vergleich zum Wildtyp. Morphologisch konnte jedoch kein signifikanter Unterschied zum Wildtyp bestimmt werden (HERRMANN *et al.* 2006). Da *Arabidopsis* im Gegensatz zu Mais eine zwittrige Blüte besitzt und außerdem Selbstbestäuber ist, können vergleichbare Experimente, wie die von HERRMANN *et al.* (2006), an *Arabidopsis* kaum durchgeführt werden. Somit ist es nur sehr schwer möglich, die Konkurrenzfähigkeit transgener *Arabidopsis* Pollen statistisch zu untersuchen.

## 5.2 Putative PTI1-Signalkaskade in Pollen

Die Forschung an PTI1-Kinasen verschiedener Pflanzen konnte seit 1995 insgesamt zwei Kandidaten als stromaufwärts gelegene Interaktionspartner von PTI1-Kinasen hervorbringen, SIPTO aus Tomate und OXI1 aus *Arabidopsis* und Reis (ZHOU *et al.* 1995; ANTHONY *et al.* 2006; FORZANI *et al.* 2011; MATSUI *et al.* 2010a). PTO wurde bislang nur *in vitro* als Interaktionspartner einer PTI1-Kinase in Tomate identifiziert. Neuere Erkenntnisse über die Signalweiterleitung von SIPTO sowie eine fehlende, experimentelle Bestätigung einer *in vivo* Interaktion zwischen SIPTO und SIPTI1 lassen Zweifel an einer Verbindung zwischen SIPTO und SIPTI1 aufkommen (vgl. 2.5.1). Zudem unterscheiden sich die PTO-Kinasen der *Solanaceae*n grundsätzlich im Aufbau von denen anderer Pflanzen: Während PTO-Kinasen in *Solanaceae*n löslich im Cytosol vorliegen, sind PTOs der übrigen bioinformatisch zugänglichen Pflanzenspezies membranständige Rezeptorkinasen mit einer extrazellulären Liganden-Bindedomäne (ROSE 2004). Möglicherweise ist die Rekrutierung von PTI1-Kinasen als Substrat der PTO-Kinase eine für *Solanaceae*n spezifische evolutive Adaptation. Demnach ist fraglich, ob PTO-Kinasen generell Interaktionspartner der PTI1-Kinasen in Pflanzen sind.

OXI1 und eine OXI1-homologe Kinase konnten hingegen als Interaktionspartner verschiedener PTI1-Kinasen *in vivo* und/oder *in vitro* identifiziert werden (ANTHONY *et al.* 2006; MATSUI *et al.* 2010a; FORZANI *et al.* 2011). Zu diesen PTI1-Kinasen gehören PTI1-1, PTI1-2, PTI1-3 und PTI1-4 aus *Arabidopsis* bzw. OsPTI1a aus Reis. Während jedoch PTI1-1 und PTI1-3 aus *Arabidopsis* präferentiell in Pollen exprimiert werden, liegt für die AGC-Kinase OXI1 nur eine geringe Expression in diesem Gewebe vor (Abbildung 4-16). OXI1 wird in *Arabidopsis* vor allem in Wurzeln und Wurzelhaaren exprimiert und ist für mindestens zwei verschiedene Prozesse notwendig: das Wurzelhaarwachstum sowie die basale Resistenz gegenüber *Hyaloperonospora arabidopsis* und die Effektor-vermittelte Resistenz gegenüber *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (RENTEL *et al.* 2004; ANTHONY *et al.* 2004;

PETERSEN *et al.* 2009). Eine *in vivo* Interaktion zwischen OXI1 und den  $_{\text{pol}}$ PTI1-Kinasen scheint in Pollen aufgrund der mRNA-Expressionsmuster nicht besonders naheliegend zu sein. Die Vermutung, dass eine der vielen anderen in *Arabidopsis* vorkommenden AGC-Kinasen ein plausiblerer Kandidat für die *in vivo* Interaktion in Pollen sein könnte, lag nahe. Tatsächlich konnten bioinformatisch zwei AGC-Kinasen mit einer präferentiellen Expression in Pollen gefunden werden (Abbildung 4-16), die eine Sequenzidentität von 57% zueinander besitzen. AGC1-5 und AGC1-7 gehören, wie OXI1, zur pflanzenspezifischen AGCVIII-Familie. Sie gruppieren jedoch im Gegensatz zu OXI1 in die Subfamilie AGCVIIIa. Für AGC1-5 und AGC1-7 postulierten ZHANG *et al.* (2009), dass sie wichtige Komponenten einer Maschinerie sind, welche dem Pollenschlauch zu einem gerichteten Wachstum verhilft.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass AGC1-5 und AGC1-7 aus *Arabidopsis* eine *in vitro* Autophosphorylierungsaktivität besitzen, und AGC1-5 in der Lage ist die  $_{\text{pol}}$ PTI1-Kinasen PTI1-1, PTI1-3, PTI1-5 und PTI1-6 sowie die  $_{\text{ubi}}$ PTI1-Kinase PTI1-2 *in vitro* zu phosphorylieren (Abbildung 4-18, Abbildung 4-22). Eine physische *in vitro* Interaktion konnte zudem zwischen AGC1-5 und AtPTI1-1 bzw. AtPTI1-3 durch *Pulldown*-Experimente nachgewiesen werden (Abbildung 4-24). Aufgrund dieser Ergebnisse erscheint AGC1-5 als ein potentieller Kandidat für einen stromaufwärts gelegenen *in vivo* Interaktionspartner der  $_{\text{pol}}$ PTI1-Kinasen. Interessanterweise wurde in den *Pulldown*-Experimenten nur die längere Spleißvariante des PTI1-3 von AGC1-5 gebunden, während beide Spleißvarianten der *in vitro* Phosphorylierung durch AGC1-5 zugänglich waren. Dies kann als Indiz für eine stärkere *in vitro* Bindeaffinität des AGC1-5 für die längere Spleißvariante von PTI1-3 interpretiert werden. Ursache hierfür könnte eine aufgrund des verlängerten N-Terminus veränderte Konformation des PTI1-3 sein. Es kann spekuliert werden, dass auch *in planta* dem N-Terminus von PTI1-3 eine übergeordnete Bedeutung zukommt. Denkbar ist, dass beide Spleißvarianten auch *in planta* vorliegen und möglicherweise an unterschiedlichen Signalkaskaden beteiligt sind. Möglich ist auch, dass PTI1-3 in der Pflanze posttranslational modifiziert wird und die unterschiedlichen Zustandsformen des Proteins unterschiedliche Affinitäten zu z.B. AGC1-5 besitzen. Die Konformationen dieser Zustandsformen könnten indirekt durch die Spleißvarianten des *in vitro* Experiments widergespiegelt werden. Interessanterweise scheint zudem die kürzere Spleißvariante von PTI1-3 keine *in vitro* Autophosphorylierungsaktivität zu besitzen (ANTHONY *et al.* 2006), im Gegensatz zu der längeren Spleißvariante (vgl. 4.1.5). Dass der N-Terminus für die Regulation der Kinaseaktivität eine große Bedeutung besitzen kann, wurde z.B. für die mit PTI1-Kinasen nahe verwandte PTO-Kinase aus Tomate experimentell gezeigt (ANDRIOTIS & RATHJEN 2006).

Dort kommt den N-terminalen Aminosäuren eine Funktion als „Deckel“ bei der Regulation des Substrateintritts in das katalytische Zentrum zu (siehe 5.1.3). Das komplexe Zusammenspiel der Interaktionspartner wird dadurch verdeutlicht, dass AGC1-5 *in vitro* an PTI1-1 binden kann, obwohl dessen N-Terminus der kürzeren Spleißvariante von PTI1-3 ähnelt (Abbildung 4-2), welche nicht von AGC1-5 gebunden wird. Dies lässt vermuten, dass auch in den *in vitro* Bindungsstudien eine gewisse Substratspezifität der AGC-Kinase vorliegt. Weitere Bindungsstudien mit anderen PTI1-Kinasen könnten Aufschluss über ein mögliches Muster der Substratspezifität von AGC1-5 geben.

Neben OXI1 konnte hier eine weitere AGCVIII-Kinase, AGC1-5, trotz einer Proteinidentität beider Kinasen von nur 21%, als ein neuer potentieller *in vivo* Interaktionspartner der PTI1-Kinasen identifiziert werden. Von großem Interesse werden daher künftige *in vivo* Interaktionsstudien zwischen AGC1-5 und den  $p_{ol}$ PTI1-Kinasen aus *Arabidopsis*, die Identifizierung weiterer AGC1-5-homologer Kinasen anderer Pflanzen sowie die Erforschung deren stromabwärts gelegener Interaktionspartner sein.

### 5.2.1 Ein stromaufwärts gelegener Interaktionspartner der AGCVIII-Kinase AGC1-5 ist PDK1.2

In Eukaryoten werden AGC-Kinasen häufig durch eine 3-Phosphoinositid-abhängige Proteinkinase 1 (PDK1) mittels *trans*-Phosphorylierung reguliert (MORA *et al.* 2004; SOBKO 2006; ZEGZOUTI *et al.* 2006b). *Arabidopsis* besitzt zwei verwandte PDK1-Kinasen, PDK1.1 und PDK1.2, welche auf Aminosäureebene eine Identität von 93% besitzen (ANTHONY *et al.* 2004). Eine *in vitro* Interaktion von PDK1.1 wurde bereits mit OXI1, AGC1-5, AGC1-7 sowie weiteren AGCVIII-Kinasen beschrieben (ANTHONY *et al.* 2004; ZEGZOUTI *et al.* 2006b). Sowohl PDK1.1 als auch PDK1.2 zeigen eine schwache ubiquitäre Expression (Abbildung 4-25 und ANTHONY *et al.* 2004). PDK1.2 weist jedoch zusätzlich eine erhöhte mRNA-Expression in Pollen auf und rückte deshalb als möglicher Kandidat für einen stromaufwärts gelegenen Interaktionspartner der AGC1-5 und AGC1-7 Kinasen in den Fokus der Untersuchungen.

Tatsächlich konnte PDK1.2 im Rahmen dieser Arbeit als eine funktionelle Kinase mit *in vitro* Autophosphorylierungsaktivität charakterisiert werden, welche zudem in der Lage ist AGC1-5 *in vitro* zu phosphorylieren (Abbildung 4-27). Die physische Interaktion zwischen PDK1.2 und AGC1-5 konnte außerdem biochemisch durch *Pulldown*-Studien verifiziert werden (Abbildung 4-28). Infolgedessen kann PDK1.2 als ein weiterer, stromaufwärts gelegener Interaktionspartner von AGC1-5 angesehen werden.

### 5.2.2 Subzelluläre Lokalisation von AGC1-5, AGC1-7 und PDK1.2

Die Subzelluläre Lokalisation von AGC1-5 und AGC1-7 konnte im Rahmen dieser Arbeit und in Übereinstimmung mit älteren Studien im Cytoplasma (ZEGZOUTI *et al.* 2006b; ZHANG *et al.* 2009) sowie zusätzlich im Zellkern festgestellt werden (Abbildung 4-29 a-c, d-f). Nicht vollständig auszuschließen ist, dass es sich bei der nukleären Lokalisation um einen Artefakt aufgrund von Abbauprodukten des Fusionsproteins handeln könnte. Für die cytoplasmatische Lokalisation von PID und AGC1-7 konnten ZEGZOUTI *et al.* (2006b) den Bereich der Insertionsdomäne verantwortlich machen, welche allen AGVIII-Kinasen gemein ist und daher wohl auch die Lokalisation von AGC1-5 bestimmt. Für tierische PDK1 ist eine komplexe und variable Lokalisation bekannt. In unstimulierten Zellen ist die PDK1 im Cytoplasma und zu geringeren Teilen an der Plasmamembran lokalisiert. Unter bestimmten Bedingungen kann jedoch eine verstärkte Relokalisation des Proteins an die Plasmamembran bzw. eine nukleäre Lokalisation induziert werden. Dieser Mechanismus scheint unabhängig von Kernlokalisierungssignalen (NLS) abzulaufen (CURRIE *et al.* 1999; LIM *et al.* 2003; SCHEID *et al.* 2005). Für PDK1.2 aus *Arabidopsis* konnte im Rahmen dieser Arbeit eine cytoplasmatische Lokalisation bestimmt werden. Eine zusätzliche partielle Lokalisation an der Plasmamembran ist jedoch nicht auszuschließen (Abbildung 4-29 g-i). Ob für PDK1.2 ein ähnlicher *Shuttle*-Mechanismus vorliegt, wie bei PDK1 aus Tieren, bleibt ungeklärt, würde jedoch weitere interessante Aspekte der PDK1-Signaltransduktion in *Arabidopsis* eröffnen.

Da sowohl PDK1.2 als auch AGC1-5 und AGC1-7 zumindest hauptsächlich im Cytoplasma lokalisiert sind, erscheint die *in vivo* Interaktion der Kinasen wahrscheinlich. Es ist jedoch zu bedenken, dass die Lokalisation der AGC-Kinasen bisher nur im heterologen System der Zwiebelepidermis untersucht wurde und die subzelluläre Lokalisation in *Arabidopsis* Pollen variieren könnte. Sollten AGC1-5 und AGC1-7 in Pollen ebenfalls eine cytoplasmatische Lokalisation besitzen, kämen sie im gleichen Kompartiment wie PTI1-3 und PTI1-6 vor und die räumliche Basis für eine *in vivo* Interaktion wäre vorhanden. PTI1-5 wird in Pollen vermutlich an den Mikrotubuli gefunden, während PTI1-1 mit der Plasmamembran assoziiert ist. Trotzdem ist nicht auszuschließen, dass diese Kinasen mit den cytoplasmatisch lokalisierten Komponenten interagieren können oder ihre subzelluläre Lokalisation unter bestimmten Bedingungen verändern. Eine solche Relokalisation wurde bereits für verschiedene Proteine wie z.B. PDK1 aus Tieren, CDPK aus *Mesembryanthemum crystallinum* und ADI3 aus Tomate beobachtet (CURRIE *et al.* 1999; LIM *et al.* 2003; SCHEID *et al.* 2005; CHEHAB *et al.* 2004; EK-RAMOS *et al.* 2010). ADI3 aus Tomate, ebenfalls eine

AGCVIIIa-Kinase, interagiert mit PTO nur in der Gegenwart von AvrPTO. Mittels Phosphorylierung von ADI3 durch PDK1 wird eine nukleäre Lokalisation sowie eine CDS (*cell death suppression*)-Aktivität von ADI3 induziert (DEVARENNE *et al.* 2006; EK-RAMOS *et al.* 2010). Zukünftige *in planta* Studien mit Hilfe Bimolekularer Fluoreszenzkomplementation (BIFC) sowie Co-Lokalisationsstudien könnten weiteren Aufschluss über die mögliche *in vivo* Interaktion zwischen PDK1.2, AGC1-5, AGC1-7 sowie den  $P_{ol}$ PTI1-Kinasen liefern.

Durch Vergleich der Phänotypen der Knockout-Mutanten von AGC1-5 und PDK1.2 konnten Hinweise auf eine *in vivo* Interaktion zwischen diesen Kinasen erbracht werden. Einzelknockout-Linien von AGC1-5 und PDK1.2 zeigten keinen sichtbaren Phänotyp der Pollen (Abbildung 4-31 d und ZHANG *et al.* 2009). Deshalb wurde der Phänotyp der Doppelknockout-Mutanten *pdk1.1/pdk1.2 d.ko.* und *agc1-5/agc1-7 d.ko.* miteinander verglichen.

Es zeigte sich, dass Pollen der Linien *pdk1.1/pdk1.2* und *agc1-5/agc1-7* eine deutliche Störung der Wachstumsmorphologie besitzen und dieser Phänotyp in beiden Linien sehr ähnlich ist (vgl. 4.4. und ZHANG *et al.* 2009). Sowohl die Pollenschläuche der *pdk1.1/pdk1.2 d.ko* als auch der *agc1-5/agc1-7 d.ko* zeigen *in vitro* ein gestörtes polarisiertes Wachstum (Abbildung 4-31). Diese Störung offenbart sich durch häufige Richtungswechsel, infolgedessen die Pollenschläuche ein Zickzack-Aussehen erhalten. Der Durchmesser der Pollenschläuche beider Mutantenlinien war signifikant breiter als der des Wildtyps und der *qrt*-Mutante (Abbildung 4-30). Dabei war der Durchmesser der *agc1-5/agc1-7* Pollenschläuche größer (37% i. V. zum Wildtyp) als der der *pdk1.1/pdk1.2 d.ko* (22% i. V. zum Wildtyp). Bezogen auf diesen Phänotyp scheint der Verlust der AGC1-5/AGC1-7-Funktionen kritischer als der Verlust der PDK1-Funktionen zu sein. Das veränderte Richtungswachstum der Pollenschläuche konnte auch *in vivo* für die Pollenschläuche der *pdk1.1/pdk1.2 d.ko.* und *agc1-5/agc1-7 d.ko.* im Pistill bestätigt werden (Abbildung 4-33 und ZHANG *et al.* 2009). Vor allem im Transmissionsgewebe unterhalb des Stylus waren die Pollenschläuche von *pdk1.1/pdk1.2 d.ko.* deutlich weniger organisiert als beim Wildtyp, wengleich sowohl bei Mutante als auch Wildtyp in geringem Maße der entgegengesetzte Phänotyp beobachtet wurde. Zickzack-Wachstum konnte bei Wildtyp-Pollenschläuchen insbesondere im unteren Bereich der Pistille bzw. beim Verlassen des Transmissionsgewebes auf dem Weg zur Samenanlage beobachtet werden. Ähnliches wurde für Wildtyp Pollenschläuche bereits von CRAWFORD *et al.* (2007) berichtet.

Im Unterschied zu den Pollenschläuchen der *agc1-5/agc1-7 d.ko.* und des Wildtyps bildeten die *pdk1.1/pdk1.2 d.ko.* Pollenschläuche *in vitro* häufiger Verzweigungen aus (Abbildung 4-31 e, Abbildung 4-32 c-f). Diese Verzweigungen konnten ebenfalls beim *in vivo* Wachstum der *pdk1.1/pdk1.2* Pollenschläuche im Transmissionsgewebe der Pistille beobachtet werden (Abbildung 4-33 n,p,q). Vergleichbare Verzweigungen von Pollenschläuchen wurden bei *Arabidopsis* nach Überexpression einer Phosphatidylinositol-4-Phosphat 5 (PI4P 5)-Kinase von ISCHEBECK *et al.* (2008) beschrieben. Durch die Überexpression der PI4P 5-Kinase wurde die Produktion von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PI(4,5)P<sub>2</sub>) gesteigert und führte zu einer erhöhten Ablagerung von Zellwandmaterial im apikalen Bereich des Pollenschlauchs. Im Unterschied zu den Verzweigungen der Pollenschläuche der *pdk1.1/pdk1.2 d.ko.* wuchsen nach Überexpression der PI4P 5-Kinase beide Verzweigungen der Pollenschläuche gleichmäßig weiter. Zusätzlich zu den Verzweigungen konnten ISCHEBECK *et al.* (2008) eine Art Zickzack-Wachstum der Pollenschläuche beobachten. Diese Daten könnten auf einen möglicherweise gestörten Phospholipid-Haushalt in den *pdk1.1/pdk1.2 d.ko.* Pflanzen hinweisen, welcher im theoretischen Konsens mit zahlreichen der auch für PTI1-Kinasen postulierten Interaktionsnetzwerke steht (ANTHONY *et al.* 2004; ANTHONY *et al.* 2006; FORZANI *et al.* 2011).

Ein verkürztes Wachstum, wie es von ZHANG *et al.* (2009) für die Pollenschläuche der *agc1-5/agc1-7 d.ko.* *in vitro* beschrieben wurde, konnte für die Pollenschläuche der *pdk1.1/pdk1.2 d.ko.* nicht gefunden werden. Zudem berichteten ZHANG *et al.* (2009) für die *agc1-5/agc1-7 d.ko.* Linie von einer verminderten Befruchtung der Samenanlagen. Die Schoten der *agc1-5/agc1-7 d.ko.* Linien entwickelten im unteren Bereich nur aus ca. 52% der Ovarien Samen. Da in der oberen Hälfte der Schoten ca. 13% der Ovarien unbefruchtet blieben im Vergleich zum Wildtyp mit ca. 1,3%, vermuteten ZHANG *et al.* (2009), dass einige der *agc1-5/agc1-7 d.ko.* Pollenschläuche nicht in der Lage waren, das Transmissionsgewebe zu verlassen, womöglich aufgrund einer beeinträchtigten Reaktion auf funiculäre Anlockung. Die Pollenschläuche der *pdk1.1/pdk1.2 d.ko.* waren *in planta* zwar in der Lage die Samenanlagen in den Pistillen zu erreichen (Abbildung 4-33 f und g), jedoch zeigten auch die Schoten dieser Mutanten-Linie weniger Samenansatz als der Wildtyp. Anhand statistischer Auswertungen berichteten CAMEHL *et al.* (2011), dass der Samenansatz in der *pdk1.1/pdk1.2 d.ko.* Linie im Vergleich zum Wildtyp um ca. 59% reduziert ist. Zur weiteren Charakterisierung des Phänotyps der *pdk1.1/pdk1.2 d.ko.* Pollenschläuche sind daher Untersuchungen erforderlich, die z.B. das Pollenschlauchwachstum innerhalb des

Transmissionsgewebes, die Reaktion der Pollenschläuche auf Anlockungssignale sowie die Position der befruchteten und unbefruchteten Samenanlagen in den Schoten betreffen.

Vor Abschluss der vorliegenden Arbeit waren kaum Daten für die PDK1.2-Kinase aus *Arabidopsis* bekannt. Im Rahmen dieser Arbeit konnte für PDK1.2 eine *in vitro* Autophosphorylierungsaktivität, eine *in vitro* Interaktion mit AGC1-5 sowie eine Funktion beim gerichteten Wachstum des Pollenschlauchs nachgewiesen werden.

Aufgrund gewisser Gemeinsamkeiten im Mutantenphänotyp der Pollenschläuche beider Doppelknockout-Mutanten sowie der *in vitro trans*-Phosphorylierungs- und GST-Bindungsstudien (vgl. 4.2.3; ZEGZOUTI *et al.* 2006b; ZHANG *et al.* 2009) ist zu vermuten, dass AGC1-5 und AGC1-7 stromabwärts gelegene Interaktionspartner der beiden PDK1-Kinasen, PDK1.1 und PDK1.2, sind. Die Unterschiede in der Stärke der beiden Mutantenphänotypen lassen allerdings vermuten, dass es sich um keine lineare Signalkaskade handelt. Vielmehr ist zu erwarten, dass AGC1-5 und/oder AGC1-7 durch zusätzliche Signale aktiviert werden, wie es z.B. auch für OXI1 bekannt ist, welches neben einer *trans*-Phosphorylierung durch PDK1 mittels ROS unabhängig von PDK1 aktiviert wird (ANTHONY *et al.* 2006).

Der Verlust beider *PDK1*-Genaktivitäten führt bei *Arabidopsis* zu einem veränderten Wachstum der Pollenschläuche - sowohl *in vitro* als auch *in vivo*. Mit der Störung im gerichteten Wachstum der *pdk1.1/pdk1.2 d.ko.* Pollenschläuche wurden deutliche Hinweise gefunden, dass beide Kinasen eine wichtige Rolle beim Pollenschlauchwachstum besitzen und folglich, wie auch die Kinasen AGC1-5 und AGC1-7, Teil eines Signalnetzwerkes sind, das für diesen Wachstumsprozess essentiell ist. Da  $P_{ol}$ PTI1-Kinasen als mögliche Substrate der AGC1-Kinasen gefunden werden konnten, ist auch ihre Funktion innerhalb dieses Netzwerkes anzunehmen. Allerdings zeigen die Einzelmutanten der  $P_{ol}$ PTI1-Kinasen keinen Mutantenphänotyp. Deshalb könnte ein Weg zur Bestätigung dieser Hypothese die Analyse von  $P_{ol}$ PTI1-Kinasen Mehrfachmutanten sein.

Außerdem könnte für die weitere Untersuchung der postulierten Signalkaskade bestehend aus PDK1.2/PDK1.1, AGC1-5/AGC1-7 und den  $P_{ol}$ PTI1-Kinasen die Identifizierung eines übergeordneten Induktors aufschlussreich sein. Ein möglicher Kandidat ist PA, welches eine wichtige Rolle bei der Pollenkeimung sowie dem Pollenschlauchwachstum beigemessen wird (POTOCKÝ *et al.* 2003). PA wurde von ANTHONY *et al.* (2004) bereits als Aktivator der PDK1.1 aus *Arabidopsis* identifiziert. Die Zugabe von PA zu Suspensionszellen führte jedoch nur bei einer der drei untersuchten PTI1-Kinasen, PTI1-2, zu einer Aktivierung der Kinaseaktivität (ANTHONY *et al.* 2006). PTI1-2 wird in Pollen, aber auch in den übrigen

Gewebe ubiquitär exprimiert (vgl. 4.1.3). Die präferentiell in Pollen exprimierten  $_{\text{Pol}}\text{PTI1}$ -Kinasen PTI1-1 und PTI1-3 waren in diesem System nicht durch PA aktivierbar. Da der Ursprung der Suspensionskultur nicht bekannt ist, kann als eine mögliche Ursache z.B. spekuliert werden, dass in den verwendeten Suspensionszellen pollenspezifische übergeordnete Interaktionspartner von PTI1-1 und PTI1-3, wie z.B. AGC1-5 und AGC1-7, nicht vorhanden waren, und deshalb eine Induktion der PTI1-Kinaseaktivitäten unterblieb. Daher ist eine PA-abhängige Aktivierung von PTI1-1 und PTI1-3 nicht endgültig auszuschließen und bedarf weiterer Untersuchungen.

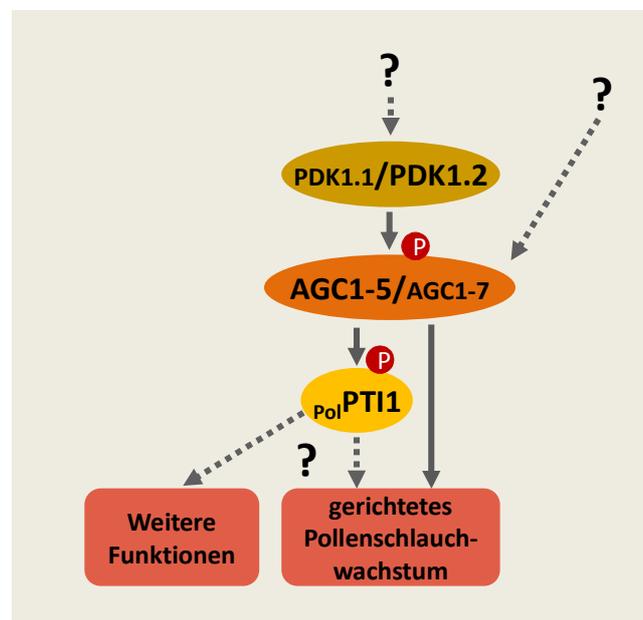
Möglicherweise könnte auch ein weiteres Phospholipid, wie z.B.  $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$ , an einer Aktivierung dieser Kaskade beteiligt sein.  $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$  stimuliert neben PA ebenfalls die Aktivität von PDK1.1 (ANTHONY *et al.* 2004) und kontrolliert in Pollen vermutlich die Aktinorganisation und den Membranverkehr (KOST *et al.* 1999). Die Pollenschläuche einer *Arabidopsis* Pflanze, die aufgrund einer überexprimierten PI4P 5-Kinase eine erhöhte Produktion von  $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$  aufweist, zeigen Verzweigungen und Wachstumsanomalien, welche denen der *pdk1.1/pdk1.2 d.ko.* Pollenschläuche ähneln (ISCHEBECK *et al.* 2008). Dies könnte neben einem gestörten Phospholipid-Haushalt der *pdk1.1/pdk1.2 d.ko.* Pollenschläuche auf eine mögliche Rolle von  $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$  als Auslöser der in dieser Arbeit postulierten Signalkaskade hindeuten.

Des Weiteren ist zu bedenken, dass PDK1.1 in *Arabidopsis* sowohl mit der Mehrzahl der AGCVIIIa-Kinasen als auch mit z.B. OXI1, einer AGCVIIIb-Kinase *in vitro* interagiert (ZEGZOUTI *et al.* 2006b; ANTHONY *et al.* 2004). Ob und in wieweit die tatsächliche *in planta* Spezifität hiervon abweicht, ist vollständig unbekannt. Das vielfältige Expressionsmuster der AGCVIII-Kinasen in den verschiedenen Geweben und während verschiedener Entwicklungsstadien der Pflanzen (ANTHONY *et al.* 2004; ZEGZOUTI *et al.* 2006b; ZHANG & MCCORMICK 2009) sowie die unterschiedliche subzelluläre Lokalisationen bieten eine weitere komplexe Ebene dieser Protein-Protein Wechselwirkungen. Letztlich könnte auch eine induzierte und reversible subzelluläre Relokalisation der *Arabidopsis* PDK1-Kinasen, wie bereits für die tierische PDK1 gezeigt, das Substratspektrum dieses Signaltransduktionsnetzes erweitern. Für die PDK1.2-Kinase ist nicht auszuschließen, dass sie neben Pollen auch in anderen Geweben funktionell ist und ihre Funktion mit der der PDK1.1-Kinase redundant ist. Abgesehen von Pollen, sind beide PDK1-Kinasen in den übrigen Geweben sehr ähnlich exprimiert und weisen zudem eine große Ähnlichkeit in der Sequenz auf (vgl. 4.2.3). Für eine zumindest teilweise redundante Funktion spricht, dass weder der Einzelknockout von PDK1.1 noch der von PDK1.2 zu einem veränderten Phänotyp im *in vitro*

Pollenschlauchwachstum bzw. im Habitus der Pflanze führt (diese Arbeit und DRZEWIECKI 2010).

FORZANI *et al.* (2011) zeigten, dass PTI1-4 in Wurzeln und Wurzelhaaren exprimiert wird. Neben PTI1-4 scheint mindestens eine weitere PTI1-Kinase aus *Arabidopsis* eine signifikante Expression in den Wurzelhaaren zu besitzen, interessanterweise handelt es sich hierbei um die  $_{\text{pol}}$ PTI1-Kinasen PTI1-6 (PUSUNC 2007). Sowohl Wurzelhaare als auch Pollenschläuche wachsen über gerichtetes Spitzenwachstum (vgl. 2.2) und einige molekulare Komponenten sind an beiden Prozessen beteiligt, wie z.B. ROS,  $\text{Ca}^{2+}$  und Phospholipide (HEPLER *et al.* 2001; SWANSON & GILROY 2010). Aufgrund der Daten von ANTHONY *et al.* (2006) und FORZANI *et al.* (2011) sowie der Daten dieser Arbeit kann spekuliert werden, dass PTI1-Kinasen an AGC-vermittelten Signalkaskaden sowohl beim Pollenschlauchwachstum als auch beim Spitzenwachstum der Wurzelhaare involviert sind.

Die hier erarbeiteten Daten können mit den bereits publizierten Daten anderer Forschergruppen in einem hypothetischen Arbeitsmodell der PDK1.1/PDK1.2 - AGC1-5/AGC1-7 -  $_{\text{pol}}$ PTI1 vermittelten Signaltransduktion in *Arabidopsis* zusammengefasst werden:



**Abbildung 5-2: Modell der  $_{\text{pol}}$ PTI1-Signalkaskade.** Als Reaktion auf ein bestimmtes Entwicklungssignal aktiviert PDK1.1 und/oder PDK1.2 eine oder beide der AGCVIIIa-Kinasen AGC1-5 und AGC1-7. AGC1-5 und/oder AGC1-7 phosphorylieren  $_{\text{pol}}$ PTI1-Kinasen. Zusätzlich sind AGC1-5 und AGC1-7 Komponenten weiterer Signaltransduktionswege, die unabhängig von PDK1.1 bzw. PDK1.2 wirken. Aufgrund der für AGC1-5 und AGC1-7 sowie für PDK1.1 und PDK1.2 postulierten Funktion beim Pollenschlauchwachstum wird vermutet, dass die  $_{\text{pol}}$ PTI1-Kinasen ebenfalls an Prozessen beteiligt sind, die dem Pollenschlauch zu einem gerichtetem Wachstum verhelfen.

Ein bislang unbekanntes Signal, möglicherweise PA oder PI(4,5)P<sub>2</sub> könnte von PDK1.1/PDK1.2 über AGC1-5/AGC1-7 auf <sub>pol</sub>PTI1-Kinasen übertragen werden, um ein gerichtetes Pollenschlauchwachstum zu gewährleisten. AGC1-5/AGC1-7 erhält zudem weitere Signale und leitet diese vielleicht ebenfalls an die <sub>pol</sub>PTI1-Kinasen weiter. Geht man von einer Funktion der <sub>pol</sub>PTI1 beim Pollenschlauchwachstum aus, wie sie auch für ZmPTI1a von Mais postuliert wird (HERRMANN *et al.* 2006), so ist eine funktionelle Redundanz der <sub>pol</sub>PTI1 zu erwarten, da in den bisherigen Versuchen der Verlust einzelner <sub>pol</sub>PTI1-Genfunktionen zu keinem veränderten Pollenphänotypen bei *Arabidopsis* geführt hat (vgl. 4.1.6). Nicht auszuschließen ist allerdings, dass die AGC-Kinasen, AGC1-5 und AGC1-7, direkt auf das Pollenschlauchwachstum wirken und die Funktion der <sub>pol</sub>PTI1 einen bislang unbekanntem Aspekt der Pollen- bzw. Pollenschlauchentwicklung betrifft.

### 5.3 Ausblick

Im Laufe dieser Arbeit wurde ein Modell einer mutmaßlichen Signalkaskade für die <sub>pol</sub>PTI1-Kinasen erstellt, an dem zusätzlich die AGC-Kinasen AGC1-5, AGC1-7, PDK1.1 und PDK1.2 involviert sind. Zum jetzigen Zeitpunkt beruht dieses Modell auf dem Nachweis von *in vitro* Interaktionen (*trans*-Phosphorylierung und physischer Bindung) sowie auf vergleichbaren Pollenphänotypen der Doppelmutanten *pdk1.1/pdk1.2 d.ko.* und *agc1-5/agc1-7 d.ko.*. Daher gilt es zunächst zu klären, ob dieses Modell der putativen Signalkaskade tatsächlich *in vivo* Bestand hat und ferner die dazugehörigen Mechanismen aufzudecken. Hierfür erscheint die Herstellung von <sub>pol</sub>PTI1-Doppelknockout-Mutanten, die Analyse dieser Mutanten auf molekularer und phänotypischer Ebene sowie der direkte Vergleich mit den Phänotypen der *pdk1.1/pdk1.2 d.ko.* und *agc1-5/agc1-7 d.ko.* als notwendig damit so vielleicht die vermutete Rolle der <sub>pol</sub>PTI1-Kinasen beim Pollenschlauchwachstum experimentell belegt werden kann.

Der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Vergleich der *pdk1.1/pdk1.2 d.ko.* und *agc1-5/agc1-7 d.ko.*, sollte weitergeführt werden, um einen detaillierten Überblick über Gemeinsamkeiten und Unterschiede dieser beiden Mutantenlinien zu erhalten. Hierzu sind Studien sinnvoll, anhand derer das Pollenschlauchwachstum innerhalb des Transmissionsgewebes und die Menge sowie die Lage der befruchteten/unbefruchteten Samenanlagen der *pdk1.1/pdk1.2 d.ko.* überprüft werden. Diese Analysen sind notwendig um die Reaktion der *pdk1.1/pdk1.2 d.ko.* Pollenschläuche auf funiculäre Anlockung zu erörtern und mit den Studien von ZHANG *et al.* (2009) zu vergleichen.

Des Weiteren könnte ein *in vivo* Nachweis der *in vitro* Interaktionen mittels *Pulldown* z.B. aus transient transformiertem Blattgewebe bzw. aus transient transformierten Suspensionszellen, wie sie von ANTHONY *et al.* (2006) verwendet wurden, durchgeführt werden. Durch die Verwendung geeigneter Suspensionszellen könnten zudem mögliche Auslöser identifiziert werden, die die Signalkaskade über PDK1.1 und/oder PDK1.2 aktivieren bzw. die PDK1.1/PDK1.2-unabhängige Aktivierung von AGC1-5 und/oder AGC1-7 auslösen.

Weitere Anhaltspunkte über die Art der Störung in den Pollenschläuchen der Mutanten könnte die Behandlung der Pollenschläuche mit Chemikalien, wie z.B. Oryzalin, Laturinculin B und 1-Butanol, liefern.

Darüber hinaus könnten *in planta* Interaktionsstudien mittels BIFC sowie Co-Lokalisationsstudien weiteren Aufschluss über die möglichen *in vivo* Interaktionen zwischen PDK1.1/PDK1.2, AGC1-5/AGC1-7 sowie den  $_{\text{pol}}$ PTI1-Kinasen geben. Zum Erlangen eines besseren Verständnisses über die Funktionen und die Substratspezifität der PDK1-Kinasen aus *Arabidopsis* könnten zusätzlich zu den BIFC-Studien Promotor-Reporter-gen-Studien hilfreich sein.

Die Identifizierung weiterer PDK1-, AGC- und  $_{\text{pol}}$ PTI1-Kinasen anderer Pflanzen, z.B. aus Mais, könnte helfen, die prinzipiell agierenden Mitglieder dieser Signalkaskadekomponenten weiter zu entschlüsseln. Dabei muss jedoch berücksichtigt werden, dass PTI1-vermittelte Kinasewege während der Evolution offenbar auch spezies-spezifischen Anpassungen unterworfen waren. Aus den Resultaten der vorliegenden Arbeit ist ersichtlich, dass ein einfacher Wechsel zwischen Modellpflanzen, wie er bei vielen orthologen Genfamilien in der molekularen Forschung oft problemlos möglich ist, bei der Familie der PTI1-Kinasen wohl nur bedingt durchführbar ist. Andererseits eröffnet diese Genfamilie dadurch eine Möglichkeit, die Neurekrutierung etablierter Signalmodule als Notwendigkeit evolutionsbedingter Neuerungen, zu untersuchen und zu verstehen.

## 6. Literaturverzeichnis

- Abramovitch, R.B., Kim, Y.-J., Chen, S., Dickman, M.B., Martin, G.B. 2003.** Pseudomonas type III effector AvrPtoB induces plant disease susceptibility by inhibition of host programmed cell death. *EMBO J*, 22(1), S.60–69.
- Alandete-Saez, M., Ron, M. & McCormick, S., 2008.** GEX3, Expressed in the Male Gametophyte and in the Egg Cell of Arabidopsis thaliana, Is Essential for Micropylar Pollen Tube Guidance and Plays a Role during Early Embryogenesis. *Molecular Plant*, 1(4), S.586–598.
- Alonso, J.M. Stepanova, A.N., Leisse, T.J., Kim, C.J. 2003.** Genome-Wide Insertional Mutagenesis of Arabidopsis thaliana. *Science*, 301(5633), S.653–657.
- Andriotis, V.M.E. & Rathjen, J.P. 2006.** The Pto Kinase of Tomato, Which Regulates Plant Immunity, Is Repressed by Its Myristoylated N Terminus. *Journal of Biological Chemistry*, 281(36), S.26578–26586.
- Anthony, R.G., Henriques, R., Helfer, A., Meszaros, T. 2004.** A protein kinase target of a PDK1 signalling pathway is involved in root hair growth in Arabidopsis. *EMBO J*, 23(3), S.572–581.
- Anthony, R.G., Khan, S., Costa, J. Pais, M.S., Bögre, L., 2006.** The Arabidopsis Protein Kinase PTI1-2 Is Activated by Convergent Phosphatidic Acid and Oxidative Stress Signaling Pathways Downstream of PDK1 and OXI1. *Journal of Biological Chemistry*, 281(49), S.37536–37546.
- Arabidopsis Genome Initiative, 2000.** Analysis of the genome sequence of the flowering plant Arabidopsis thaliana. *Nature*, 408(6814), S.796–815.
- Aström, H., Sorri, O. & Raudaskoski, M., 1995.** Role of microtubules in the movement of the vegetative nucleus and generative cell in tobacco pollen tubes. *Sexual Plant Reproduction*, 8(2).
- Bagherzadegan-Saravi, B., 2008.** Klonierung und subzelluläre Lokalisationsstudien PTI1-homologer Proteinkinase in Arabidopsis thaliana (L.) Heynh. *Bachelorarbeit*. Universität Hamburg.
- Bedinger, P., 1992.** The remarkable biology of pollen. *The Plant Cell*, 4(8), S.879–887.
- Blanc, G., Barakat, A., Guyot, R., Cooke, R., Delseny, M. 2000.** Extensive Duplication and Reshuffling in the Arabidopsis Genome. *The Plant Cell Online*, 12(7), S.1093–1102.
- Bögre, L., Okrész, L., Henriques, R., Anthony, R.G. 2003.** Growth signalling pathways in Arabidopsis and the AGC protein kinases. *Trends in Plant Science*, 8(9), S.424–431.
- Boisson-Dernier, A., Roy, S., Kritsas, K., Grobei, M., Grossniklaus, U. 2009.** Disruption of the pollen-expressed FERONIA homologs ANXUR1 and ANXUR2 triggers pollen tube discharge. *Development*, 136(19), S.3279–3288.
- Boller, T. & He, S.Y., 2009.** Innate Immunity in Plants: An Arms Race Between Pattern Recognition Receptors in Plants and Effectors in Microbial Pathogens. *Science*, 324(5928), S.742–744.

- Brewbaker, J.L., 1967.** The Distribution and Phylogenetic Significance of Binucleate and Trinucleate Pollen Grains in the Angiosperms. *American Journal of Botany*, 54(9), S.1069–1083.
- Brylka, H., 2002.** Molekulare Charakterisierung eines kornspezifisch exprimierten Gens aus *Zea mays* L.. *Diplomarbeit*. Universität Hamburg.
- Buchert, E., 2007.** Funktionelle und biochemische Charakterisierung der ZmPTI1-Kinase-Familie aus Mais (*Zea mays* L.). *Diplomarbeit*. Universität Hamburg.
- Camehl, I., Drzewiecki, C., Vadassery, J., Shalhollari, B., Sherameti, I., Forzani, C., Munnik, T., Hirt, H., Oelmüller, R. 2011.** The OXI1 Kinase Pathway Mediates Piriformospora indica-Induced Growth Promotion in Arabidopsis. *PLoS Pathog*, 7(5), S.e1002051.
- Capron, A., Gourgues, M., Neiva, L.S., Foure, J.-E., Sundaresan, V. 2008.** Maternal Control of Male-Gamete Delivery in Arabidopsis Involves a Putative GPI-Anchored Protein Encoded by the LORELEI Gene. *The Plant Cell Online*, 20(11), S.3038–3049.
- Casson, S., Spencer, M. Walker, K., Lindsey, K. 2005.** Laser capture microdissection for the analysis of gene expression during embryogenesis of Arabidopsis. *The Plant Journal*, 42(1), S.111–123.
- Chee, M.S., Lawrence, G.L. & Barrell, B.G., 1989.** Alpha-, Beta- and Gammaherpesviruses Encode a Putative Phosphotransferase. *Journal of General Virology*, 70(5), S.1151–1160.
- Chehab, E.W., Patharkar, O.R., Hegeman, A.D., Taybi, T., Cushman, J.C. 2004.** Autophosphorylation and Subcellular Localization Dynamics of a Salt- and Water Deficit-Induced Calcium-Dependent Protein Kinase from Ice Plant. *Plant Physiology*, 135(3), S.1430–1446.
- Chen, Y.-H., Li, H.-J., Shi, D.-Q., Yuan, L., Liu, J., Grossniklaus, U., Yang, W.-C. 2007.** The Central Cell Plays a Critical Role in Pollen Tube Guidance in Arabidopsis. *The Plant Cell Online*, 19(11), S.3563–3577.
- Chomczynski, P. & Sacchi, N., 1987.** Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*, 162(1), S.156–159.
- Clough, S. & Bent, A., 1998.** Floral dip: a simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of Arabidopsis thaliana. *Plant J*, 16(6), S.735–43.
- Crawford, B.C.W., Ditta, G. & Yanofsky, M.F., 2007.** The NTT Gene Is Required for Transmitting-Tract Development in Carpels of Arabidopsis thaliana. *Current Biology*, 17(13), S.1101–1108.
- Crawford, B.C.W. & Yanofsky, M.F., 2008.** The Formation and Function of the Female Reproductive Tract in Flowering Plants. *Current Biology*, 18(20), S.R972–R978.
- Currie, R.A., Walker, K.S., Gray, A., Deak, M. Casamayor, A., Alessi, D.R., Lucocq, J. 1999.** Role of phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate in regulating the activity and localization of 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1. *Biochemical Journal*, 337(Pt 3), S.575–583.
- Devarenne, T.P., Ekengren, S.K., Pedley, K.F., Martin, G.B. 2006.** Adi3 is a Pdk1-interacting AGC kinase that negatively regulates plant cell death. *The EMBO Journal*, 25(1), S.255–265.

- Dickinson, H., 1995.** Dry stigmas, water and self-incompatibility in Brassica. *Sexual Plant Reproduction*, 8(1).
- Dickinson, H.G., Elleman, C. J. & Doughty, J., 2000.** Pollen coatings - chimaeric genetics and new functions. *Sexual Plant Reproduction*, 12(5), S.302–309.
- Dissanayake, K., Castillo, C., Takasaki, T., Nakanishi, T., Norioka, N., Norioka, S. 2004.** Molecular cloning, functional expression and characterization of two serine/threonine-specific protein kinases from *Nicotiana tabacum* pollen. *Sexual Plant Reproduction*, 17(4), S.165–175.
- Dolan, L., 2009.** Body building on land — morphological evolution of land plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 12(1), S.4–8.
- Dong, J., Kim, S.T. & Lord, E.M, 2005.** Plantacyanin Plays a Role in Reproduction in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 138(2), S.778–789.
- Dresselhaus, T. & Márton, M.L., 2009.** Micropylar pollen tube guidance and burst: adapted from defense mechanisms? *Current Opinion in Plant Biology*, 12(6), S.773–780.
- Drzewiecki, C., 2010.** Signaltransduktion in der Interaktion zwischen *Arabidopsis thaliana* und *Piriformospora indica*. *Dissertation*. Friedrich-Schiller-Universität Jena.
- Dumas, C., Knox, R.B. & Gaude, T., 1984.** Pollen—Pistil Recognition: New Concepts from Electron Microscopy and Cytochemistry. In *International Review of Cytology*. Academic Press, S. 239–272.
- Dunphy, J.T. & Linder, M.E., 1998.** Signalling functions of protein palmitoylation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1436(1–2), S.245–261.
- Durner, J. & Klessig, D.F., 1999.** Nitric oxide as a signal in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 2(5), S.369–374.
- Ek-Ramos, M.J., Avila, J., Cheng, C., Martin, G.B., Devarenne, T.P. 2010.** The T-loop Extension of the Tomato Protein Kinase AvrPto-dependent Pto-interacting Protein 3 (Adi3) Directs Nuclear Localization for Suppression of Plant Cell Death. *Journal of Biological Chemistry*, 285(23), S.17584 –17594.
- Elleman, 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 Phytologist*, 121(3), S.413–424.
- Elleman, Carole J. & Dickinson, H.G., 1990.** The Role of the Exine Coating in Pollen-Stigma Interactions in *Brassica oleracea* L. *New Phytologist*, 114(3), S.511–518.
- Emmett, R.W. & Parbery, D.G., 1975.** Appressoria. *Annu Rev Phytopathol*, S.147–165.
- Escobar-Restrepo, J.-M., Huck, N., Kessler, S., Gagliardini, V., Gheyselinck, J., Yang, W.-C., Grossniklaus, U. 2007.** The FERONIA Receptor-like Kinase Mediates Male-Female Interactions During Pollen Tube Reception. *Science*, 317(5838), S.656–660.
- Forzani, C., Carreri, A., de la Fuente van Bentern, S., Lecourieux, D., Lecourieux, F., Hirt, H. 2011.** The Arabidopsis protein kinase Pto-interacting 1-4 is a common target of the

- oxidative signal-inducible 1 and mitogen-activated protein kinases. *FEBS Journal*, 278(7), S.1126–1136.
- Galán, J.E. & Collmer, A., 1999.** Type III Secretion Machines: Bacterial Devices for Protein Delivery into Host Cells. *Science*, 284(5418), S.1322–1328.
- Galván-Ampudia, C.S. & Offringa, R., 2007.** Plant evolution: AGC kinases tell the auxin tale. *Trends in Plant Science*, 12(12), S.541–547.
- 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 Research*, 31(13), S.3784–3788.
- Hammond-Kosack, K.E. & Jones, J.D., 1996.** Resistance gene-dependent plant defense responses. *The Plant Cell*, 8(10), S.1773–1791.
- Hanks, S., Quinn, A. & Hunter, T., 1988.** The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science*, 241(4861), S.42–52.
- Hanks, S.K. & Quinn, A.M., 1991.** [2] Protein kinase catalytic domain sequence database: Identification of conserved features of primary structure and classification of family members. In *Protein Phosphorylation Part A: Protein Kinases: Assays, Purification, Antibodies, Functional Analysis, Cloning, and Expression*. Academic Press, S. 38–62.
- Hasenstein, K.H., Blancaflor, E.B. & Lee, J.S., 1999.** The microtubule cytoskeleton does not integrate auxin transport and gravitropism in maize roots. *Physiologia Plantarum*, 105(4), S.729–738.
- Hepler, P.K., Vidali, L. & Cheung, A.Y., 2001.** Polarized cell growth in higher plants. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 17(1), S.159–187.
- Herrmann, M.M., 2004.** Identifizierung und funktionelle Charakterisierung einer pollenspezifisch exprimierten Pti1-homologen Kinase aus *Zea mays* L. *Dissertation*. Universität Hamburg.
- Herrmann, M.M., Pinto, S., Kluth, J., Wienand, U., Lorbiecke, R. 2006.** The PTI1-like kinase ZmPti1a from maize (*Zea mays* L.) co-localizes with callose at the plasma membrane of pollen and facilitates a competitive advantage to the male gametophyte. *BMC Plant Biology*, 6, S.22.
- Heslop-Harrison, J., 1979.** An Interpretation of the Hydrodynamics of Pollen. *American Journal of Botany*, 66(6), S.737–743.
- Heslop-Harrison, J., 1987.** Pollen Germination and Pollen-Tube Growth. In *Pollen: Cytology and Development*. Academic Press, S. 1–78.
- Hill, J.P. & Lord, E. M., 1986.** Dynamics of Pollen Tube Growth in the Wild Radish, *Raphanus raphanistrum* (Brassicaceae). I. Order of Fertilization. *Evolution*, 40(6), S.1328–1333.
- Honys, D. & Twell, D., 2004.** Transcriptome analysis of haploid male gametophyte development in *Arabidopsis*. *Genome Biology*, 5(11), S.R85.

- Ischebeck, T., Stenzel, I. & Heilmann, I., 2008.** Type B Phosphatidylinositol-4-Phosphate 5-Kinases Mediate Arabidopsis and Nicotiana tabacum Pollen Tube Growth by Regulating Apical Pectin Secretion. *The Plant Cell Online*, 20(12), S.3312–3330.
- Johnson, J.L., Erickson, J.W. & Cerione, R.A., 2012.** C-terminal Di-arginine Motif of Cdc42 Protein Is Essential for Binding to Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphate-containing Membranes and Inducing Cellular Transformation. *Journal of Biological Chemistry*, 287(8), S.5764–5774.
- Jones, J.D.G. & Dangl, J.L., 2006.** The plant immune system. *Nature*, 444(7117), S.323–329.
- Joos, U., Aken, J. & Kristen, U., 1994.** Microtubules are involved in maintaining the cellular polarity in pollen tubes of Nicotiana sylvestris. *Protoplasma*, 179(1-2), S.5–15.
- Kandasamy, M.K., Nasrallah, J.B. & Nasrallah, M.E., 1994.** Pollen-pistil interactions and developmental regulation of pollen tube growth in Arabidopsis. *Development*, 120(12), S.3405–3418.
- Kerhoas, C., Gay, G. & Dumas, C., 1987.** A multidisciplinary approach to the study of the plasma membrane of Zea mays pollen during controlled dehydration. *Planta*, 171(1), S.1–10.
- Kim, S., Mollet, J.-C., Dong, J., Zhang, K., Park, S.-Y., Lord, E.M. 2003.** Chemocyanin, a small basic protein from the lily stigma, induces pollen tube chemotropism. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(26), S.16125–16130.
- Kim, Y.J., Lin, N.-C. & Martin, G.B., 2002.** Two Distinct Pseudomonas Effector Proteins Interact with the Pto Kinase and Activate Plant Immunity. *Cell*, 109(5), S.589–598.
- Kluth, A., Sprunck, S., Becker, D., Lörz, H., Lütticke, S. 2002.** 5' deletion of a gbss1 promoter region from wheat leads to changes in tissue and developmental specificities. *Plant Molecular Biology*, 49(6), S.669–682.
- Kluth, J., 2004.** Molekulare Untersuchungen zum Einfluss der ZmPti1-Kinase auf die Pollenentwicklung bei Zea mays (L.). *Diplomarbeit*. Universität Hamburg.
- Knox, R.B. & Heslop-Harrison, J., 1970.** Pollen-Wall Proteins: Localization and Enzymic Activity. *Journal of Cell Science*, 6(1), S.1–27.
- Kong, Z., Xu, W., Li, Q., Xue, Y. 2007.** Identification, Expression and Functional Analysis of a Receptor-like Cytoplasmic Kinase, OsRLCK1, in Rice. *Journal of Integrative Plant Biology*, 49(6), S.898–907.
- 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. *The Journal of Cell Biology*, 145(2), S.317–330.
- Larebeke, N.V., Engler, G., Holsters, M., Den Elzacker, S., Zaenen, I., Schilperoort, R.A., Schell, J. 1974.** Large plasmid in Agrobacterium tumefaciens essential for crown gall-inducing ability. *Nature*, 252(5479), S.169–170.
- Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., Higgins, D.G. 2007.** Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 23(21), S.2947–2948.

- Le, B.H., Cheng, C., Bui, A.Q., Wagmaister, J.A., Henry, K.F., Goldberg, R.B. 2010.** Global analysis of gene activity during Arabidopsis seed development and identification of seed-specific transcription factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(18), S.8063–8070.
- Lennon, K. A. & Lord, E. M., 2000.** In vivo pollen tube cell of Arabidopsis thaliana I. Tube cell cytoplasm and wall. *Protoplasma*, 214(1-2), S.45–56.
- Lennon, K.A. Roy, S., Hepler, P.K., Lord, E.M. 1998.** The structure of the transmitting tissue of Arabidopsis thaliana (L.) and the path of pollen tube growth. *Sexual Plant Reproduction*, 11(1), S.49–59.
- 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. *The Plant Cell*, 11(9), S.1731–1742.
- Lim, M.A., Kikani, C.K., Wick, M.J., Dong, L.Q. 2003.** Nuclear translocation of 3'-phosphoinositide-dependent protein kinase 1 (PDK-1): A potential regulatory mechanism for PDK-1 function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(24), S.14006–14011.
- Lin, J.-J. & Dickinson, D.B., 1984.** Ability of Pollen to Germinate prior to Anthesis and Effect of Desiccation on Germination. *Plant Physiology*, 74(3), S.746–748.
- Linnemann, L.C., 2011.** Klonierung, heterologe Expression, Aufreinigung und Lokalisation der AGC-Kinasen AGC1-5 und AGC1-7 an Arabidopsis thaliana (L.) Heynh. *Bachelorarbeit*. Universität Hamburg.
- Loh, Y.T. & Martin, G B, 1995.** The disease-resistance gene Pto and the fenthion-sensitivity gene fen encode closely related functional protein kinases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(10), S.4181–4184.
- Lord, E., 2000.** Adhesion and cell movement during pollination: cherchez la femme. *Trends in Plant Science*, 5(9), S.368–373.
- Mäkinen, Y. & Brewbaker, J.L., 1967.** Isoenzyme Polymorphism in Flowering Plants I. Diffusion of Enzymes Out of Intact Pollen Grains. *Physiologia Plantarum*, 20(2), S.477–482.
- Martin, G. B., Brommonschenkel, S., Chungwongse, J., Frary, A., Tanksley, S.1993.** Map-based cloning of a protein kinase gene conferring disease resistance in tomato. *Science*, 262(5138), S.1432–1436.
- Mascarenhas, J.P., 1989.** The Male Gametophyte of Flowering Plants. *The Plant Cell*, 1(7), S.657–664.
- Mascarenhas, J.P., 1990.** Gene Activity During Pollen Development. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 41(1), S.317–338.
- Mascarenhas, J.P., 1993.** Molecular Mechanisms of Pollen Tube Growth and Differentiation. *The Plant Cell*, 5(10), S.1303.
- Matsui, H., Yamazaki, M., Kishi-Kaboshi, M., Takahashi, A., Hirochika, H. 2010a.** AGC Kinase OsOxi1 Positively Regulates Basal Resistance through Suppression of OsPti1a-Mediated Negative Regulation. *Plant and Cell Physiology*, 51(10), S.1731–1744.

- Matsui, H., Miyao, A., Takahashi, A., Hirochika, H. 2010b.** Pdk1 Kinase Regulates Basal Disease Resistance Through the OsOxi1–OsPti1a Phosphorylation Cascade in Rice. *Plant and Cell Physiology*, 51(12), S.2082–2091.
- McCormick, S., 2004.** Control of male gametophyte development. *The Plant Cell*, 16(Suppl), S.S142–S153.
- McGinnis, S. & Madden, T.L., 2004.** BLAST: at the core of a powerful and diverse set of sequence analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 32, S.W20–W25.
- Miyazaki, S., Murata, T., Sakurai-Ozato, N., Kubo, M., Demura, T., Fukuda, H., Hasebe, M. 2009.** ANXUR1 and 2, Sister Genes to FERONIA/SIRENE, Are Male Factors for Coordinated Fertilization. *Current Biology*, 19(15), S.1327–1331.
- Mora, A., Komander, D., van Aalten, D.M.F., Alessi, D.R. 2004.** PDK1, the master regulator of AGC kinase signal transduction. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 15(2), S.161–170.
- Mucyn, T.S., Clemente, A., Andriotis, V.M.E., Balmuth, A.L., Oldroyd, G.E.D., Staskawicz, B.J., Rathjen, J.P. 2006.** The Tomato NBARC-LRR Protein Prf Interacts with Pto Kinase in Vivo to Regulate Specific Plant Immunity. *The Plant Cell Online*, 18(10), S.2792–2806.
- Mur, L.A.J., Kenton, P., Lloyd, A.J., Ougham, H., Prats, E. 2008.** The hypersensitive response; the centenary is upon us but how much do we know? *Journal of Experimental Botany*, 59(3), S.501–520.
- Nicholas, K. & Nicholas, H., 1997.** GeneDoc: a Tool for Editing and Annotating Multiple Sequence Alignments. <http://www.psc.deu/biomed/genedoc>.
- Nowak, M.A., Boerlijst, M.C., Cooke, J., Smith, J.M. 1997.** Evolution of genetic redundancy. *Nature*, 388(6638), S.167–171.
- Okuda, S., Tsutsui, H., Shiina, K., Sprunck, S., Takeuchi, H., Yui, R., Higashiyama, T. 2009.** Defensin-like polypeptide LUREs are pollen tube attractants secreted from synergid cells. *Nature*, 458(7236), S.357–361.
- Page, R.D.M., 1996.** Tree View: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer applications in the biosciences: CABIOS*, 12(4), S.357–358.
- Palanivelu, R., Brass, L., Edlund, A.F., Preuss, D. 2003.** Pollen Tube Growth and Guidance Is Regulated by POP2, an Arabidopsis Gene that Controls GABA Levels. *Cell*, 114(1), S.47–59.
- Pedley, K.F. & Martin, G.B., 2003.** Molecular Basis of Pto-Mediated Resistance to Bacterial Speck Disease in Tomato. *Annual Review of Phytopathology*, 41(1), S.215–243.
- Petersen, L.N., Ingle, R.A., Knight, M.R., Denby, K.J. 2009.** OXI1 protein kinase is required for plant immunity against *Pseudomonas syringae* in Arabidopsis. *Journal of Experimental Botany*.
- Pinto, S., 2005.** Cloning, molecular characterization and subcellular localization of new ZmPTI1-related protein kinases from *Zea mays* (L.). *Diplomarbeit*. Universität Hamburg.
- Prado, A.M., Colaco, R., Moreno, N., Silva, A.C., Feijó, J.A. 2008.** Targeting of Pollen Tubes to Ovules Is Dependent on Nitric Oxide (NO) Signaling. *Molecular Plant*, 1(4), S.703–714.

- Preuss, D., Rhee, S. & Davis, R., 1994.** Tetrad analysis possible in Arabidopsis with mutation of the QUARTET (QRT) genes. *Science*, 264(5164), S.1458 –1460.
- Punwani, J.A., Rabiger, D.S. & Drews, G.N., 2007.** MYB98 Positively Regulates a Battery of Synergid-Expressed Genes Encoding Filiform Apparatus-Localized Proteins. *The Plant Cell Online*, 19(8), S.2557–2568.
- Pusunc, S., 2007.** Molekulare Analyse PTI-ähnlicher Kinasen von Zea mays (L.) und Arabidopsis thaliana (L.) Heynh. *Diplomarbeit*. Universität Hamburg.
- Qin, Y., Leydon, A.R., Pandey, R., Mount, D., Denic, S., Vasic, B., Palanivelu, R. 2009.** Penetration of the Stigma and Style Elicits a Novel Transcriptome in Pollen Tubes, Pointing to Genes Critical for Growth in a Pistil. *PLoS Genet*, 5(8), S.e1000621.
- 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(12), S.3232–3240.
- Raudaskoski, M., Aström, H. & Laitinen, E., 2001.** Pollen Tube Cytoskeleton: Structure and Function. *Journal of Plant Growth Regulation*, 20(2), S.113–130.
- Rehders, T., 2010.** Molekulare Analysen zur Expression, Funktion und Lokalisation der Serin/Threonin-Kinase ZmPTI1e aus Zea Mays L. *Bachelorarbeit*. Universität Hamburg.
- Rentel, M.C., Lecourieux, D., Quaked, F., Usher, S.L., Petersen, L., Knight, M.R. 2004.** OX11 kinase is necessary for oxidative burst-mediated signalling in Arabidopsis. *Nature*, 427(6977), S.858–861.
- Rose, M., 2004.** Klonierung und Charakterisierung einer Pto-homologen Kinase aus Zea mays L. *Diplomarbeit*. Universität Hamburg.
- Rosso, M.G., Li, Y., Strizhov, N., Reiss, B., Dekker, K., Weisshaar, B. 2003.** An Arabidopsis thaliana T-DNA mutagenized population (GABI-Kat) for flanking sequence tag-based reverse genetics. *Plant Molecular Biology*, 53(1-2), S.247–259.
- Salmeron, J.M., Oldroyd, G.E.D., Rommens, C.M.T., Scofield, S.R., Staskawicz, B.J. 1996.** Tomato Prf Is a Member of the Leucine-Rich Repeat Class of Plant Disease Resistance Genes and Lies Embedded within the Pto Kinase Gene Cluster. *Cell*, 86(1), S.123–133.
- Salomon, D., Bonshtien, A., Mayrose, M., Zhang, C., Shokat, K.M., Sessa, G. 2009.** Bypassing Kinase Activity of the Tomato Pto Resistance Protein with Small Molecule Ligands. *Journal of Biological Chemistry*, 284(22), S.15289 –15298.
- Sambrook, F., Fritsch, E. & Maniatis, T., 1989.** *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 2nd edn., New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Samson, F., Brunaud, V., Balzergue, S., Dubreucq, S., Lepiniec, L., Lecharny, A. 2002.** FLAGdb/FST: a database of mapped flanking insertion sites (FSTs) of Arabidopsis thaliana T-DNA transformants. *Nucleic Acids Research*, 30(1), S.94 –97.
- Scheid, M.P., Parsons, M. & Woodgett, J.R., 2005.** Phosphoinositide-Dependent Phosphorylation of PDK1 Regulates Nuclear Translocation. *Molecular and Cellular Biology*, 25(6), S.2347–2363.

- Schmid, M., Davison, T.S., Henz, S.R., Pape, U.J., Demar, M., Weigel, D., Lohmann, J.U. 2005.** A gene expression map of Arabidopsis thaliana development. *Nature Genetics*, 37(5), S.501–506.
- Schmidt, A., 2009.** Expressions- und Lokalisationsanalysen von zwei Mitgliedern der PTI1-Kinasefamilie von Arabidopsis thaliana (L.) HEYNH. mit Hilfe der Reportergene GFP und GUS. *Bachelorarbeit*. Universität Hamburg.
- Sessa, G & Martin, G B, 2000.** Signal recognition and transduction mediated by the tomato Pto kinase: a paradigm of innate immunity in plants. *Microbes and Infection / Institut Pasteur*, 2(13), S.1591–1597.
- 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. *European Journal of Biochemistry*, 267(1), S.171–178.
- Sessa, G., D’Ascenzo, M. & Martin, G.B, 2000.** Thr38 and Ser198 are Pto autophosphorylation sites required for the AvrPto-Pto-mediated hypersensitive response. *EMBO J*, 19(10), S.2257–2269.
- Sessions, A., Burke, E., Presting, G., Aux, G., McElver, J., Goff, S.A. 2002.** A High-Throughput Arabidopsis Reverse Genetics System. *The Plant Cell Online*, 14(12), S.2985–2994.
- Shimizu, K.K. & Okada, K., 2000.** Attractive and repulsive interactions between female and male gametophytes in Arabidopsis pollen tube guidance. *Development*, 127(20), S.4511–4518.
- Sobko, A., 2006.** Systems Biology of AGC Kinases in Fungi. *Sci. STKE*, 2006(352), S.re9.
- Stanghellini, M.E. & Aragati, M., 1966.** Relation of periderm formation and callose deposition to anthracnose resistance in papaya fruit. *Phytopathol*, (56), S.444–450.
- Staswick, P., 2000.** Two expressed soybean genes with high sequence identity to tomato Pti1 kinase lack autophosphorylation activity. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 383(2), S.233–237.
- Steer, M.W. & Steer, J.M., 1989.** Tansley Review No. 16. Pollen Tube Tip Growth. *New Phytologist*, 111(3), S.323–358.
- Stothard, P., 2000.** The Sequence Manipulation Suite: JavaScript Programs for Analyzing and Formatting Protein and DNA Sequences. *BioTechniques*, 28(6), S.1102–1111.
- Swanson, R., Edlund, A.F. & Preuss, D., 2004.** SPECIES SPECIFICITY IN POLLEN-PISTIL INTERACTIONS. *Annual Review of Genetics*, 38(1), S.793–818.
- Swanson, S. & Gilroy, S., 2010.** ROS in plant development. *Physiologia Plantarum*, 138(4), S.384–392.
- Swarbreck, D., Wilks, C., Lamesch, P., Berardini, T.Z., Huala, E. 2007.** The Arabidopsis Information Resource (TAIR): gene structure and function annotation. *Nucleic Acids Research*, 36, S.D1009–D1014.
- Takahashi, A., Agrawal, G.K., Yamazaki, M., Onosato, K., Miyao, A., Hirochika, H. 2007.** Rice Pti1a negatively regulates RAR1-dependent defense responses. *The Plant Cell*, 19(9), S.2940–2951.

- Tang, H., Bowers, J.E., Wang, X., Ming, R., Alam, M., Paterson, A.H. 2008.** Synteny and Collinearity in Plant Genomes. *Science*, 320(5875), S.486–488.
- Thitamadee, S., Tsuchihara, K. & Hashimoto, T., 2002.** Microtubule basis for left-handed helical growth in Arabidopsis. *Nature*, 417(6885), S.193–196.
- Tian, A., 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. *Journal of Experimental Botany*, 55(396), S.535–537.
- Trofimova, M., Sprenkle, A.B., Green, M., Sturgill, T.W., Goebel, M.G., Harrington, M.A. 1996.** Developmental and Tissue-specific Expression of Mouse Pelle-like Protein Kinase. *Journal of Biological Chemistry*, 271(30), S.17609–17612.
- Twell, D., Wing, R., Yamaguchi, J., McCormick, S. 1989.** Isolation and expression of an anther-specific gene from tomato. *MGG Molecular & General Genetics*, 217, S.240–245.
- Twell, D., Yamaguchi, J. & McCormick, S., 1990.** Pollen-specific gene expression in transgenic plants: coordinate regulation of two different tomato gene promoters during microsporogenesis. *Development*, 109(3), S.705–713.
- Vejlupkova, Z. & Fowler, J., 2003.** Maize DNA preps for undergraduate students: a robust method for PCR genotyping. , MNL MaizeGDB Newsletter(77).
- Vries, J.S., Andriotis, V.M.E., Wu, A.-J., Rathjen, J.P. 2006.** Tomato Pto encodes a functional N-myristoylation motif that is required for signal transduction in Nicotiana benthamiana. *The Plant Journal*, 45(1), S.31–45.
- Winter, D., Vinegar, B., Nahal, H., Ammar, R., Wilson, G.V., Provart, N.J. 2007.** An “Electronic Fluorescent Pictograph” Browser for Exploring and Analyzing Large-Scale Biological Data Sets. *PLoS ONE*, 2(8), S.e718.
- Wittfoth, A.K.J., 2009.** Reportergenstudien zum Nachweis der Expression und Lokalisation von zwei Mitgliedern der PTI1-Proteinkinasefamilie aus Arabidopsis thaliana (L.) HEYNH. *Bachelorarbeit*. Universität Hamburg.
- Wu, A.-J., Andriotis, V.M.E., Durrant, M.C., Rathjen, J.P. 2004.** A Patch of Surface-Exposed Residues Mediates Negative Regulation of Immune Signaling by Tomato Pto Kinase. *The Plant Cell Online*, 16(10), S.2809–2821.
- Wu, Y., Yan, J., Zhang, R., Qu, X., Ren, S., Chen, N., Huang, S. 2010.** Arabidopsis FIMBRIN5, an Actin Bundling Factor, Is Required for Pollen Germination and Pollen Tube Growth. *The Plant Cell Online*, 22(11), S.3745–3763.
- Xing, W., Zou, Y., Liu, Q., Liu, J., Luo, X., Huang, Q., Chen, S., Zhu, L., Bi, R., Hao, Q., Chai, J. 2007.** The structural basis for activation of plant immunity by bacterial effector protein AvrPto. *Nature*, 449(7159), S.243–247.
- Zegzouti, H., Anthony, R.G., Jahchan, N., Bögre, L., Christensen, S.K. 2006a.** Phosphorylation and activation of PINOID by the phospholipid signaling kinase 3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1 (PDK1) in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(16), S.6404–6409.

- Zegzouti, H., Li, W., Lorenz, T.C., Xie, M., Payne, C.T., Smith, K., Christensen, S.K. 2006b.** Structural and Functional Insights into the Regulation of Arabidopsis AGC VIIIa Kinases. *Journal of Biological Chemistry*, 281(46), S.35520–35530.
- Zhang, F.L. & Casey, P.J., 1996.** Protein prenylation: molecular mechanisms and functional consequences. *Annual Review of Biochemistry*, 65, S.241–269.
- Zhang, P., 2003.** Evolution by gene duplication: an update. *Trends in Ecology & Evolution*, 18(6), S.292–298.
- Zhang, Y., He, J. & McCormick, S., 2009.** Two Arabidopsis AGC kinases are critical for the polarized growth of pollen tubes. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, 58(3), S.474–484.
- Zhang, Y. & McCormick, S., 2009.** AGCVIII kinases: at the crossroads of cellular signaling. *Trends in Plant Science*, 14(12), S.689–695.
- Zhou, J., 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. *Cell*, 83(6), S.925–935.
- Zhou, J., 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 genes. *EMBO J*, 16(11), S.3207–3218.
- Zinkl, G.M., Zwiebel, B.I., Grier, D.G., Preuss, D. 1999.** Pollen-stigma adhesion in Arabidopsis: a species-specific interaction mediated by lipophilic molecules in the pollen exine. *Development*, 126(23), S.5431–5440.
- Zou, H., Wu, Z., Yang, Q., Zhang, Y., Cao, M., Jia, W., Huang, C., Xiao, X. 2006.** Gene expression analyses of ZmPti1, encoding a maize Pti-like kinase, suggest a role in stress signaling. *Plant Science*, 171(1), S.99–105.

# Anhang

## A1. Primer

**Tabelle A 1-1: Liste der verwendeten Primer zur Klonierung von Promotor-GUS-Konstrukten.**  
Restriktionsschnittstellen sind in den Sequenzen unterstrichen.

Nr.	Name	Sequenz	Schnittstelle
KS1	PTI1-1-Promotor 5'	AT <u>ACTGCAGT</u> GCTATCACACTTAGCATGAC	<i>PstI</i>
KS2	PTI1-1-Promotor 3'	ATA <u>ACTAGT</u> CCTTGTTACTTGTTCAATAT	<i>SpeI</i>
KS3	PTI1-2-Promotor 5'	AT <u>ACTGCAGC</u> GTCTTCCCCGCGGTTTGCCCATC	<i>PstI</i>
KS4	PTI1-2-Promotor 3'	ATA <u>ACTAGT</u> CCTTGTTCTCTCTTTCAAAT	<i>SpeI</i>
KS5	PTI1-3-Promotor 5'	AT <u>ACTGCAGG</u> TGTGCGGTATTTGTTTCACC	<i>PstI</i>
KS6	PTI1-3-Promotor 3'	ATA <u>ACTAGT</u> AGTGAAAGACGGATCGAATA	<i>SpeI</i>
KS7	PTI1-4-Promotor 5'	AT <u>ACTGCAGG</u> GGTCAACCTTTCGGTCCATG	<i>PstI</i>
KS8	PTI1-4-Promotor 3'	ATA <u>ACTAGT</u> TTTTCTTTAAAGAATCAAATTGG	<i>SpeI</i>
KS9	PTI1-5-Promotor 5'	AT <u>ACTGCAGT</u> GCCTGAAGGAAGGCGAAAGG	<i>PstI</i>
KS10	PTI1-5-Promotor 3'	ATA <u>ACTAGT</u> CAGAAATCAGAATGCAATTTAG	<i>SpeI</i>
KS11	PTI1-6-Promotor 5'	AT <u>ACTGCAGC</u> GGATGATGTACATAACAGCC	<i>PstI</i>
KS12	PTI1-6-Promotor 3'	ATA <u>ACTAGT</u> TATCTTCAGATCTTTTGCCAACACG	<i>SpeI</i>
KS13	PTI1-7-Promotor 5'	AT <u>ACTGCAGG</u> TCAAAAGATAGATACTCGC	<i>PstI</i>
KS14	PTI1-7-Promotor 3'	ATA <u>ACTAGT</u> TACGCTTCTCTCACACGA	<i>SpeI</i>
KS15	PTI1-8-Promotor 5'	AT <u>ACTGCAGC</u> TGTAATTCTAAAACAATGTTAGG	<i>PstI</i>
KS16	PTI1-8-Promotor 3'	ATA <u>ACTAGT</u> TACACCCTTCTCTCACACGAGC	<i>SpeI</i>
KS17	PTI1-9-Promotor 5'	AT <u>ACTGCAGG</u> GAGGGAAAACAGTGCTCTTCTTGTC	<i>PstI</i>
KS18	PTI1-9-Promotor 3'	ATA <u>ACTAGT</u> TGAATCTCTGTATCTGTAGCATTC	<i>SpeI</i>
KS85	LAT52-Promotor 5'	ATA <u>ACTAGT</u> CCTATACCCCTTGGATAAGG	<i>SpeI</i>
KS86	LAT52-Promotor 3'	AT <u>AGGATC</u> CTTGATTATAATGAAATAGCC	<i>BamHI</i>

**Tabelle A 1-2: Liste der verwendeten Primer zur Klonierung von GFP-Fusionskonstrukten.**  
Restriktionsschnittstellen sind in den Sequenzen unterstrichen.

Nr.	Name	Sequenz	Schnittstelle
KS19	PTI1-1 GFP UTR 5'	AAT <u>GATCAG</u> TCTATATTGAACAAGTAAACAAGG	<i>BclI</i>
KS20	PTI1-1 GFP UTR 3'	CTATGTAGATTCTTTCTGATAGTTG	-
KS21	PTI1-1 GFP ORF 3'	TC <u>GATCAG</u> ATTCTGGTGCTGGAGCTGCT	<i>BclI</i>
KS22	PTI1-2 GFP UTR 5'	CC <u>GGATCC</u> ATCTATATTGAAAGAAGAGAACAA	<i>BamHI</i>
KS23	PTI1-2 GFP UTR 3'	TATTGCACGAAGAAGATGGCTGGTA	-
KS24	PTI1-2 GFP ORF 3'	AT <u>GGATCC</u> GATTCCGGTACTGGGGCTGGG	<i>BamHI</i>
KS25	PTI1-3 GFP ORF 5'	CC <u>AGATCT</u> ATGTATCCGATGGATTCTGATTACC	<i>BglII</i>
KS26	PTI1-3 GFP ORF 3'	TC <u>AGATCT</u> GCTTCTGGACTGGTACAGCT	<i>BglII</i>
KS27	PTI1-4 GFP UTR 5'	AT <u>AGATCT</u> CTCTCTAATAATTCTCCAGAACA	<i>BglII</i>
KS28	PTI1-4 GFP UTR 3'	GTATGATTCTGGTTAATTGTGAATT	-
KS29	PTI1-4 GFP ORF 3'	TT <u>AGATCT</u> GCTACTCCTCCCTGGAGCT	<i>BglII</i>
KS30	PTI1-5 GFP ORF 5'	TG <u>AGATCT</u> ATGGATCGTGATTTTCATCGTCGTG	<i>BglII</i>
KS31	PTI1-5 GFP ORF 3'	AC <u>AGATCT</u> GGTTGAGGTGTTGGAGGAGCA	<i>BglII</i>
KS32	PTI1-6 GFP ORF 5'	GT <u>GGATCC</u> ATGTTTTGTTGCGGTGGTGC GGATG	<i>BamHI</i>
KS33	PTI1-6 GFP ORF 3'	AT <u>GGATCC</u> GACGTAGACTCAGGACCGGCC	<i>BamHI</i>
KS34	PTI1-7 GFP UTR 5'	A <u>AGGATCC</u> TGGAAGAGTTTCGTGTGAGAGAGAA	<i>BamHI</i>
KS35	PTI1-7 GFP UTR 3'	ATCATAAAGGGTGATATCAGACTAG	-
KS36	PTI1-7 GFP ORF 3'	TT <u>GGATCC</u> GCCGGGTTCTGTGTGGAGTC	<i>BamHI</i>
KS37	PTI1-8 GFP UTR 5'	G <u>AGGATCC</u> AAGTTTAGTTAGCTCGTGTGAGAGA	<i>BamHI</i>
KS38	PTI1-8 GFP UTR 3'	TCATGATCAGAAGATGAGATATGGG	-
KS39	PTI1-8 GFP ORF 5'	G <u>AGGATCC</u> ATGAGCTGTTTTGTTGGTGTGGGA	<i>BamHI</i>
KS40	PTI1-8 GFP ORF 3'	TT <u>GGATCC</u> GCGGGGTTCTATGTGGAGTC	<i>BamHI</i>
KS41	PTI1-9 GFP UTR 5'	G <u>CGGATCC</u> GGATCAGTATACAGAGATTCAATGAG	<i>BamHI</i>
KS42	PTI1-9 GFP UTR 3'	GTTCCAATGTCAGAATTCTATGAAC	-
KS43	PTI1-9 GFP ORF 3'	TT <u>GGATCC</u> GGTGCTCCTTCTCCTGCAGGT	<i>BamHI</i>
KS44	AGC1-5 GFP ORF 5'	AT <u>AGATCT</u> ATGGACTTAGCTTCTAAGAAG	<i>BglII</i>
KS45	AGC1-5 GFP ORF 3'	AT <u>AGATCT</u> AAAAAGTACTCGAAATCTATATACGC	<i>BglII</i>
KS46	AGC1-7 GFP ORF 5'	T <u>ACTCGAG</u> ATGTTAACGAAGCCCGAAAGAAGCT	<i>XhoI</i>
KS47	AGC1-7 GFP ORF 3'	AT <u>TCTCGA</u> AAAGTATTCAAAGTCAATGTAATCAGG	<i>XhoI</i>
KS48	PDK1.2 GFP ORF 5'	TT <u>GGATCC</u> ATGTTGACAATGGACAAGGAATTTG	<i>BamHI</i>
KS49	PDK1.2 GFP ORF 3'	AT <u>GGATCC</u> CGGTTTTGAAGAGTTTCGATTGC	<i>BamHI</i>

**Tabelle A 1-3: Liste der verwendeten Primer zur Klonierung von *E. coli* Expressionsvektoren.**  
Restriktionsschnittstellen sind in den Sequenzen unterstrichen.

Nr.	Name	Sequenz	Schnittstelle
KS50	PTI1-1 RBS HIS ORF 5'	TTCCCC <u>ACTAGT</u> AATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGA GATATACATATGCGTAAGTGGATCTGTTG	<i>SpeI</i>
KS51	PTI1-1 HIS ORF 3'	AT <u>CTCGAG</u> AGATTCTGGTGCTGGAGCTGCTGC	<i>XhoI</i>
KS52	PTI1-2 HIS ORF 5'	GTCATATGCGTAGGTGGATCTGTTGTGG	<i>NdeI</i>
KS53	PTI1-2 HIS ORF 3'	AT <u>CTCGAG</u> GGATTCCGGTACTGGGGCTGGG	<i>XhoI</i>
KS54	PTI1-3 HIS ORF 5'	AT <u>CATATG</u> TATCCGATGGATTCTGATTACC	<i>NdeI</i>
KS55	PTI1-3 HIS ORF 3'	AT <u>GCGGCCG</u> CGGCTTCTGGACTGGTACAGCT	<i>NotI</i>
KS56	PTI1-5 HIS ORF 5'	GTCATATG <u>GATCGT</u> GATTTTCATCGTCGTG	<i>NdeI</i>
KS57	PTI1-5 HIS ORF 3'	AT <u>CTCGAG</u> AGGTTGAGGTGTTGGAGGAGCAGC	<i>XhoI</i>
KS58	PTI1-6 RBS HIS ORF 5'	TTCCCC <u>TCTAGA</u> AATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGA GATATACATATGTTTTGTTGCGGTGGTGCGG	<i>XbaI</i>
KS59	PTI1-6 HIS ORF 3'	AT <u>GCGGCCG</u> CGGACGTAGACTCAGGACCGG	<i>NotI</i>
KS60	AGC1-5 HIS ORF 5'	AT <u>CATATG</u> GACTTAGCTTCTAAGAAGAAC	<i>NdeI</i>
KS61	AGC1-5 HIS ORF 3'	AT <u>CTCGAG</u> AAAGTACTCGAAATCTATATACG	<i>XhoI</i>
KS62	AGC1-7 HIS ORF 5'	AT <u>CATATG</u> TTAACGAAGCCCGAAAGAAGC	<i>NdeI</i>
KS63	AGC1-7 HIS ORF 3'	AT <u>GCGGCCG</u> CAAAGTATTCAAAGTCAATGTAATC	<i>NotI</i>
KS64	OXI1 HIS ORF 5'	GTCATATGCTAGAGGGAGATGAGAAACAGA	<i>NdeI</i>
KS65	OXI1 HIS ORF 3'	AT <u>GCGGCCG</u> CAAATACCAAAAAATTGTTATCACTTTC	<i>NotI</i>
KS66	PDK1.2 RBS HIS ORF 5'	TTCCCC <u>GCTAGC</u> AATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGA GATATACATATGTTGACAATGGACAAGGA	<i>NheI</i>
KS67	PDK1.2 HIS GST ORF 3'	AT <u>CTCGAG</u> TCAGTCGACACGGTTTTGAAGAGTTTCGA	<i>Sall</i> & <i>XhoI</i>
KS68	AGC1-5 GST ORF 5'	AT <u>TCTAGA</u> AATGGACTTAGCTTCTAAGAAG	<i>XbaI</i>
KS69	AGC1-5 GST ORF 3'	AT <u>CTCGAG</u> CTAAAAGTACTCGAAATCTATATACGCC	<i>XhoI</i>
KS70	AGC1-7 GST ORF 5'	AT <u>ACTAGT</u> TATGTTAACGAAGCCCGGAAAG	<i>SpeI</i>
KS71	AGC1-7 GST ORF 3'	AT <u>CTCGAG</u> CTAAAAGTATTCAAAGTCAATGTAATCAGG	<i>XhoI</i>
KS72	PDK1.2 GST ORF 5'	ATACTAGTATGTTGACAATGGACAAGGA	<i>SpeI</i>
KS83	pet41b GST 5'	ATACTAGT <u>T</u> AATAATCCGCGGGTCTGGTGCCACG	<i>SpeI</i>
KS84	pet41b GST 3'	GCAAGCTTGTGCGACGGAGCTCG	<i>HindIII</i>

**Tabelle A 1-4: Liste der verwendeten Primer zur Klonierung von Kinasedefizienten Mutanten.**  
Restriktionsschnittstellen sind in den Sequenzen unterstrichen.

Nr.	Name	Sequenz	Schnittstelle
KS73	PTI1-1 <sup>K96N</sup> MID 3'	<u>CAAGCTT</u> GTTTCAGAGCAACCGCCACACC	<i>HindIII</i>
KS74	PTI1-1 <sup>K96N</sup> MID 5'	CTGAACA <u>AGCTT</u> GATGTGCGCACCTGAAGC	<i>HindIII</i>
KS75	PTI1-2 <sup>K99N</sup> MID 3'	TGCAACATCGAGTTT <u>GTTCAAAGCAACTGCT</u>	-
KS76	PTI1-2 <sup>K99N</sup> MID 5'	AGCAGTTGCTTTGAACAAACTCGATGTTGCA	-
KS77	PTI1-3 <sup>K141N</sup> MID 3'	CTGCATTGTCA <u>AGCTT</u> GTTCCACGCGACAGC	<i>HindIII</i>
KS78	AGC1-5 <sup>K214R</sup> MID 3'	GGCCTTATCCATCACTCTCATTGCAAAAACCGC	-
KS79	AGC1-5 <sup>K214R</sup> MID 5'	GCGGTTTTTGCAATGAGAGTGATGGATAAGGCC	-
KS80	AGC1-7 <sup>K175R</sup> MID 3'	AGCCTTGCCATCACTCTCATGGCGAAATAGGTG	-
KS81	AGC1-7 <sup>K175R</sup> MID 5'	CACCTATTTGCCATGAGAGTGATGGACAAGGCT	-
KS82	OXI1 <sup>K45R</sup> MID 3'	TC <u>CTTAAGTATAACTCTTAAAGCAAGCAATTTAG</u>	<i>AflIII</i>

**Tabelle A 1-5: Liste der verwendeten Primer zur semi-quantitativen RT-PCR.**

Nr.	Name	Sequenz	Schnittstelle
KS87	PTI1-1 3'UTR 5'	GCAGCAGCTCCAGCACCAGAATC	-
KS88	PTI1-1 3'UTR 3'	CACTCAGCAAACGGCAACAATAAACTT	-
KS89	PTI1-3 3'UTR 5'	GTTACCACGCACCAGAGTATGCG	-
KS90	PTI1-3 3'UTR 3'	CATATTGCACACACAATGCTGCTA	-
KS91	PTI1-5 3'UTR 5'	GCTGCTCCTCCAACACCTCAACC	-
KS92	PTI1-5 3'UTR 3'	GTGTCAGCTTATATGTTCAAACG	-
KS93	PTI1-6 3'UTR 5'	GGCAGCCGTGGCGCCTTGTGTG	-
KS94	PTI1-6 3'UTR 3'	GTTCTTGGAACAGAAAAGAGGGAG	-
KS95	GAPC 5'	AGGGTGGTGCCAAGAAGGTTG	-
KS96	GAPC 3'	GTAGCCCCACTCGTTGTCGTA	-

## A2. Hergestellte und verwendete Klonierungsvektoren

**Tabelle A 2-1: Liste der verwendeten TOPO-Klone für GUS-Promotorstudien.** Die TOPO-Klone der GUS-Promotorstudien wurden in dieser Arbeit bzw. in Bachelorarbeiten, die im Rahmen dieser Arbeit betreut wurden, hergestellt. Die vollständige Liste der Primesequenzen befindet sich im Anhang A1.

Name des Konstrukts	Zielvektor	Amplifikat	Fragmentgröße	Primer for	rev	Template	Ursprung
TOPO-PTI1-1 <sub>Pro</sub>	pCR®2.1.TOPO®	PTI1-1 <sub>Pro</sub>	1.500 bp	KS1	KS2	A. t. gDNA	Diese Arbeit
TOPO-PTI1-2 <sub>Pro</sub>	pCR®2.1.TOPO®	PTI1-2 <sub>Pro</sub>	1.020 bp	KS3	KS4	A. t. gDNA	Diese Arbeit
TOPO-PTI1-3 <sub>Pro</sub>	pCR®2.1.TOPO®	PTI1-3 <sub>Pro</sub>	1.039 bp	KS5	KS6	A. t. gDNA	WITTFOTH (2009)
TOPO-PTI1-4 <sub>Pro</sub>	pCR®2.1.TOPO®	PTI1-4 <sub>Pro</sub>	1.081 bp	KS7	KS8	A. t. gDNA	SCHMIDT (2009)
TOPO-PTI1-5 <sub>Pro</sub>	pCR®2.1.TOPO®	PTI1-5 <sub>Pro</sub>	517 bp	KS9	KS10	A. t. gDNA	SCHMIDT (2009)
TOPO-PTI1-6 <sub>Pro</sub>	pCR®2.1.TOPO®	PTI1-6 <sub>Pro</sub>	1.211 bp	KS11	KS12	A. t. gDNA	Diese Arbeit
TOPO-PTI1-7 <sub>Pro</sub>	pCR®2.1.TOPO®	PTI1-7 <sub>Pro</sub>	1.154 bp	KS13	KS14	A. t. gDNA	WITTFOTH (2009)
TOPO-PTI1-8 <sub>Pro</sub>	pCR®2.1.TOPO®	PTI1-8 <sub>Pro</sub>	1484 bp	KS15	KS16	A. t. gDNA	SCHMIDT (2009)
TOPO-PTI1-9 <sub>Pro</sub>	pCR®2.1.TOPO®	PTI1-9 <sub>Pro</sub>	666 bp	KS17	KS18	A. t. gDNA	Diese Arbeit

**Tabelle A 2-2: Im Rahmen dieser Arbeit verwendete TOPO- bzw. pGEM-Klone für GFP-Lokalisationsstudien.** Die TOPO- bzw. pGEM-Klone wurden in dieser Arbeit bzw. in Bachelorarbeiten, die im Rahmen dieser Arbeit betreut wurden, hergestellt. A. t. cDNA: *Arabidopsis thaliana* cDNA des Ökotyps Col-0. S. l. gDNA: *Solanum lycopersicum* gDNA. Die vollständige Liste der Primersequenzen befindet sich im Anhang A1.

Name des Konstrukts	Zielvektor	Amplifikat	Fragmentgröße	Primer for	rev	Template	Ursprung
pGEM-PTI1-1 <sub>GFP</sub>	pGEM®-TEasy	PTI1-1 5'-UTR & ORF ohne Stopp	1.123 bp	KS19	KS21	A. t. cDNA	Diese Arbeit
TOPO-PTI1-2 <sub>GFP</sub>	pCR®2.1.TOPO®	PTI1-2 5'-UTR & ORF ohne Stopp	1.140 bp	KS22	KS54	A. t. cDNA	Diese Arbeit
TOPO-PTI1-3 <sub>GFP</sub>	pCR®2.1.TOPO®	PTI1-3 ORF ohne Stopp	1.137 bp	KS25	KS26	A. t. cDNA	WITTFOTH (2009)
pGEM-PTI1-4 <sub>GFP</sub>	pGEM®-TEasy	PTI1-4 5'-UTR & ORF ohne Stopp	1.182 bp	KS27	KS29	A. t. cDNA	SCHMIDT (2009)
TOPO-PTI1-5 <sub>GFP</sub>	pCR®2.1.TOPO®	PTI1-5 ORF ohne Stopp	1.233 bp	KS30	KS31	A. t. cDNA	Diese Arbeit
TOPO-PTI1-6 <sub>GFP</sub>	pCR®2.1.TOPO®	PTI1-6 ORF ohne Stopp	1.110 bp	KS32	KS33	A. t. cDNA	SCHMIDT (2009)
TOPO-PTI1-7 <sub>GFP</sub>	pCR®2.1.TOPO®	PTI1-7 5'-UTR & ORF ohne Stopp	1.137 bp	KS34	KS36	A. t. cDNA	WITTFOTH (2009)
TOPO-PTI1-8 <sub>GFP</sub>	pCR®2.1.TOPO®	PTI1-8 ORF ohne Stopp	1.301 bp	KS39	KS40	A. t. cDNA	Diese Arbeit
pGEM-PTI1-9 <sub>GFP</sub>	pGEM®-TEasy	PTI1-9 5'-UTR & ORF ohne Stopp	1.119 bp	KS41	KS43	A. t. cDNA	Diese Arbeit
TOPO-AGC1-5 <sub>GFP</sub>	pCR®2.1.TOPO®	AGC1-5 ORF ohne Stopp	1.749 bp	KS44	KS45	A. t. cDNA	LINNEMANN (2011)
TOPO-AGC1-7 <sub>GFP</sub>	pCR®2.1.TOPO®	AGC1-7 ORF ohne Stopp	1.681 bp	KS46	KS47	A. t. cDNA	LINNEMANN (2011)
pGEM-PDK1.2 <sub>GFP</sub>	pGEM®-TEasy	PDK1.2 ORF ohne Stopp	1.473 bp	KS48	KS49	A. t. cDNA	Diese Arbeit
TOPO-LAT52 <sub>PRO</sub>	pCR®2.1.TOPO®	LAT52-Promotor (TWELL et al. 1989)	574 bp	KS85	KS86	S. l. gDNA	Diese Arbeit

**Tabelle A 2-3: Im Rahmen dieser verwendete TOPO- bzw. pGEM-Klone zur Klonierung von *E. coli*-Expressionsvektoren.** Die TOPO- bzw. pGEM-Klone wurden in dieser Arbeit bzw. in Bachelorarbeiten, die im Rahmen dieser Arbeit betreut wurden, hergestellt. *A. t.* cDNA: *Arabidopsis thaliana* cDNA des Ökotyps Col-0. Die vollständige Liste der Primersequenzen befindet sich im Anhang A1 .

Name des Konstrukts	Zielvektor	Amplifikat	Fragmentgröße	Primer for rev		Template	Ursprung
pGEM-PTI1-1 <sub>HIS</sub>	pGEM <sup>®</sup> -TEasy	PTI1-1 ORF ohne Stopp	1.139 bp	KS50	KS51	A. t. cDNA	Diese Arbeit
pGEM-PTI1-2 <sub>HIS</sub>	pGEM <sup>®</sup> -TEasy	PTI1-2 ORF ohne Stopp	1.111 bp	KS52	KS53	A. t. cDNA	Diese Arbeit
pGEM-PTI1-3 <sub>HIS</sub>	pGEM <sup>®</sup> -TEasy	PTI1-3 ORF ohne Stopp	1.239 bp	KS54	KS55	A. t. cDNA	WITTFOTH (2009)
pGEM-PTI1-5 <sub>HIS</sub>	pGEM <sup>®</sup> -TEasy	PTI1-5 ORF ohne Stopp	1.231 bp	KS56	KS57	A. t. cDNA	Diese Arbeit
pGEM-PTI1-6 <sub>HIS</sub>	pGEM <sup>®</sup> -TEasy	PTI1-6 ORF ohne Stopp	1.153 bp	KS58	KS59	A. t. cDNA	Diese Arbeit
TOPO-AGC1-5 <sub>HIS</sub>	pCR <sup>®</sup> -Blunt II-TOPO <sup>®</sup>	AGC1-5 ORF ohne Stopp	1.744 bp	KS60	KS61	A. t. cDNA	LINNEMANN (2011)
TOPO-AGC1-7 <sub>HIS</sub>	pCR <sup>®</sup> 2.1.TOPO <sup>®</sup>	AGC1-7 ORF ohne Stopp	1.680 bp	KS62	KS63	A. t. cDNA	LINNEMANN (2011)
TOPO-OXI1 <sub>HIS</sub>	pCR <sup>®</sup> 2.1.TOPO <sup>®</sup>	OXI1 ORF ohne Stopp	1.278 bp	KS64	KS65	A. t. cDNA	Diese Arbeit
pGEM-PDK1.2 <sub>HIS</sub>	pGEM <sup>®</sup> -TEasy	PDK1.2 ORF ohne Stopp	1.523 bp	KS66	KS67	A. t. cDNA	Diese Arbeit
pGEM <sub>-GST</sub> -AGC1-5	pGEM <sup>®</sup> -TEasy	AGC1-5 ORF mit Stopp	1.750 bp	KS68	KS69	A. t. cDNA	Diese Arbeit
pGEM <sub>-GST</sub> -AGC1-7	pGEM <sup>®</sup> -TEasy	AGC1-7 ORF mit Stopp	1.684 bp	KS70	KS71	A. t. cDNA	Diese Arbeit
pGEM <sub>-GST</sub> -PDK1.2	pGEM <sup>®</sup> -TEasy	PDK1.2 ORF mit Stopp	1.483 bp	KS72	KS67	A. t. cDNA	Diese Arbeit
TOPO-PTI1-1 <sup>K96N</sup>	pCR <sup>®</sup> 2.1.TOPO <sup>®</sup>	PTI1-1 ORF mit Punktmutation an Pos. 96 (K → N), ohne Stopp	1.139 bp	KS50 KS74	KS73 KS51	pGEM-PTI1-1 <sub>HIS</sub>	Diese Arbeit
TOPO-PTI1-2 <sup>K99N</sup>	pCR <sup>®</sup> 2.1.TOPO <sup>®</sup>	PTI1-2 ORF mit Punktmutation an Pos. 99 (K → N), ohne Stopp	1.111 bp	KS52 KS76	KS75 KS53	pGEM-PTI1-2 <sub>HIS</sub>	Diese Arbeit
TOPO-PTI1-3 <sup>K141N</sup>	pCR <sup>®</sup> 2.1.TOPO <sup>®</sup>	PTI1-3 5'-ORF Teil I (aa 1-146) mit Punktmutation an Pos. 141 (K → N), ohne Stopp	444 bp	KS54	KS77	pGEM-PTI1-3 <sub>HIS</sub>	LINNEMANN (2011)
TOPO-AGC1-5 <sup>K214R</sup>	pCR <sup>®</sup> 2.1.TOPO <sup>®</sup>	AGC1-5 ORF mit Punktmutation an Pos. 214 (K → R), ohne Stopp	1.744 bp	KS60 KS79	KS78 KS61	TOPO-AGC1-5 <sub>HIS</sub>	Diese Arbeit
pGEM-AGC1-7 <sup>K175R</sup>	pGEM <sup>®</sup> -TEasy	AGC1-7 ORF mit Punktmutation an Pos. 175 (K → R), ohne Stopp	1.680 bp	KS62 KS81	KS80 KS63	TOPO-AGC1-7 <sub>HIS</sub>	Diese Arbeit
TOPO-OXI1 <sup>K45R</sup>	pCR <sup>®</sup> 2.1.TOPO <sup>®</sup>	OXI1 5'-ORF Teil I (aa 1-49) mit Punktmutation an Pos. 45 (K → R), ohne Stopp	154 bp	KS64	KS86	TOPO-OXI1 <sub>HIS</sub>	Diese Arbeit

### A3. Vergleich der Exon-Intron-Strukturen PTI1-Kinasen

**Tabelle A 3-1: Vergleich der Exon- und Intron-Größen der bekannten PTI1-Gene aus *Arabidopsis* und Mais.** Angegeben sind die Exon- und Intron-Größen der *Arabidopsis* PTI1-Gene ermittelt anhand der Daten des *Sequence Viewer* aus *TAIR*. Die Daten des ZmPTI1a-Gens stammen von HERRMANN (2004), die der weiteren Mais PTI1-Gene der persönlichen Mitteilung von T. Rehders (Biozentrum Klein Flottbek).

	Exon 1	Exon 2	Exon 3	Exon 4	Exon 5	Exon 6	Exon 7	Exon 8
AtPTI1-1	138	129	253	127	274	133	87	393
AtPTI1-2	25	141	254	127	274	133	87	441
AtPTI1-2ps	x	x	276	127	274	133	87	120
AtPTI1-3	x	287	181	x	652	133	87	441
AtPTI1-4	91	97	254	127	274	133	87	341
AtPTI1-5	x	202	184	378	274	133	87	413
AtPTI1-6	211	175	254	127	274	133	87	265
AtPTI1-7	139	107	251	127	274	133	87	362
AtPTI1-8	154	115	251	127	274	133	87	327
AtPTI1-8ps	151	121	251	127	277	133	86	211
AtPTI1-9	92	98	251	127	274	133	87	305
ZmPTI1a	193	109	254	124	274	132	88	435
ZmPTI1b	146	110	247	127	275	132	87	501
ZmPTI1c	141	119	235	126	274	132	85	607
ZmPTI1d	254	118	247	127	273	130	86	361
ZmPTI1e	40	193	251	127	274	134	86	419

---

## Danksagung

Ich möchte mich im Besonderen bei Herrn PD Dr. René Lorbiecke für die Möglichkeit bedanken, unter seiner Betreuung zu promovieren. Die hilfreichen, wissenschaftlichen Ratschläge und die Ermutigungen waren mir stets und vor allem wenn es einmal schwieriger wurde eine große Stütze.

Ebenso bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Udo Wienand für das Übernehmen des Zweitgutachtens, für die Aufnahme in seine sympathische Arbeitsgruppe und die schönen Betriebsausflüge.

Ganz besonders bedanke ich mich bei Katja Müller für die tatkräftige Unterstützung im Labor und für die schöne Zeit mit Ihr als Labortischnachbarin sowie für die vielen netten Gespräche.

Des Weiteren möchte ich mich bei meinen Bachelorstudentinnen Annika Schmidt, Anne Wittfoth, Tanja Rehders, Martina Schönhof und Lara Linnemann bedanken.

Zudem gilt mein Dank der gesamten AMP1-Arbeitsgruppe. Die tolle Atmosphäre, die schönen Kaffeepausen und die leckeren Kuchen werden mir noch lange im Gedächtnis bleiben. Es war schön, mit Euch zusammen zu arbeiten.

Im Einzelnen möchte ich mich noch bei Jantje für den richtigen Tipp zur rechten Zeit bedanken. Reinhold sage ich Danke für seine rheinische Art hier im hohen Norden und für die Versorgung mit wichtigen Nährstoffen in letzter Minute, mal abgesehen von dem „leckereren“ Muffin. Meinen Mitstreitern im Labor danke ich für die lustige Zeit, das Foppen und die Zusprüche.

Ganz besonders danke ich meiner Familie für die Unterstützung in allen Lebenslagen. Zudem danke ich meinen lieben Freunden und vor allem Mike.

Den Umzug nach Hamburg und demzufolge das schöne Leben hier habe ich dieser Promotion zu verdanken.