

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

**– Zusammenfassung –**

**Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades  
des Fachbereichs Biologie  
der Universität Hamburg

vorgelegt von

**MARKUS M. HERRMANN**

Hamburg 2004

## Zusammenfassung

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

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

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

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

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

vierten Lysin<sup>100</sup> gegen Asparagin verloren geht. In Kinase Assays mit überexprimiertem ZmPTI1 wurden durch Co-Präzipitation aus Gesamtprotein Hinweise auf die Existenz von ZmPTI1-phosphorylierenden Kinasen in Pollen- und Seideprotein erhalten. In *in-gel* Assays konnten ebenfalls ZmPTI1-phosphorylierende Aktivitäten in Pollen- und Seideprotein gefunden werden. Zusätzlich wurde eine solche Aktivität in Wurzelprotein nachgewiesen.

In *post-transcriptional gene silencing* (PTGS) Ansätzen zum funktionellen Ausschalten des *ZmPti1*-Gens wurden 20 stabil transformierte *knock out* Linien erhalten, deren Pollenfertilität eingeschränkt ist. Dieses konnte durch Kreuzungsversuche und Analyse der Nachkommen bewiesen werden. Die Auswertung von 180 F<sub>1</sub>-Nachkommen zeigte, dass der PTGS-transgene F<sub>0</sub>-Pollen in seiner Fertilität stark beeinträchtigt war, da das Transgen über den Pollen nur vermindert an die nachfolgende Generation weitergegeben wurde. Die Analyse von 96 F<sub>2</sub>-Nachkommen läßt darauf schließen, dass der PTGS-Effekt in Pollen der F<sub>1</sub>-Generation zu einem nahezu vollständigen Verlust der Pollenfertilität führte. Der dem Verlust der Pollenfunktion zugrunde liegende Mechanismus ist noch unklar.

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

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