

INAUGURAL DISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät

der Ruprecht-Karls-Universität

vorgelegt von

Diplom-Biologe Rolf Stratmann

Tag der mündlichen Prüfung:

**Pektin Methylesterasen (PMEs) und PME-Inhibitor (PMEI) –
verwandte Proteine im Maispollen: Genexpression,
subzelluläre Lokalisation und funktionelle Charakterisierung**

Gutachter: Prof. Dr. Thomas Rausch

Prof. Dr. Rüdiger Hell

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|----|
| 1 Zusammenfassung | 1 |
| 2 Einleitung | 3 |
| 2.1 Zur Rolle des männlichen Gametophyten in der Reproduktion der Pflanzen..... | 3 |
| 2.2 Pollenschlauchwachstum: Ein besonderer Typ von extremen Spitzenwachstum..... | 4 |
| 2.2.1 Der Pollenschlauch..... | 4 |
| 2.2.2 Steuerung und Regulation des Pollenschlauchwachstums..... | 5 |
| 2.2.2.1 Notwendigkeit einer gerichteten Zellwandsynthese..... | 5 |
| Calcium Ionen..... | 5 |
| GTPasen..... | 5 |
| Aktin..... | 6 |
| cAMP..... | 7 |
| Calmodulin CaM..... | 7 |
| Protonen..... | 8 |
| Kalium und Chlorid Ionen..... | 8 |
| Wachse..... | 8 |
| Flavonoide..... | 8 |
| 2.2.2.2 Genereller Aufbau der Pollenschlauchzellwand in Dikotyledonen und Monokotyledonen..... | 9 |
| 2.2.3 Die Rolle der Pektine und ihres Methylierungsstatus..... | 9 |
| 2.2.3.1 Pektinbiosynthese..... | 9 |
| 2.2.3.2 Biologische Aufgaben von Pektinen..... | 11 |
| 2.2.3.3 Pektin in der Zellwand..... | 12 |
| 2.2.3.4 Signalweiterleitung und Pathogenabwehr durch Oligogalacturonide (OGAs)..... | 17 |
| 2.2.4 Pektin Methylesterasen..... | 17 |
| 2.2.4.1 Proteinstruktur und Katalysemechanismus von Pektin Methylesterasen..... | 18 |
| 2.2.4.2 Physiologische Funktionen von Pektin Methylesterasen..... | 19 |
| 2.2.4.3 Regulation von Pektin Methylesterasen..... | 20 |
| 2.2.4.4 PME Inhibitoren..... | 21 |
| 2.2.4.5 Die Rolle von PMEs und PMEI-RPs während der Pollenentwicklung: Der Pollenschlauch als Modellsystem zur Identifizierung von Pektinstoffwechselfvorgängen während des gerichteten Spitzenwachstums..... | 22 |

| | |
|--|----|
| 3 Zielsetzung | 24 |
| 4 Material und Methoden | 26 |
| 4.1 Pflanzenmaterial..... | 26 |
| 4.1.1 Anzucht von <i>Zea mays</i> Pflanzen der Sorte „Lixis“ | 26 |
| 4.1.2 Pollenproben von <i>Nicotiana tobaccum</i> | 26 |
| 4.2 Isolation von Zellwandproteinen aus Maispollen bzw. aus aufgeschlossenen Zellen..... | 26 |
| 4.3 Isolation der Zellwandproteine aus Maisblütengewebe zur Auftrennung in einer Gelfiltration..... | 26 |
| 4.4 Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen nach Bradford..... | 27 |
| 4.5 Proteinfällungen..... | 28 |
| 4.5.1 Acetonfällung von Proteinen aus einer wässrigen Lösung..... | 28 |
| 4.5.2 Trichloressigsäure-fällung von Proteinen..... | 28 |
| 4.6 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese..... | 28 |
| 4.7 Proteinfärbungen..... | 29 |
| 4.7.1 Coomassiefärbung von Gelen..... | 29 |
| 4.7.2 Amidoschwarzfärbung..... | 29 |
| 4.7.3 Ponceaurotfärbung..... | 29 |
| 4.8 Western-Blot Analyse..... | 30 |
| 4.9 Arbeiten mit <i>Escherichia coli</i> | 30 |
| 4.9.1 Bakterienmedien..... | 31 |
| 4.9.2 Herstellung einer Glycerin-Bakterienstocklösung..... | 31 |
| 4.9.3 Herstellung elektrokompenter <i>E. coli</i> -(XL1-Blue)-Zellen..... | 31 |
| 4.9.4 Elektroporation von <i>E. coli</i> | 32 |
| 4.9.5 Proteinexpression der vier rekombinanten Pektin-Methylesterase-Inhibitor-verwandten Proteine PME1-RP1 bis PME1-RP4 in <i>E. coli</i> | 32 |
| 4.9.6 Proteinexpression verschiedener Pektin-Methylesterasen und PME-Fragmente in <i>E. coli</i> | 33 |
| 4.10 Arbeiten mit <i>Pichia pastoris</i> | 33 |
| 4.10.1 <i>Pichia pastoris</i> Medien..... | 33 |
| 4.10.2 Herstellung von elektrokompenten <i>Pichia pastoris</i> | 33 |
| 4.10.3 Elektroporation von <i>Pichia pastoris</i> | 34 |
| 4.10.4 Proteinexpression in <i>Pichia Pastoris</i> | 34 |

| | |
|--|----|
| 4.11 Affinitätsreinigung von Antiseren..... | 34 |
| 4.12 Lektin Chromatographie..... | 35 |
| 4.13 Größenausschluss-Flüssigkeitschromatographie..... | 35 |
| 4.14 Ballistische Transformation..... | 36 |
| 4.14.1 Funktionsprinzip der 'Particle Gun' | 36 |
| 4.14.2 Partikelpräparation | 37 |
| 4.14.3 Transformation von <i>Nicotiana tobaccum</i> Pollen | 37 |
| 4.14.4 Pollenkeimung..... | 37 |
| 4.14.5 Beschuss der Zellen..... | 38 |
| 4.15 Mikroskopie | 38 |
| 4.16 PME Assay | 39 |
| 4.16.1 Inhibitionstest für PMEs..... | 40 |
| 4.17 Invertase-Assay..... | 40 |
| 4.18 DNA-Methoden..... | 43 |
| 4.18.1 Isolierung von Plasmid DNA im kleinen Maßstab..... | 43 |
| 4.18.2 Isolierung von Plasmid DNA über Ionenaustauschersäulen..... | 43 |
| 4.18.3 Isolierung von genomischer DNA aus Pflanzenmaterial..... | 43 |
| 4.18.4 Bestimmung der Konzentration und Reinheit von DNA (OD-Messung)..... | 44 |
| 4.18.5 DNA-Fällung zur Reinigung und Konzentrierung..... | 44 |
| 4.18.6 Restriktion von DNA..... | 44 |
| 4.18.7 Dephosphorylierung der 5'-Enden von DNA-Fragmenten mit alkalischer Phosphatase | 45 |
| 4.18.8 Ligation von DNA Fragmenten..... | 45 |
| 4.18.9 RNA-Reinigung und cDNA Synthese..... | 46 |
| 4.18.10 PCR-Techniken..... | 46 |
| 4.18.11 RLM RACE zur Amplifikation von Vollängen cDNAs..... | 46 |
| 4.18.12 Reinigung von DNA Fragmenten..... | 47 |
| 4.18.13 Sequenzierung von Plasmiden..... | 47 |
| 4.18.14 DNA-Gelelektrophoresen..... | 47 |
| 4.18.14.1 Agarosegele..... | 47 |
| 4.18.14.2 Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)..... | 47 |
| 4.18.14.3 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen..... | 48 |

| | |
|---|-----------|
| 4.19 RNA-Methoden..... | 48 |
| 4.19.1 Bestimmung der Konzentration und Reinheit von RNA..... | 48 |
| 4.19.2 RNA-Agarosegelelektrophorese..... | 49 |
| 4.20 Vektoren und Oligonucleotide..... | 49 |
| 4.21 Abkürzungen und Internetadressen..... | 52 |
| 5 Ergebnisse..... | 54 |
| 5.1 cDNS-Klonierung von vier in Maispollen exprimierten PME-Isoformen..... | 54 |
| 5.2 Identifizierung und Re-Klonierung von zwei Typ I PMEs aus Mais..... | 54 |
| 5.2.1 Re-Klonierung der pollenspezifischen ZmC5 PME: Sequenzkorrektur..... | 54 |
| 5.2.2 Identifizierung einer neuen Typ I PME aus <i>Zea mays</i> | 56 |
| 5.3 Identifizierung und Klonierung von zwei Typ II PMEs aus Mais..... | 59 |
| 5.3.1 Identifizierung einer neuen Typ II PME aus <i>Zea mays</i> Pollen..... | 59 |
| 5.3.1.1 Analyse der erhaltenen PME Aktivitätsbanden..... | 60 |
| 5.3.2 Identifizierung einer weiteren Typ II PME aus Mais..... | 62 |
| 5.4 Versuche zur heterologen Expression der rekombinanten PME-Proteine in verschiedenen Expressionssystemen..... | 63 |
| 5.5 Expressionsmuster der Pektin Methylesterasen PME1 bis PME4 in <i>Zea mays</i> mittels semi-quantitativer RT-PCR..... | 64 |
| 5.6 cDNS-Klonierung von vier in Maispollen exprimierten PME-Isoformen..... | 66 |
| 5.7 Entwicklungsabhängige Expression der verschiedenen PME-Isoformen..... | 67 |
| 5.8 Sind die nativen PME-RPs aus <i>Zea mays</i> glykosiliert?..... | 68 |
| 5.9 Heterologe Expression von vier rekombinanten, in Maispollen exprimierten PME-Proteinen..... | 69 |
| 5.10 Indirekter Nachweis von Disulfidbrücken in PME-RPs..... | 72 |
| 5.11 Versuche zum Nachweis der Komplexbildung zwischen PME- und PME-Proteinen.... | 74 |
| 5.12 <i>In vitro</i> -Versuche zur Inhibition von PME-Aktivität..... | 76 |
| 5.13 Wirkung von exogener PME-Gabe auf Pollenkeimung und Pollenschlauchwachstum..... | 77 |
| 5.14 Subzelluläre Lokalisierung von Mais PME- und PME-Proteinen in wachsenden Pollenschläuchen mittels Reporter-Fusionen..... | 79 |
| 5.14.1 Klonierungen von zwei Typ I PMEs und zwei Typ II PMEs aus <i>Zea mays</i> in den Vektor pHD223::RFP..... | 79 |
| 5.14.2 Klonierung von PME-RP1 bis PME-RP4 aus <i>Zea mays</i> in den Vektor pHD32::YFP | |

| | |
|---|-----|
| | 79 |
| 5.14.3 Kotransformation von Tabakpollen mit pHD228::PME2::RFP und den PMEI-RP Vektoren..... | 86 |
| 6 Diskussion | 88 |
| 6.1 Identifizierung von Typ I und Typ II PMEs aus Mais..... | 89 |
| 6.2 Transkripte der vier identifizierten Typ I und Typ II PMEs lassen sich in unterschiedlichen Maisgeweben nachweisen..... | 90 |
| 6.3 In Pollenproben kann nur eine PME Aktivitätsbande und nur eine Typ II PME nachgewiesen werden..... | 91 |
| 6.4 Die klonierten PMEs lassen sich weder in den verwendeten bakteriellen Systemen noch im eukaryontischen <i>Pichia pastoris</i> System zur Expression bringen..... | 92 |
| 6.5 Die Typ I PMEs besitzen eine Invertase- und PME-Inhibitoren homologe N-terminale Pro-Domäne..... | 95 |
| 6.6 Mit Mais PMEI-RPs lassen sich weder Invertase- noch Pektin Methylesterase-Aktivitäten inhibieren..... | 98 |
| 6.7 Es konnten keine Interaktions/Bindepartner der vier PMEI-RPs nachgewiesen werden..... | 99 |
| 6.8 PMEI-RP1 und PMEI-RP3 werden in die Zellwand sekretiert und lokalisieren an der Pollenschlauchspitze..... | 100 |
| 6.9 PMEI-RP2 lokalisiert im heterologen Tabakpollensystem im sekretorischen Weg, lässt sich aber nicht in der Zellwand bzw. an der Pollenschlauchspitze nachweisen..... | 101 |
| 6.10 Das Typ II PME Fusionsprotein PME2::RFP lässt sich in der Zellwand und im Pollenschlauch als diffuses Signal nachweisen..... | 102 |
| 6.11 Ausblicke..... | 102 |
| 7 Literaturverzeichnis | 104 |
| 8 Danksagung | 118 |

1 Zusammenfassung

Pektin Methylesterasen (PMEs) und Pektin Methylesterase Inhibitor verwandte Proteine (PMEI-RPs) im Maispollen: Genexpression, subzelluläre Lokalisation und funktionelle Charakterisierung

Während der Pollenentwicklung und dem Pollenschlauchwachstum spielen dynamische Veränderungen der Pektinzusammensetzung in der Zellwand eine entscheidende Rolle. Besonders die durch Pektin Methylesterasen vermittelte Demethylierung der Pektinmatrix hat Auswirkungen auf die physikalischen Eigenschaften der Zellwand.

Durch MALDI- bzw. ESI-TOF Untersuchungen von Maispollenproben und Datenbankrecherchen wurden unterschiedliche Pektin Methylesterasen identifiziert. Nach Erhalt der vollständigen cDNAs wurden diese in bakterielle und eukaryotische Expressionsvektoren kloniert. Von den vier identifizierten PMEs besitzen zwei Isoformen eine für Typ I charakteristische Prodomäne. Die anderen zwei Isoformen besitzen keine Prodomäne und gehören zu den Typ II PMEs. Mit Hilfe der rekombinanten Proteine sollen, mittels *in vitro* Untersuchungen, die biologische(n) Funktion(en) aufgeklärt werden. Mittels semiquantitativer RT-PCR wurde die Expression dieser Gene aus verschiedenen Pflanzenorganen ermittelt. PMEI-RP Expression konnte nur in Antheren und sich entwickelnden Pollen nachgewiesen werden. Die PMEs wurden hingegen sowohl in Maisblättern, Pollen, als auch in weiteren Pflanzenorganen exprimiert. Die subzelluläre Lokalisation der PMEI-RPs in Pollen wurde zusätzlich durch differentielle Extraktion, durch immunocytochemischen Untersuchungen und durch transiente Expression von PMEI-RP::Reportergen-Chimären untersucht. Erstaunlicherweise führten die rekombinanten und nativen PMEI-RPs weder zu einer Inhibition der PME-Aktivität noch zu einer Inhibition mit Invertasen (Zellwand und Vakuolen-Isoformen). Darüber hinaus wurden β -1,3-Glucanasen, Polygalacturonasen und Inulasen durch *in vitro* Tests als mögliche Zielproteine ausgeschlossen. In Größenausschluss-Chromatographien unterschiedlicher Maispollen-Proben und rekombinanter PMEI-RPs konnten nur monomere PMEI-RPs bei ihrem erwarteten M_r ohne Hinweis auf einen Bindepartner nachgewiesen werden. Versuche die Proteinkomplexe durch Cross-Linker zu quervernetzen, führten ebenfalls zu keinen nachweisbaren PMEI-RP Zielproteinkomplexen.

Es liegt nahe, dass einige Isoformen der kürzlich identifizierten komplexen PMEI-RP Familien entweder andere Zielproteine als Pektin Methylesterasen und Invertasen haben, oder alternativ,

weitere noch unbekannte Funktionen aufweisen. Die Expression der PMEI-RP2 Isoform führte zu einer Reduktion des Pollenschlauchwachstums, was auf eine Interaktion von PMEI-RPs mit PMEs deuten könnte.

1 Summary

Pectin methylesterase (PME) and PME-inhibitor(PMEI)-related proteins in maize pollen: Gene expression, subcellular localisation and functional characterisation

During pollen development and pollen tube growth, dynamic changes in the pectin component of the cell wall are thought to play a crucial role. In particular, pectin methylesterase-mediated demethylation affects the physical properties of the cell wall.

Through MALDI- and ESI-TOF studies of maize pollen samples respectively and databank researches different pectin methylesterases have been identified. After acquiring the full length cDNAs they were cloned into bacterial and eukaryotic expression vectors. Among the four identified PMEs, two isoforms contained a prodomain, which is typical for type I PMEs, whereas the other two were without, which is typical for type II PMEs. With the help of the recombinant proteins, the biological functions of the target proteins should be clarified through *in vitro* assays. Via semiquantitative RT-PCRs the expression in different plant tissues has been determined. PME expression could be confirmed in maize leaves, pollen, as well as in other plant tissues. PMEI expression could only be observed in pollen. The subzellular localization of the PMEI-RPs was also adressed by differential extraction, by immunocytochemical analysis, and by transient expression of PMEI-RP::reportergen fusions. Surprisingly, recombinant and native PMEI-RPs showed no inhibition of PME activity, neither was an inhibition of invertases (vacuolar and cell wall isoforms) observed. Additionally β -1,3-glucanase, polygalacturonase and inulase have been excluded as target proteins by *in vitro* assays. Size exclusion chromatography of different maize pollen samples and recombinant PMEI-RPs revealed only free PMEI-RPs at their expected M_r with no indication of binding to other target proteins. Also, cross-linking experiments failed so far to identify any target enzyme(s) for the cloned PMEI-RPs.

The conclusion is, that some members of the recently identified, complex PMEI-RP families either bind to target enzymes other than invertases and PMEs, or alternatively, exhibit additional yet unknown functions. The transient expression of PMEI-RP2 resulted in a reduction in pollen tube length, indicating a possible interaction of PMEI-RPs with PMEs.

2 Einleitung

Im Folgenden werden zelluläre Prozesse und Komponenten, die am Pektinstoffwechsel und der sexuellen Fortpflanzung von Pflanzen beteiligt sind, dargestellt. Zuerst werden die Aufgaben und Funktionen des Pollens, des männlichen Gametophyten, erläutert. Anschließend wird auf die Notwendigkeit einer gerichteten Zellwandsynthese während des Pollenschlauchwachstums hingewiesen. Der Aufbau der Pollenzellwand und die bisher identifizierten Steuerungs- und Regulations-Mechanismen, die während des Pollenwachstums eine Rolle spielen, werden in den darauf folgenden Abschnitten dargestellt. Dazu gehören unter anderem die Synthese und die Modifizierung der Pektine, die Demethylierung der Pektinmatrix durch Pektin Methylesterasen (PMEs) und die mögliche Inhibition letzterer durch Pektin Methylesterase Inhibitoren (PMEIs) bzw. PMEI verwandte Proteine (PMEI-RPs). In den folgenden Kapiteln sind die unterschiedlichen Eigenschaften von PMEs und PMEI-RPs erläutert.

2.1 Zur Rolle des männlichen Gametophyten in der Reproduktion der Pflanzen

Die sexuelle Fortpflanzung von Pflanzen wird durch die Bestäubung und anschließende Befruchtung der weiblichen Samenanlagen erreicht. Die Pollenkörner werden in den männlichen Blütenorganen, den Antheren, gebildet und je nach Pflanzenart unterschiedlich verbreitet. Gebildet werden die Pollen von der Mikrosporenmutterzelle. Aus dieser entstehen durch meiotische Teilung vier Pollenkörner, die anschließend durch Mitose in eine generative und vegetative Zelle aufgeteilt werden. Aus der generativen Zelle entstehen durch eine weitere mitotische Teilung die zwei Spermazellen, die für die doppelte Befruchtung und Bildung des Embryos bzw. des triploiden Endosperms benötigt werden (McCormick, 1993).

Durch Wind oder Insekten können die reifen dehydratisierten Pollenkörner auf die Narben anderer Blütenpflanzen transportiert werden. Handelt es sich dabei um eine kompatible Narbe, rehydratisiert der Pollen innerhalb weniger Minuten, und aus einer der Poren in der Exine keimt ein Pollenschlauch aus (Bedinger, 1992). Während dieser Zeit wird aus dem unpolaren Pollenkorn durch massive Umstrukturierungen eine stark polarisierte Zelle, die sich durch einige Besonderheiten von anderen Pflanzenzellen abhebt.

Neben Wurzelhaaren sind Pollen die einzigen stark polarisierten Zellen in Pflanzen. Der Pollenschlauch wächst ausschließlich an der Spitze und besitzt das im Pflanzenreich schnellste Wachstum (Taylor & Hepler, 1997).

Der Maispollen zum Beispiel wird innerhalb der ersten 5 Minuten nach erfolgter Bestäubung rehydratisiert, keimt aus und kann in 24 bis 36 Stunden eine Strecke von bis zu 50 cm im Narbengewebe zurücklegen. Das entspricht ungefähr einem Längenwachstum von 1 cm/h (Barnabas, 1984; Mascarenhas, 1993). Während der Befruchtung muss der Pollenschlauch durch die Cuticula in die Narbe eindringen und basalwärts Richtung Ovar in das Griffelparenchym hineinwachsen. Die Pollenschläuche wachsen in einem spezialisierten Gewebe, dem „Transmitting Tissue“ innerhalb des Griffels zu den Samenanlagen, wo jeweils nur ein Pollenschlauch in eine Mikropyle hineinwächst. Dort kommt es zum Platzen der Pollenschlauchspitze und die beiden Spermakerne werden an ihrem Zielort freigesetzt (Bedinger *et al.*, 1994; Palanivelu & Preuss, 2000).

2.2 Pollenschlauchwachstum: Ein besonderer Typ von extremen Spitzenwachstum

2.2.1 Der Pollenschlauch

Das Streckenwachstum findet in einem kleinen Bereich an der Spitze des Pollenschlauches statt und ist auf eine schnelle Versorgung von neuen Membran- und Zellwand-Bestandteilen angewiesen. Diese werden durch Golgi-Vesikel an die Spitze transportiert und sekretiert. Zellwandbestandteile und Membranen werden recycelt und man kann Aktin-vermittelte polarisierte Organellenbewegungen beobachten. Der stark polarisierte Pollenschlauch lässt sich in unterschiedliche Bereiche aufteilen. Wenige Mikrometer hinter der Spitze findet sich die so genannte „Clear-zone“, die sich durch das Fehlen jeglicher Zellorganellen auszeichnet. In diesem Bereich liegen sehr viele Vesikel vor (Hepler *et al.*, 2001). Dahinter folgt eine Zone, die reich an Mitochondrien und endoplasmatischen Reticulum ist, gefolgt von einer weiteren Zone, in der die Organellen und Kerne vorliegen. Fast der gesamte Pollenschlauch wird von einer großen Vakuole ausgefüllt. Das Cytoplasma flankiert die Pollenschlauchwände und konzentriert sich in der Spitze. Erreicht der Schlauch eine bestimmte Länge, werden die nicht mehr benötigten Abschnitte durch Kallosestopfen von der restlichen Zelle getrennt (Franklin-Tong *et al.*, 1996; Mascarenhas, 1993; Parre & Geitmann, 2005b).

2.2.2 Steuerung und Regulation des Pollenschlauchwachstums

2.2.2.1 Notwendigkeit einer gerichteten Zellwandsynthese

Um die Eizelle zu finden, müssen Pollenschläuche durch unterschiedliche Gewebe hindurchwachsen. Dies können sie nur durch eine gerichtete Zellwandsynthese erreichen, die es ihnen ermöglicht, jeweils in eine Samenanlage hineinzuwachsen. Das Auffinden und Ansteuern der Eizelle wird von intrazellulären und extrazellulären Faktoren bestimmt. Im folgenden werden unterschiedliche Moleküle, die einen Einfluss auf die Entwicklung des Pollenschlauches haben können, aufgeführt. Calcium²⁺ Ionen spielen dabei scheinbar eine Schlüsselrolle, indem sie unterschiedliche Regulierungsprozesse miteinander vernetzen.

Calcium Ionen

Pollenschläuche besitzen einen ungefähr 20 µm steil abfallenden intrazellulären Ca²⁺ Ionen Gradienten unterhalb der Spitze. Dieser ist für das gerichtete Längenwachstum essentiell (Messerli & Robinson, 1997; Taylor & Hepler, 1997). An der Spitze wird eine Ca²⁺ Konzentration von 10 µM gemessen (Messerli *et al.*, 2000), die jedoch innerhalb 20 µm auf 150 bis 200 nM absinkt. Der Ca²⁺ Einstrom ist an der Pollenschlauchspitze am höchsten und nimmt mit zunehmender Entfernung ab (Holdaway-Clarke *et al.*, 1997; Messerli & Robinson, 2003). Es ist bekannt, dass hohe Ca²⁺ Konzentrationen mit der Sekretion von Vesikeln assoziiert sind (Battey *et al.*, 1999; Blackburn & Battey, 1993). Camacho und Malho (2003) konnten zeigen, dass durch die Veränderung von intrazellulärem Ca²⁺ die Sekretion von Vesikeln reguliert wird. Sie zeigten, dass durch die Freisetzung von Ca²⁺ auf einer Seite der Pollenschlauchspitze sich diese immer in die Richtung mit der erhöhten Ca²⁺ Konzentration ausrichtet und ihr Wachstum in diese Richtung fortsetzt. Dies wird durch ein erhöhtes Fusionieren und Recyclen von Vesikeln und Membranbestandteilen erreicht.

GTPasen

G-Proteine dienen als einfache Schalter. Im GTP gebundenen Zustand übermitteln sie extrazelluläre Signale an Effektormoleküle, die in der Signalkaskade nachgeschaltet sind. Im GDP gebundenen Zustand werden keine Signale weitergeleitet (Symons & Settleman, 2000). Der Einstrom von Ca²⁺ wird unter anderem durch GTPasen reguliert (Lin *et al.*, 1996). Für Pollen konnte Kost *et al.* (1999) zeigen, dass eine dominant negative Rac Mutation eine Inhibition des Längenwachstums

verursacht. Die Expression von konstitutiv aktivem Rop führt zu einem verstärkten Wachstum (Li *et al.*, 1999). Durch das Injizieren von Anti-Rop1Ps Antikörper konnte ebenfalls gezeigt werden, dass es zum Arrest des Pollenschlauchwachstums kommt (Li *et al.*, 1999). Zheng und Yang (2000) konnten schließlich zeigen, dass durch das Injizieren von At-Rop1 Antikörpern bzw. durch die Expression von dominant negativen At-Rop1 Mutanten der Ca^{2+} Gradient verschwindet und es zum Arrest des Wachstums kommt.

Aktin

In Tabakpollen modulieren GTPasen das Aktin Cytoskelett innerhalb der Pollenschlauchspitze. Kurze F-Aktinbündel liegen direkt unter der Spitze, ihre Struktur wird durch eine Rho GTPase moduliert. Wird die GTPase deaktiviert, verschwinden die F-Aktinbündel und es kommt zum Arrest des Wachstums, wird sie überaktiviert, bilden sich längere Aktinkabel die zum Anschwellen der Pollenschlauchspitze führen (Fu *et al.*, 2001). Während der „Selbst Inkompatibilitäts“ Reaktion von Mohnpollen kommt es ebenfalls zu einem starken Ca^{2+} Anstieg in der Pollenspitze (Franklin-Tong *et al.*, 1993) und zur anschließenden Depolymerisierung der Aktinfilamente und somit zum Arrest des weiteren Wachstums (Snowman *et al.*, 2002). Mögliche Effektormoleküle in Tabakpollen umfassen unter anderem eine Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat (PI-4,5-P_2) Kinase und PIP_2 (Kost *et al.*, 1999). PIP_2 fördert die Aktinpolymerisierung in tierischen Zellen (Chen *et al.*, 2000; Moreau & Way, 1998) und wird als einer der Hauptregulatoren für die Aktinorganisation und Vesikelsekretion angesehen (Martin, 1998). Es dient als Substrat einer phosphoinositidabhängige Phospholipase C, die PIP_2 in das membrangebundene Diacylglycerol und das lösliche Inositol 1,4,5-Trisphosphat IP_3 umsetzt. IP_3 dient als Signalmolekül und kann Ca^{2+} Kanäle öffnen. Möglicherweise wird auf diese Weise der Ca^{2+} Spitzengradient, der für das Pollenschlauchwachstum essentiell ist, mit aufgebaut (Franklin-Tong *et al.*, 1996; Hepler *et al.*, 2001). Weitere Effektormoleküle, die auf den Aktinstoffwechsel einwirken könnten sind Profilin, Aktin depolymerisierender Faktor (ADF), Gelsolin und Ca^{2+} (Gibbon *et al.*, 1998; Kovar *et al.*, 2000; Smertenko *et al.*, 1998; Vidali & Hepler, 2001). Profileine binden globuläres G-Aktin in einer Ca^{2+} abhängigen Reaktion und werden mit Aktindynamiken in Mais in Verbindung gebracht. Nur ein geringer Teil (~10%) des gesamten Aktins liegt im Maispollenschlauch filamentös vor (Kovar *et al.*, 2000). Die in der Pollenschlauchspitze vorliegende Ca^{2+} Konzentration von ~ 10 μM ist für die Verknüpfung von Pollen G-Aktin und Profilin ideal (Kovar & Staiger, 2000).

cAMP

In unterschiedlichen Experimenten konnte Moutinho *et al.* (2001) zeigen, dass durch Manipulationen der cAMP Konzentration über „Caged Probes“ und eines löslichen cytosolischen Pollen Signalprotein mit Adenylat Cyclase Aktivität, sich die Richtung, in die die Spitze wächst, beeinflussen lässt. Ein Gradient lässt sich jedoch nicht nachweisen. Nachgeschaltete Zielproteine sind unter anderem die Protein Kinase A PKA (Assmann, 1995; Biermann *et al.*, 1990), CREBs („cAMP response element-binding factors“) (Katagiri *et al.*, 1989), zyklisch Nukleotiden-gesteuerte Kationen Kanäle in Arabidopsis (Leng *et al.*, 1999) oder in Tabak plasmamembrangebundene Calmodulin bindende Kanäle, die eine putative zyklische Nukleotidbindedomäne besitzen (Arazi *et al.*, 2000).

Calmodulin CaM

Calmodulin ist in der Lage Signale von unterschiedlichen Prozessen zu integrieren und könnte für den Signalaustausch zwischen Ca^{2+} Ionen Steuerung und cAMP Regulierung mitverantwortlich sein (Trewavas *et al.*, 2002). Es ist ein multifunktionelles Protein ohne eigene katalytische Aktivität, das mindestens 30 unterschiedliche Zielproteine binden kann. Dazu gehören Ca^{2+} Transport ATPasen, Phosphodiesterasen, Myosin leichte Ketten Kinasen und andere CaM-abhängige Protein Kinasen. Ca^{2+} -Calmodulin Komplexe binden an Zielproteine und verändern ihre Funktion (Hoefflich & Ikura, 2002). CaM ist unter anderem an Prozessen der Vesikelsekretion (Gilroy, 1996; Schuurink *et al.*, 1996), Zellaxenfixierung und Aufteilung von sich entwickelnden Fucus Zygoten beteiligt (Love *et al.*, 1997). Obwohl sich kein CaM Gradient im Pollenschlauch nachweisen lässt, konnten Gough und Tayler (1993) zeigen, dass die CaM-Bindung trotz gleichmäßiger Verteilung in Fibroblasten am Zellende stärker ist. Rato *et al.* (2004) zeigten, dass in der Pollenschlauchspitze eine höhere CaM Bindung/Aktivität auftritt und diese für das Wachstum und die Re-Orientierung wichtig ist. Der Pollen richtet sein Wachstum scheinbar im Spitzenbereich nach der höchsten lokalen freien CaM Konzentration aus. In 2005 konnten Shang *et al.* zeigen, dass es in Lilienpollen einen spannungsabhängigen Ca^{2+} Kanal gibt und dieser durch extrazelluläres CaM reguliert werden kann (Shang *et al.*, 2005). Vor kurzem konnten Yoon *et al.* (2006) zeigen, dass in Petunienpollen zwei membrangebundene calmodulinähnliche Proteinkinasen, die für die Polarität und das Pollenschlauchwachstum wichtig sind, vorkommen. Die Ca^{2+} Konzentration für die P_i CDPK1 Aktivierung korreliert eng mit der Ca^{2+} Konzentration, die in der Wachstumszone der Pollenschlauchspitze vorliegt.

Protonen

Im Pollenschlauch existiert neben dem beschriebenen Ca^{2+} Gradienten noch ein Protonengradient. Der pH Gradient reicht von der leicht sauren Spitze bis hinunter zu der so genannten alkalischen Bande nahe der „Clear Zone“. Die Protonen dringen an der Spitze ein und treten nahe der „Clear Zone“ seitlich wieder aus. Vermutlich wird der Protonenfluss durch ATPasen nahe der „Clear Zone“ aufrechterhalten. Im Vergleich zu Ca^{2+} wird der pH Gradient durch Inhibitoren des Pollenschlauchwachstums nicht aufgelöst (Feijo *et al.*, 1999).

Kalium und Chlorid Ionen

Kalium und Chlorid Ionen werden ebenfalls mit dem Pollenschlauchwachstum in Verbindung gebracht (Messerli *et al.*, 1999). Die Bedeutung von Kalium ist noch weitestgehend unklar. Die Chlorid Ionen dringen ca. 20 bis 25 μm unterhalb der Spitze durch die Seiten des Pollenschlauches in diesen hinein und werden aus der Spitze wieder heraustransportiert (Zonia *et al.*, 2002). Neuere Ergebnisse deuten jedoch darauf hin, dass der Chlorid Ionen Strom keinen Einfluss auf das Pollenschlauchwachstum hat (Messerli *et al.*, 2004).

Wachse

Wachs-Mutanten (*cer*) von können eine veränderte Pollenkit Zusammensetzung aufweisen und in ihrer männlichen Fruchtbarkeit eingeschränkt sein (Aarts *et al.*, 1995; Hulskamp *et al.*, 1995; Preuss *et al.*, 1993). Das Unvermögen der *cer* Mutanten, die Wasserfreisetzung aus den Narben zu stimulieren, wird als Beweis angesehen, dass Lipide in der Pollenwand an der Zell-Zell-Erkennung beteiligt sind und für eine Hydratation des Pollen benötigt werden (Elleman *et al.*, 1992; Wolters-Arts *et al.*, 1998).

Flavonoide

Das Fehlen von bestimmten Flavonoiden, kleinen aromatischen Molekülen, kann ebenfalls zur Sterilität des Pollens führen (Taylor & Hepler, 1997; Ylstra *et al.*, 1994). Die Flavonole liegen in cytosolischen Kompartimenten vor, werden während der Keimung schnell mit spezifischen Zuckern konjugiert (<1 Minute) und Formen so eine einzigartige Klasse von pollenspezifischen Flavonolen (Vogt & Taylor, 1995; Xu *et al.*, 1997; Zerback *et al.*, 1989). Flavonoide sind aber scheinbar nicht bei allen Pflanzen für eine erfolgreiche Befruchtung notwendig. In Arabidopsis konnte durch eine Nullmutation im ersten für die Flavonoidbiosynthese benötigten Enzym gezeigt werden, dass dieser

Pollen auch ohne Flavonoide nicht in seiner Fruchtbarkeit eingeschränkt ist (Burbulis *et al.*, 1996).

2.2.2.2 Genereller Aufbau der Pollenschlauchzellwand in Dikotyledonen und Monokotyledonen

Die Pollenwand besteht in der Regel aus zwei bis drei Schichten. Die innere Schicht besteht aus einer inneren Kallose Hülle (β 1-3 Glucan), die mit einem Gemisch aus Pektin mit Cellulose und Hemicellulose ummantelt ist, während die zweite Schicht, die Exine, aus Sporopollenin besteht. An der Pollenschlauchspitze lässt sich keine Kallose nachweisen. In einigen Spezies sind die Pektin und Cellulose Komponenten in zwei Schichten aufgeteilt und formen eine dreischichtige Zellwand (Li *et al.*, 1994; Taylor & Hepler, 1997).

Auf diese zwei bzw. drei Schichten wird während der Pollenkornentwicklung noch eine weitere Schicht, die so genannte Tryphine bzw. Pollenkit-Schicht aufgelagert. Sie besteht aus den Überresten des Tapetums, das nach seinem Abbau auf die Pollenkörner abgelagert wird.

Die Tryphine setzt sich aus unterschiedlichsten Komponenten wie z.B. Wachs, Lipidtröpfchen, kleinen aromatischen Molekülen und Proteinen zusammen (Taylor & Hepler, 1997).

2.2.3 Die Rolle der Pektine und ihres Methylierungsstatus

Die äußere Pollenschlauchwand erscheint mikroskopisch gesehen eine Extension der pektischen inneren Wand, der Intine, zu sein. Im ungekeimten Pollen ist das Pektin an den Aperturen, an denen der Pollenschlauch hervortreten kann, angereichert (Li *et al.*, 1994).

Mit Hilfe von Antikörpern, die unterschiedliche Pektinzusammensetzungen erkennen können, wurde gezeigt, dass methylesterifiziertes Pektin an der Pollenschlauchspitze und in sekretorischen Vesikeln, die mit der Spitze fusionieren, vorkommt (Geitmann *et al.*, 1995; Jauh & Lord, 1996; Li *et al.*, 1994). Demethyliertes Pektin kommt hauptsächlich in der äußeren Pollenschlauchwand vor. Zu geringem Teil ist es auch in der Spitze nachgewiesen worden (Geitmann *et al.*, 1995; Li *et al.*, 1994).

2.2.3.1 Pektinbiosynthese

Für die Biosynthese von Pektinen werden mindestens 53 verschiedene enzymatischen Aktivitäten benötigt (Mohnen, 1999). In der Arbeitsgruppe von Maor Bar-Peled konnte das Enzym GalAT aus angereicherten Golgifraktionen isoliert werden. Dieses Protein transferiert GalA von UDP-GalA auf endogenes Homogalacturonan oder auf exogene Oligalacturonide. Auch wurde gezeigt, dass die Aktivität von GalAT und Pektin Methyltransferasen im Lumen des Golgi liegen (Gu & Bar-Peled,

2004; Sterling *et al.*, 2001). Nach bisherigem Kenntnisstand geht man davon aus, dass UDP-GalA durch eine/mehrere Epimerase/n aus UDP-GlcA auf bzw. an der cytoplasmatischen Seite des Golgi gebildet wird. UDP-GalA wird dann durch einen UDP-GalA:UMP Antiporter in das Lumen des Golgis transportiert. Im Golgi wird schließlich GalA durch GalAT auf ein unbekanntes Startmolekül übertragen. Eine im Golgi vorhandene Pectin Methyltransferase esterifiziert Methylgruppen an den GalA Einheiten (Gu & Bar-Peled, 2004; Sterling *et al.*, 2001).

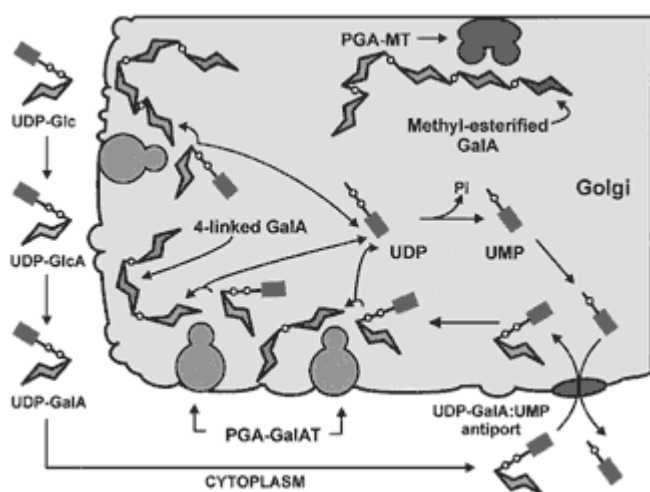


Abbildung 2.1

Modell der Pektinbiosynthese nach Bar-Peled

Quelle: <http://cell.ccr.c.uga.edu/~mao/biosyn/text.htm>

Die Pektine werden also nach ihrer Synthese im medialen und trans Golgi methyliert und durch das Anknüpfen von weiteren Mono- bzw. Poly-sacchariden im trans Golgi modifiziert (Staelin & Moore, 1995; Vian & Roland, 1991; Zhang & Staelin, 1992). Das Pektin kann während dem Transport zur Plasmamembran weiter modifiziert werden. Mit einer 70 - 80 %-igen Methylierung der Galacturonsäure-Einheiten wird das Pektin schließlich in den Zellwandraum sekretiert (Carpita & Gibeaut, 1993; Liners *et al.*, 1994). Innerhalb des Golgi-Netzwerkes werden während der Zellwandsynthese weitere pektische und hemicellulose Glycoproteine gebildet und mittels Vesikeln zur Plasmamembran transportiert. Dort verschmelzen die Vesikel mit der Plasmamembran und ihr Inhalt wird in die bestehende bzw. sich bildende Zellwand integriert (Staelin & Moore, 1995).

Die Methylierung der Pektine verhindert, dass sich schon während des Transportes zum Zielort Ca^{2+} Verbindungen zwischen ihnen ausbilden und sie in einer mehr oder weniger flexiblen Form vorliegen (Carpita & Gibeaut, 1993). Nicht in allen Geweben werden Pektine stark methyliert sekretiert (Knox, 1990). Die Wurzelepidermiszellen des Klees können zum Beispiel auch schwach

methyliertes Pektin sekretieren (Lynch & Staehelin, 1992). In Tabakpollen wird durch die vorzeitige Demethylierung der Pektine durch eine konstitutiv aktive PME ein Arrest des Pollenschlauchwachstums erreicht (Bosch *et al.*, 2005).

2.2.3.2 Biologische Aufgaben von Pektinen

Pektine gehören zu einer Familie von komplexen Polysacchariden, die in allen primären Zellwänden vorkommen. Die komplexe Struktur der Pektine und die Tatsache, dass Pflanzen eine Großzahl an Genen zur Pektinbiosynthese entwickelt haben, legen nahe, dass sie vielfältige Aufgaben während des Pflanzenwachstum und der Pflanzenentwicklung haben. Neben ihrer Funktion als Zellwandmatrix sind sie auch in der Signalweiterleitungen und Pathogenabwehr involviert (Ridley *et al.*, 2001).

Es wird angenommen, dass während der Biogenese einer neuen Zellwand Pektine die ersten Komponenten sind, die in die Zellplatte eingelagert werden (Carpita *et al.*, 1989). Danach werden weitere Pektinbestandteile, Cellulose-Mikrofibrillen und Hemicellulose in den extrazellulären Raum sekretiert. Während dessen kommt es zur Ausbildung der Mittellamelle und der Primärwand (Matar & Catesson, 1988). Die hydrophobe Pektinmatrix kann den Einbau neuer Zellwandbausteinen modulieren, verhindert das Cellulose-Einheiten aggregieren (Jarvis, 1992) und sie gibt den eingelagerten Cellulose-Mikrofibrillen die Möglichkeit während Restrukturierungen der Zellwand aneinander entlang zu gleiten (Cosgrove, 2000).

Die Zell-Zell-Adhäsion wird durch das beidseitige Sekretieren von Pektinen gewährleistet. Durch den regulierten Abbau der Pektine und der Zell-Zell-Adhäsion können sich im parenchymatischen Gewebe Interzellularen oder das für den Blattfall benötigte Trenngewebe bilden (Knox, 1990; Roberts & McCann, 2000).

Burton *et al.* (2000) und Manfield *et al.* (2004) zeigen in zwei Studien, dass durch das Stilllegen einer Cellulose Synthase Isoform bzw. das Inhibieren der Cellulose Synthase durch Isoxaban, Pektine die Aufgaben der Cellulosekomponenten zum Teil ausgleichen können. Bis zu diesem Zeitpunkt ist man davon ausgegangen, dass Cellulose und Hemicellulose die Hauptkomponenten sind, die dem Zellinnendruck entgegenwirken. Die fehlenden Cellulosekomponenten werden durch eine verstärkte Pektinbiosynthese und einer Anreicherung von demethylesterifizierten Pektinen in der Zellwand kompensiert (Burton *et al.*, 2000; Manfield *et al.*, 2004).

Die Pektinmatrix beeinflusst unter anderem die Porosität (Baron-Epel *et al.*, 1988), die Dicke (Vincken *et al.*, 2003), den pH Wert, den Ionenhaushalt und die Wasserkonzentration der Zellwand

(Willats *et al.*, 2001a). Die Porosität wird unter anderem durch die Dimerisierung von RG-II durch Bor Ionen moduliert. Pflanzen die einen Bormangel aufweisen, besitzen eine gestörte RG-II Dimerisierung. Dieser Mangel manifestiert sich in einem reduziertem Wachstum, vergrößerten Poren und einem Anschwellen der Zellwand. Durch die Zugabe von Bor Ionen lässt sich der Effekt jedoch beseitigen (Fleischer *et al.*, 1999). Untermuert wird dies durch die Arabidopsis Mutante *mur1*, die einen Defekt im RG-II Syntheseprozess besitzt, der den Austausch der Fucosyl- mit Galactose-Resten zur Folge hat. Der Phänotyp gleicht dem von Pflanzen, die unter Bormangel aufgezogen werden bzw. einem akuten Bormangel ausgesetzt sind und lässt sich durch die Zugabe von Bor Ionen oder L-Fucose wieder beseitigen (O'Neill *et al.*, 2001). Eine weitere Arabidopsis Mutante mit stark verringertem Wachstum heißt *Quasimodo* (Bouton *et al.*, 2002). Im Vergleich zu wildtyp Pflanzen ist ihr Gehalt an Galacturonsäuren um 25% herabgesetzt. Dies hat zur Folge, dass die Zell-Zell-Adhäsion nicht mehr richtig funktionieren kann und die Pflanzen einen Zwergwuchs aufweisen. Vor kurzem konnten Lebouf *et al.* (2005) zeigen, dass dies durch eine Reduktion der Ca^{2+} vernetzten Homogalacturonen an den Kontaktpunkten von reifen Zellen verursacht wird. Das Fruchtfleisch von *Cnr* Tomaten Mutante besitzt ebenfalls eine schwächere Zell-Zell-Adhäsion. Im Vergleich zu wildtyp Tomatenpflanzen hat sich hier das Verhältnis von demethylesterifiziertem zu methylesterifiziertem Homogalacturon verlagert. Die *Cnr* Mutante könnte folglich einen Fehler in einer Pektin Methylesterase, die Homogalacturon demethylesterifiziert, haben (Orfila *et al.*, 2002). Bei der Arabidopsis Mutante *quartet* können sich die Mikrosporen nach der Gametogenese nicht voneinander trennen und es bildet sich eine Pollentetrad. Einer der *QUARTET* loci (QRT3) kodiert für eine Polygalacturonase (Rhee & Somerville, 1998; Somerville, *et al.*, 2003).

2.2.3.3 Pektin in der Zellwand

Pektin ist eine heterogene Polymergruppe die aus mehr als 17 verschiedenen Monosacchariden, aus denen sich wenige Polysaccharide zusammensetzen, aufgebaut ist. Das Rückgrat von Pektinen besteht aus 1,4 verknüpften Galacturon-A Einheiten (GalA). Drei Hauptkomponenten lassen sich in der Zellwand beschreiben: Homogalacturon (HG), Rhamnogalacturon II (RG-II) und Xylogalacturon (XGA). Im Fall von HG und XGA können die Pektine am O6 methylesterifiziert sein und am O2 und O3 Acetyl-gruppen tragen. Rhamnogalacturon I (RG-I) setzt sich aus den sich wiederholenden Disaccharid 1,2-a-L-rhamnosyl-1,4-a-D-galactopyranosyluronicA Einheiten, die am O2 und O3 Acetyl-gruppen tragen und am O4 mit neutralen Zuckern substituiert sein können. In Abbildung 2.2 sind die einzelnen Pektinbestandteile schematisch dargestellt.

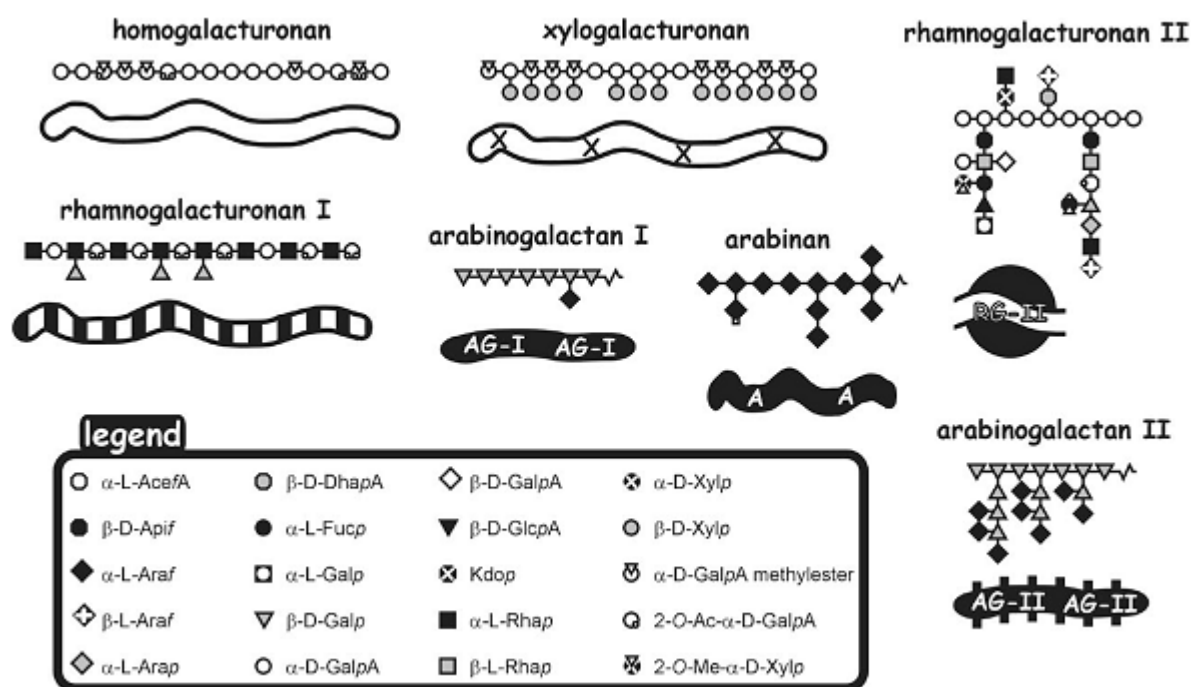


Abbildung 2.2

Schematische Darstellung der an der Pektinmatrix beteiligten Komponenten

In der Legende sind die einzelnen Symbole der verschiedene Monosaccharideinheiten aus denen sich die Pektine zusammensetzen erklärt. Die Bedeutung der Symbole sind in Abbildung 2.3 und 2.4 identisch. Abbildung aus (Vincken *et al.*, 2003).

Obwohl die einzelnen Komponenten, aus denen sich das Pektinnetzwerk zusammensetzt, bekannt sind, ist der Zusammenbau dergleichen in der Zellwand weitgehend unklar. Früher ist man davon ausgegangen, dass das Pektinrückgrat eine lange Kette mit HG und RG-I Bereichen ist. „Glattes“ Pektin besteht in diesem Modell hauptsächlich aus HG und „haariges“ Pektin aus RG-I, XGA, Arabinan und AG-I. Ein neues Modell von Vincken *et al.* (2003) geht davon aus, dass RG-I als Rückgrat, an das HG, RG-II, XGA und weitere Pektinkomponenten gebunden werden können, fungiert. In Abbildung 2.3 sind das alte und neue Modell schematisch dargestellt.

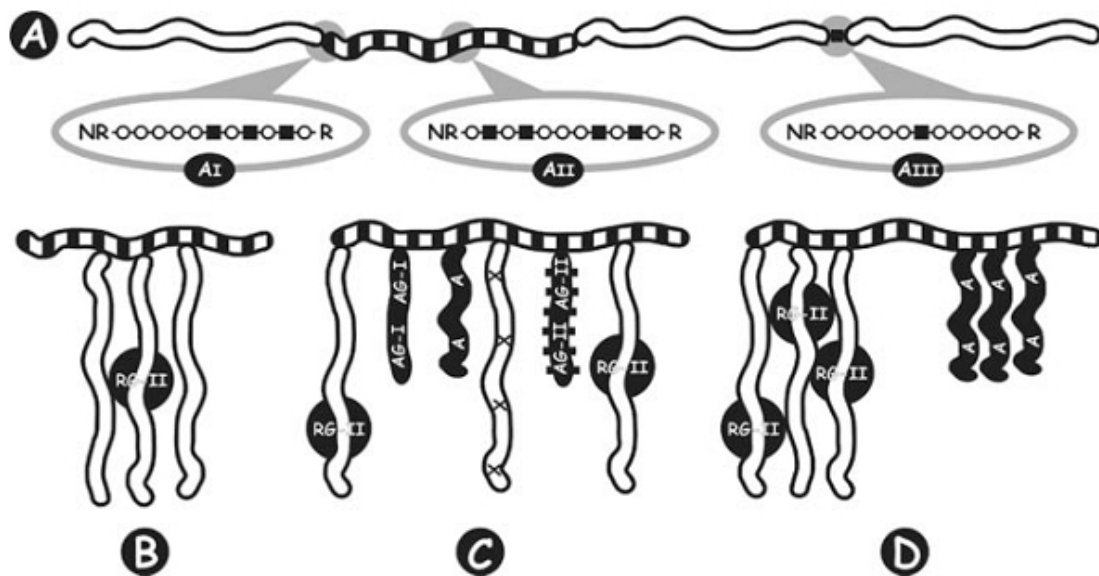


Abbildung 2.3

Schematische Darstellung der makromolekularen Pektinstruktur

A: In diesem Modell ist das Pektinrückgrat eine verlängerte Kette mit HG und RG-I Regionen. AI, AII und AIII illustrieren den Übergang von HG zu RG-I, Rhamnogalacturon Regionen mit einer GalA zu Rha Ratio >1 , und einer Rha-Einheit die verstreut zwischen zwei HG Einheiten liegen können. R ist das reduzierende und NR das nichtreduzierende Ende. Um die Bilder übersichtlich zu halten wurden XGA und weitere Pektinkomponenten nicht in das Modell mit einbezogen.

B,C,D: In diesem Modell wird RG-I mit neutralen- (AG-1, Arabinan und möglicherweise AG-II), HG- sowie XGA-Seitenketten verknüpft.

Die Matrix wird durch Quervernetzungen der pektischen Komponenten erreicht. Drei unterschiedliche Vernetzungen sind bekannt:

Ca²⁺ Gele

Durch die Einlagerung von Ca²⁺ Ionen zwischen demethylesterifizierten Carboxylgruppen können zwei HG-Ketten quervernetzt werden. Für die Quervernetzung werden mindestens 10 zusammenhängende demethylesterifizierte GalA Einheiten benötigt.

Borat-Diol-Ester

HG Moleküle können auch durch Borat-Diol-Ester zwischen den Apifuranosylresten von 2-O-methyl-D-Xyl-enthaltenden RG-II Seitenketten quervernetzt werden. RG-II ist integraler Bestandteil von HG.

Uronyl-Ester

Eine weitere Hypothese geht davon aus, dass durch Transesterifizierungen Uronylester gebildet werden können. Als Donorsubstrat fungiert dabei eine methylesterifizierte GalA Einheit. Als Empfänger könnte jedes Zellwandpolysaccharid in Frage kommen. Pektin Methylesterasen sind mögliche Kandidaten für die Transesterifizierungsreaktionen.

Die drei möglichen Quervernetzungen sind in Abbildung 2.4 dargestellt. In Abbildung 2.5 ist der hypothetische Aufbau der Mittellamelle und primären Zellwand dargestellt.

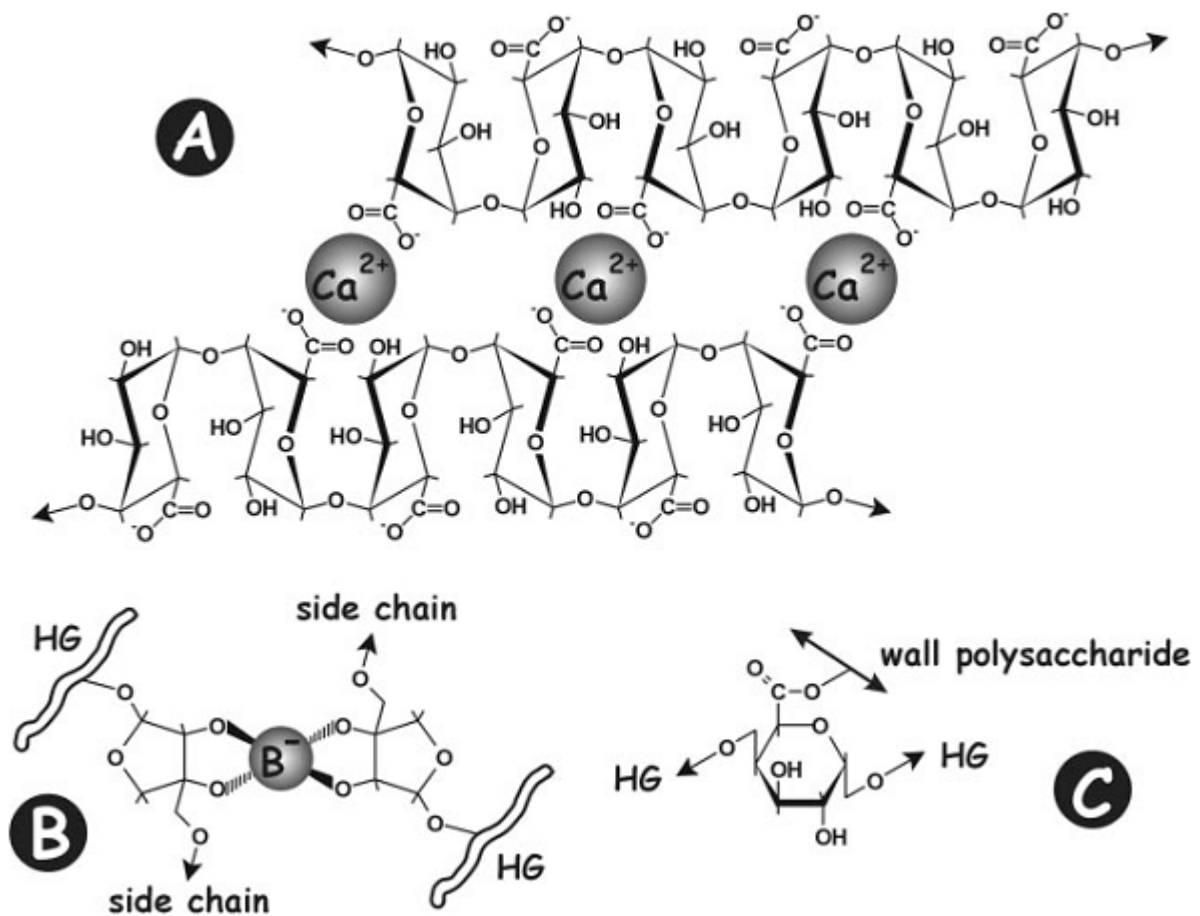


Abbildung 2.4

Darstellung der unterschiedlichen Möglichkeiten der Pektinquervernetzungen

A: Quervernetzung durch Ca^{2+} Ionen Bindung zwischen zwei demethylesterifizierten GalA Einheiten zweier Hgs. Es werden mindestens 10 hintereinander demethylierte GalA Einheiten für eine stabile Ca^{2+} Bindung benötigt.

B: HG Moleküle können auch durch Borat-Diol Ester, die sich zwischen den Apifuranosyl Einheiten der 2-O-methyl-D-Xyl-enthaltenden Seitenketten von RG-II bilden, vernetzt werden.

C: Durch Transesterifizierungsreaktionen könnten Uronyl-Ester zwischen demethylierten GalA Einheiten und anderen Zellwandbestandteilen entstehen. Abbildung aus (Vincken *et al.*, 2003)

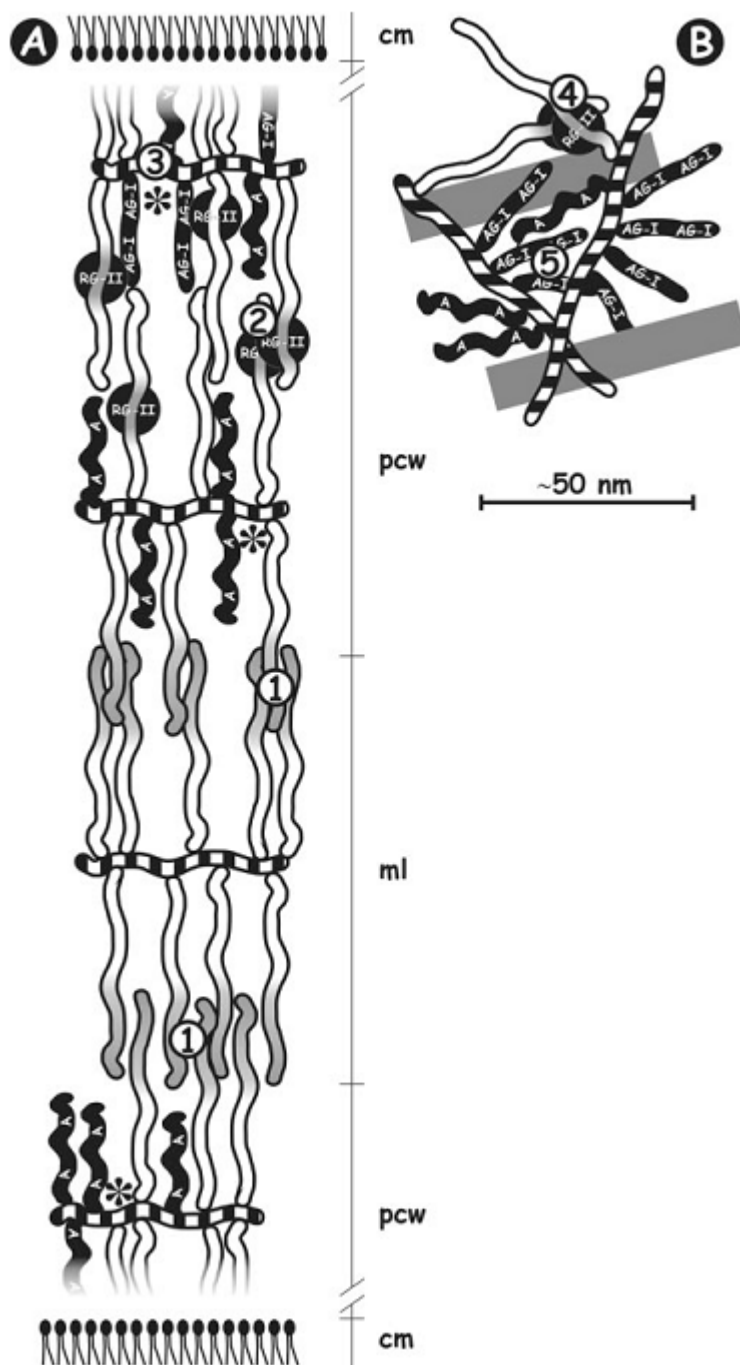


Abbildung 2.5

Modell des Pektinnetzwerkes in der Mittellamella und der primären Zellwand

A: Seitlicher Anblick von zwei primären Zellwänden die durch eine Mittellamella verbunden sind. **1** Die Mittellamella wird von Pektinmolekülen, die in die Zellplatte sekretiert werden, gebildet. Durch Ca^{2+} HG Seitenkettenquervernetzungen werden angrenzende Pektinschichten aneinander gebunden. **2** RG-II Quervernetzung darunterliegender Schichten mittels Borat-Diol Ester. Der Zellwanddurchmesser hängt von der Anzahl der aufgelagerten Pektin und Cellulose Komponenten ab. **3** Das RG-I Rückgrat wird mit seinen Seitenketten gegen eine Cellulose Mikrofibrille gedrückt. Die Seitenketten umgeben die Mikrofibrille und halten sie so am Platz.

B: Aufsicht auf die Zellwand (von der Plasmamembran zur Mittellamella) **4** Quervernetzungen können zwischen zwei benachbarten Pektinschichten, aber auch innerhalb der gleichen Schicht auftreten. **5** AG-I und Arabinane füllen die Löcher in der Zellwand auf. Damit die Darstellung übersichtlich bleibt, sind Hemicellulose und weitere Bestandteile nicht eingezeichnet. Regionen ohne Methylierung sind durch Schatten dargestellt. * sind Cellulose Mikrofibrillen; cm Zellmembran; pcw primäre Zellwand; ml Mittellamella. Die anderen Symbole sind in 2.2 erklärt. Abbildung aus (Vincken *et al.*, 2003).

2.2.3.4 Signalweiterleitung und Pathogenabwehr durch Oligogalacturonide (OGAs)

Oligogalacturonide sind kurze Homogalacturon Abschnitte mit einer Länge von 10 bis 15 1,4 verknüpften Galacturon Einheiten, die durch den Abbau von Homogalacturon durch Endopolygalacturonasen und Endopektinlyasen von Pflanzenpathogenen freigesetzt werden können (Cote *et al.*, 1998). Die freigesetzten OGAs können von den Pflanzenzellen detektiert werden und eine Reihe von Abwehrreaktionen, wie z.B. PR-Protein Synthese („pathogenesis related proteins“), Stomataverschluss, Verstärkung der Zellwand, Produktion von ROS („reactiv oxygene species“) und Apoptose („hypersensitive response, HR“) einleiten (Bolwell, 1999; Bolwell *et al.*, 2001; Cote *et al.*, 1998; Cote & Hahn, 1994; Hahn *et al.*, 1981). Auch bei Verwundungsreaktionen können sie eine Rolle spielen (Rojo *et al.*, 1999; Simpson *et al.*, 1998).

Während der Fruchtreife können OGAs die Bildung von Ethylen induzieren und die Reifung beschleunigen (Baldwin EA, 1988; Brecht JK, 1988; Melotto *et al.*, 1994; Simpson *et al.*, 1998). Neben der Fruchtreifung können sie noch antagonistisch auf das Phytohormon Auxin wirken (Altamura *et al.*, 1998; Bellincampi *et al.*, 1996; Branca *et al.*, 1988).

2.2.4 Pektin Methylesterasen

Pektin Methylesterasen (PMEs, EC 3.1.1.11) katalysieren die Demethylesterifizierung von O6-methylesterifizierten Galacturonsäure-Einheiten von Homogalacturon und haben in der Entwicklung von Pflanzen vielseitige Aufgaben. Sie sind unter anderem an Prozessen der Sprossverlängerung (Balestrieri *et al.*, 1990; Micheli *et al.*, 2000), Fruchtreifung (Harriman *et al.*, 1991), Samenkeimung (Ren & Kermode, 2000), Mikrosporongie und Pollenschlauchwachstum (Bosch *et al.*, 2005; Jiang *et al.*, 2005; Wakeley *et al.*, 1998), Wurzelentwicklung (Wen *et al.*, 1999), Blattentwicklung (Pilling *et al.*, 2004) und Blütenentwicklung (Mu *et al.*, 1994) beteiligt.

Pektin Methylesterasen werden von einer Multigenfamilie kodiert (Richard *et al.*, 1996). Nach Sequenzierung des *Arabidopsis thaliana* Genoms konnten 66 PME-verwandte Gene identifiziert werden (Nature2000, 2000; Salanoubat *et al.*, 2000). PME Proteine lassen sich in der Regel durch Unterschiede in ihrem Molekulargewicht, Isoelektrischen Punkt und ihrer Aktivität in saure, neutrale und basische PMEe einteilen (Bordenave & Goldberg, 1993). Daneben werden sie auch noch in zwei Klassen, den so genannten Typ I und Typ II Pektin Methylesterasen aufgeteilt (Micheli, 2001). Typ I PME Gene besitzen 2-3 Introns und kodieren ein Signalpeptid (Pre-Domäne), das für die Translokation in das endoplasmatische Reticulum zuständig ist, eine Pro-Domäne, die scheinbar unterschiedliche bzw. mehrere Funktionen besitzen kann, sowie die

katalytisch aktive PME-Domäne. Im Vergleich zu Typ I PMEs besitzen Typ II PMEs 5 bis 6 Introns und nur eine kurze bzw. keine Pro-Domäne. Die Pro-Domäne der PMEs und die Invertase- und Pektin Methylesterase Inhibitoren, im folgenden Pektin Methylesterase Inhibitor-verwandte Proteine (PMEI-RPs) genannt, weisen auffällige Ähnlichkeiten auf (Giovane *et al.*, 2004; Greiner *et al.*, 1998; Hothorn *et al.*, 2004a; Hothorn *et al.*, 2004b; Rausch & Greiner, 2004). PMEs aus phytopathogenen Mikroorganismen weisen starke Ähnlichkeiten mit den Typ II PMEs auf. Aufgrund dieser Homologien werden ihnen ähnliche Eigenschaften zugesprochen (Micheli, 2001). Pektin Methylesterasen, die aus Zellwänden isoliert und charakterisiert wurden, besitzen nur die PME-Domäne. Es konnten keine PMEs mit Pro-Domäne in der Zellwand nachgewiesen werden (Bordenave & Goldberg, 1993). Ob es sich bei den isolierten PMEs um Typ I oder Typ II Proteine handelt, lässt sich auf Grund fehlender DNS Sequenzinformationen nicht sagen. Die vorhandenen cDNS Sequenzen sind entweder unvollständig, ohne die für das 5' Ende kodierenden Pre/Pro-Domänen Region, oder sie gehören zu den Typ II PMEs (Albani *et al.*, 1991; Bordenave & Goldberg, 1993; Bordenave & Goldberg, 1994; Harriman *et al.*, 1991; Johansson *et al.*, 2002; Markovic *et al.*, 2002; Markovic & Jornvall, 1986; Richard *et al.*, 1996). Dies hängt unter anderem damit zusammen, dass die meisten identifizierten und charakterisierten PMEs aus Agrarpflanzen, wie z.B. Tomaten, Karotten, Bananen und Mung Bohnen, isoliert wurden und von diesen nur sehr begrenzte DNS Sequenzinformationen vorliegen.

2.2.4.1 Proteinstruktur und Katalysemechanismus von Pektin Methylesterasen

Durch kristallographische Untersuchungen von drei unterschiedlichen PMEs konnte gezeigt werden, dass es sich bei ihnen um eine rechts gedrehte parallele β -Helix handelt, die sich aus sieben Spiralen, die wiederum aus drei β -Blättern bestehen, zusammensetzt (Di Matteo *et al.*, 2005; Jenkins *et al.*, 2001; Johansson *et al.*, 2002). Diese Struktur ist für am Pektinstoffwechsel beteiligten Enzyme typisch (Jenkins *et al.*, 2001; Jenkins & Pickersgill, 2001). Die katalytische Domäne ist bei der Tomaten und Karotten PME relativ gleich aufgebaut. In beiden kommt es durch einen nukleophilen Angriff einer Asparaginsäure D153 bzw. D157 auf die Carboxymethylgruppe des Pektins. Durch zwei Glutaminreste (Q109, Q131 bzw. Q113, Q135) wird das Zwischenprodukt stabilisiert. Die Aminosäuren D132 bzw. D136 fungieren vermutlich als Protonendonator (Johansson *et al.*, 2002). In Abbildung 2.6 ist die Struktur eines katalytischen Zentrums dargestellt.

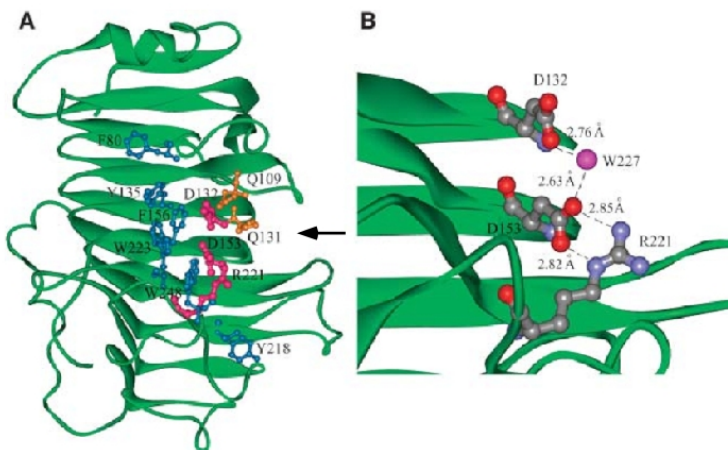


Abbildung 2.6

Struktur des katalytischen Zentrums der Tomaten PME

(A) Katalyseregionen sind in violett, stabilisierende Bereiche in orange und substratbindende in blau dargestellt. Der Pfeil zeigt auf den katalytischen Spalt.

(B) Detaildarstellung der am katalytischen Prozess beteiligten Aminosäuren und Wassermoleküle

Abbildung aus (Di Matteo *et al.*, 2005).

2.2.4.2 Physiologische Funktionen von Pektin Methylesterasen

Wie schon weiter oben erwähnt, liegen die PMEs in einer Multigenfamilie vor und kodieren unterschiedliche Isoformen, die je nach Bedarf bei bestimmten Aufgaben im Apoplasten erfüllen (Micheli, 2001). Manche Isoformen werden konstitutiv in der gesamten Pflanze, andere gezielt während der Fruchtreifung, Mikrosporogonie und Pollenkeimung, Samenkeimung, Wurzelentwicklung, Blütenentwicklung, Blattentwicklung sowie Sprossverlängerung exprimiert (Balestrieri *et al.*, 1990; Bosch *et al.*, 2005; Harriman *et al.*, 1991; Jiang *et al.*, 2005; Micheli *et al.*, 2000; Mu *et al.*, 1994; Pilling *et al.*, 2004; Ren & Kermode, 2000; Wakeley *et al.*, 1998; Wen *et al.*, 1999).

Daneben gibt es auch noch PMEs, die von phytophagen Organismen wie Insekten und Pilzen gebildet werden. PMEs von Phytophagen weisen eine starke Homologie zu den Typ II Pflanzen PMEs auf und besitzen vermutlich ähnliche Eigenschaften (Lord, 2000; Micheli, 2001; Mu *et al.*, 1994). Bisher wurden zwei unterschiedliche Substratumsetzungen beschrieben: PMEs können entweder blockweise mehrere aufeinanderfolgende Galacturonsäuren-Einheiten (GalA) demethylesterifizieren und so Blöcke von 12 und mehr demethylierten GalA Einheiten bilden, oder aber zufällig GalA Einheiten am Homogalacturonrückgrat demethylesterifizieren. Für die Verfestigung der Pektinmatrix durch die Bildung von Ca^{2+} Quervernetzungen sind Blöcke von mindestens 14 demethylierten GalA Einheiten erforderlich (Jarvis, 1984; Jarvis *et al.*, 1996). Phytophagene Mikroorganismen exprimieren in der Regel PMEs die zufällig einzelne GalA Einheiten demethylesterifizieren und damit eine Infektion der Pflanze ermöglichen. Durch die

zufällige Demethylierung werden Protonen freigesetzt, die zu einem Absenken des pH Wertes in der Zellwand führen (Lord, 2000; Micheli, 2001). Durch diese Absenkung können dann weitere PME's und pektinabbauende Enzyme, wie z.B. (Endo-)Polygalacturonidasen, aktiviert werden. Polygalacturonidasen können ihr Substrat erst nach Demethylesterifizierung des Homogalacturonrückgrates erkennen und enzymatisch umsetzen (Wakabayashi *et al.*, 2003).

2.2.4.3 Regulation von Pektin Methylesterasen

Durch die Verwendung von Antikörpern, die in der Lage sind unterschiedliche Pektinepitope zu markieren, konnten spezifische Pektin Mikrodomänen in Zellwänden nachgewiesen werden (Lenartowska *et al.*, 2001; Li *et al.*, 1994; Liners & Van Cutsem, 1992; Stepka *et al.*, 2000). Häufig verwendete Antikörper sind JIM5, erkennt schwach methylesterifiziertes Pektin, JIM7, erkennt stark methyliertes Pektin, LM7, erkennt Bereiche mit zufällig demethylierten Pektin und 2F4, der Ca²⁺ vernetzte Pektinbereiche markiert. Der Nachweis spezifischer Pektin Mikrodomänen setzt eine Regulierung der PME's in der Zellwand voraus.

Viele PME's zeigen eine gewebespezifische Expression bzw. werden erst bei bestimmten Entwicklungsvorgängen, wie z.B. der Fruchtreifung und Pollenentwicklung, induziert. Die Regulation von PME's beginnt also schon auf transkriptioneller Ebene (s.o.).

Pektin Methylesterasen aus phytophathogenen Mikroorganismen demethylesterifizieren das Pektin meist zufällig und weichen dadurch die Zellwandmatrix für die bevorstehende Infektion auf (Micheli, 2001). In Pflanzen werden ebenfalls PME's mit einem zufälligen Demethylierungsmuster exprimiert. Durch die zufällige Demethylierung der Pektinmatrix kann es zur Gelbildung und Aufweichung der Zellwand kommen (Jarvis, 1984; Jarvis *et al.*, 1996). In die so vorbereitete Matrix können neue Zellwandbestandteile integriert werden und es kann zum Zellwachstum kommen. Es wurden auch PME's charakterisiert, die je nach pH Wert ihr Demethylierungsmuster verändern können und so zu einer Festigung bzw. Lockerung der Pektinmatrix beitragen können (Catoire *et al.*, 1998; Denes *et al.*, 2000; Goldberg *et al.*, 2001). Daneben können sie auch von zwei- und dreiwertigen Kationen (Moustacas *et al.*, 1991) sowie benachbarten Carboxyl- und Methylgruppen in ihrer Aktivität moduliert werden (Catoire *et al.*, 1998; Limberg *et al.*, 2000; Willats *et al.*, 2001b). PME's, die aus ihrem pflanzlichen Kontext gelöst wurden, können ebenfalls ihre enzymatischen Eigenschaften verändern. Das Zellwandmilieu spielt folglich eine bedeutende Rolle in der Modulation der PME Aktivität und der nachgeschalteten Prozesse (Willats *et al.*, 2001b). Phytohormone können ebenfalls zur Regulation von Pflanzen PME's eingesetzt werden. Auxin

induziert in der Regel die PME Expression (Brian & Newcomb, 1954; Overvoorde *et al.*, 2005), während ABA die PME Aktivität in Tomatensamen steigern (Downie *et al.*, 1998) bzw. in Zedernsamen inhibieren kann (Ren & Kermode, 2000). Gibberilinsäure (GA₃) führte in Zedernsamen, *Chamaecyparis nootkatensis*, zu einer Aktivierung der PME Aktivität (Ren & Kermode, 2000).

Eine weitere Möglichkeit PMEs zu regulieren ist das Exprimieren von Inhibitoren, die entweder unspezifisch oder gezielt PMEs binden (Camardella *et al.*, 2000; Wolf *et al.*, 2003). Die Pro-Domänen von Typ I Pektinesterasen sind den Pektin Methylesterase Inhibitor-verwandten Proteinen (PMEI-RPs) sehr ähnlich und könnten bis zum Erreichen der Zellwand für die Inhibierung notwendig sein (Bosch *et al.*, 2005).

2.2.4.4 PME Inhibitoren

Mac Millan und Peromblen (1995) wiesen in Kartoffelzellwänden ein Molekül nach, das in der Lage ist, pflanzliche PMEs zu inhibieren. Bei diesem Molekül handelt es sich jedoch nicht um einen PME Inhibitor auf Proteinbasis, sondern um eine mit Seitenketten versehene Uronsäure mit einem Molekulargewicht von ca. 200 kDa (McMillan & Perombelon, 1995).

1990 wurde der erste Inhibitor auf Proteinbasis in Kiwi, *Actinidia chinensis*, identifiziert und charakterisiert (Balestrieri *et al.*, 1990; Camardella *et al.*, 2000). Vor kurzem konnten zwei weitere PME-Inhibitoren aus *Arabidopsis thaliana* kloniert und charakterisiert werden (Raiola *et al.*, 2004; Wolf *et al.*, 2003). Bei dem Versuch die Pektin Methylesterasen-inhibierende Proteindomäne zu charakterisieren und einzugrenzen fiel auf, dass sie starke Homologien mit den Pro-Domänen von Typ I PMEs und mit der Familie von Invertase Inhibitoren aufweisen (Greiner *et al.*, 1998; Pressey, 1967). Aufgrund der Proteinsequenz lassen sich Kandidatenproteine folglich nicht in Invertase- bzw. PME-Inhibitoren aufteilen, sondern werden in der Proteinfamilie „Pektin Methylesterase Inhibitor-verwandte Proteine, PMEI-RPs“ zusammengefasst (Rausch & Greiner, 2004). Alle PMEI-RPs besitzen ein Molekulargewicht um die 17 kDa, vier Cysteine, die zwei essentielle Disulfidbrücken ausbilden und eine relativ ähnliche dreidimensionale Struktur, die sich aus einem Kern von vier α -Helices und einer N-terminalen liegenden spiralförmigen Erweiterung zusammensetzt (Camardella *et al.*, 2000). Durch das Herstellen von PME-Invertase Inhibitor Chimären wurde von Hothorn *et al.* (2004) versucht, die Funktion der N-terminalen Erweiterung zu identifizieren (Hothorn *et al.*, 2004a; Hothorn *et al.*, 2004b). Die Autoren kamen zu dem Ergebnis, dass die Extension eine kritische Rolle während der PME Bindung spielen soll und wichtig für die

Interaktion von PMEIs mit PMEs ist. Vor kurzem konnte Di Matteo *et al.* (2005) jedoch zeigen, dass während der Bindung des Kiwi PMEI mit einer Tomaten PME die N-terminale Erweiterung vom Enzymkomplex wegzeigend frei in Lösung ist und scheinbar nicht für die PMEI-PME Bindung erforderlich ist (Di Matteo *et al.*, 2005). Die Stabilität des Enzym-Inhibitor Komplexes ist meist pH abhängig und sinkt im basischen. Ab einem pH Wert von ca. 8,5 bilden sich keine Komplexe mehr (D'Avino *et al.*, 2003).

2.2.4.5 Die Rolle von PMEs und PMEI-RPs während der Pollenentwicklung: Der Pollenschlauch als Modellsystem zur Identifizierung von Pektinstoffwechselfvorgängen während des gerichteten Spitzenwachstums

Durch Transkriptom-untersuchungen konnte gezeigt werden, dass PME Transkripte besonders häufig in Pollen vorkommen (Becker *et al.*, 2003; Honys & Twell, 2003; Lee & Lee, 2003; Pina *et al.*, 2005). Mit Hilfe des Affymetrix ATH1 Genomarray, das 60 von den 66 bekannten putativen PME Genen aufweist, konnte ebenfalls gezeigt werden, dass einige PME Gene zu den am häufigsten vorkommenden Transkripten in Pollen gehören (Pina *et al.*, 2005).

Der Pollenschlauch besitzt ein äußerst schnelles gerichtetes Spitzenwachstum, das durch unterschiedlichste Faktoren reguliert werden kann (s.o.). Die Effekte dieser Faktoren führen nicht nur zu Veränderungen innerhalb der Pollenschlauchspitze, sondern auch zu Veränderungen in der Pollenschlauchwand. Die Spitze besteht fast ausschließlich aus einem Pektinnetzwerk (Ferguson C, Teeri TT, Siika-aho M, Read SM, Bacic A, 1998), in das ständig neues Zellwandmaterial sekretiert und eingebaut wird (Li *et al.*, 1997; Taylor & Hepler, 1997). Während dieses Prozesses müssen permanent Plasmamembranbestandteile und möglicherweise Zellwandkomponenten recycelt werden. Vor kurzem erschienen mehrere Veröffentlichungen, in denen gezeigt wurde, dass für ein korrektes Pollenschlauchwachstum eine kontrollierte Pektinmodifizierung durch PMEs erforderlich ist (Bosch *et al.*, 2005; Bosch & Hepler, 2006; Jiang *et al.*, 2005). Die Überexpression der Tabak PME NtPPME1 oder Zugabe exogener PME führt zum Arrest des Pollenschlauchwachstums. An der Spitze lässt sich normalerweise nur stark methylesterifiziertes Pektin nachweisen. In den NtPPME1 überexprimierenden Pollenschläuchen ist das Pektin an der Pollenschlauchspitze demethyliert und die Zellwand verdickt (Bosch *et al.*, 2005; Bosch & Hepler, 2006; Jiang *et al.*, 2005; Parre & Geitmann, 2005a). Vermutlich ist es durch die vorzeitige Demethylierung des Pektins zur Bildung von Ca²⁺ Quervernetzungen und damit zu einer Verfestigung der Zellwand gekommen. Immunhistochemische Untersuchungen zeigen, dass kurz hinter der

Pollenschlauchspitze die Methylierung der Pektinmatrix nachlässt und die Flanken fast nur noch aus Demethylesterifizierten Pektinen besteht (Lenartowska *et al.*, 2001; Stepka *et al.*, 2000). Die Flanken können sich also verfestigen und den Pollenschlauch stabilisieren, während die Pollenschlauchspitze noch in der Lage ist die Richtung vorzugeben. Dieser Prozess setzt eine Regulierung der pektinmodulierenden Enzyme voraus. Die Funktionen der PME1-RP homologen Pro-Domäne von Typ I PMEs konnten vor kurzem durch den Einsatz von Protein-Fluoreszenz-Reporter Chimären zum Teil aufgeklärt werden (Bosch *et al.*, 2005). Die Pro-Domäne der Tabak NtPPME1 inhibiert zum einen die enzymatische Aktivität der PME-Domäne, wird aber auch für die korrekte Lokalisierung benötigt. Das Signalpeptid alleine reicht nicht aus, um NtPPME1 in die Zellwand zu dirigieren. Wann es zur Prozessierung von Typ I PMEs kommt, ist noch unklar: entweder vor der Sekretion in die Zellwand oder kurz danach (Micheli, 2001).

3 Zielsetzung

Eine der Hauptkomponenten in der Zellwand des Pollens ist Pektin. Der Methylierungsgrad der Homogalacturon-Komponenten weicht dabei in unterschiedlichen Bereichen des wachsenden Pollenschlauches stark voneinander ab. Während an der Pollenschlauchspitze das Pektin stark methyliert ist, nimmt der Anteil an demethyliertem Pektin mit zunehmender Entfernung von der Pollenschlauchspitze zu. Der Methylierungsgrad beeinflusst die mechanischen Eigenschaften der Pollenschlauchwand. Damit kommt der Regulation der für die Deesterifizierung verantwortlichen Pektin Methylesterasen (PMEs) eine zentrale Bedeutung zu. In Pflanzen kommen PME-Enzyme als große Genfamilie vor und auch im Pollen werden mehrere PME-Isoformen exprimiert. Vor kurzem wurden die ersten pflanzlichen Pektin-Methylesterase-Inhibitoren (PMEI) kloniert und ihre Expression in Pollen wurde für *Arabidopsis thaliana* nachgewiesen. Bemerkenswerterweise zeigen die Proteinsequenzen dieser PMEI eine signifikante Sequenzähnlichkeit zur N-terminalen Prodomäne der so genannten Typ I PMEs. Damit ergibt sich folgendes Szenario: Der Methylierungsgrad der Pektinmatrix des wachsenden Pollenschlauches wird über Pektin Methylesterasen reguliert, wobei verschiedene PME-Isoformen entweder unter der Regulation einer autoinhibitorischen Domäne stehen, oder Zielprotein eines PMEI sein können. Da bis zum Beginn der Arbeit dieser Sachverhalt noch nicht untersucht wurde, sollte versucht werden, putative Mais PMEIs und PMEs zu identifizieren, zu charakterisieren und möglicherweise eine Funktion der beteiligten Proteine während des Pollenschlauchwachstums nachzuweisen.

Das Mais-System wurde aufgrund folgender Kriterien ausgesucht:

Es handelt sich um eine weltweit verbreitete Kulturpflanze, die in weiten Teilen der Welt als Grundnahrungsmittel angebaut wird. In Europa und Nordamerika wird Mais hauptsächlich als Viehfutter angebaut. Im Jahr 2005 wurden laut Statistik der FAO (Food and Agriculture Organization) weltweit 701,7 Millionen Tonnen Mais produziert. Damit liegt Mais vor Weizen (629,6 Mio. t) und Reis (618,4 Mio. t). Mais ist also eine weit verbreitete Pflanze mit hohem wirtschaftlichem Nutzen. Dieser Nutzen lässt sich z.B. durch die Erforschung von Stoffwechselfvorgängen während der Bestäubung und Befruchtung optimieren. Möglicherweise ließen sich so Verfahren zur Aufhebung von männlicher Sterilität bei Hybridmais und anderen Nutzpflanzen entwickeln. Für die Erforschung solcher Grundlagen bietet das Maissystem den Einsatz zahlreicher zellbiologischer und biochemischer Methoden. Im folgenden werden einige der Möglichkeiten, die zur Aufklärung des Pektinstoffwechsels in Pollen herangezogen werden können,

dargestellt.

Es lassen sich relativ einfach große Mengen an Maispollen ernten und weiterverarbeiten. Dank hervorragender Mais EST-Sequenzinformationen und Datenbanken lassen sich Online sehr schnell sequenzbezogene Untersuchungen durchführen. Mögliche Kandidatengene können durch Partikelbeschuss in Pollen bzw. andere Gewebearten eingebracht werden. Durch eine Veränderungen des Phänotyps lassen sich so in vielen Fällen Funktionen des Kandidatenproteins ermitteln bzw. *in Silica* Ergebnisse bestätigen. Durch die Koppelung des Kandidatenproteins an ein z.B. fluoreszierendes Reporterprotein lässt sich in vielen Fällen auch noch die Lokalisation und möglicherweise Funktion in der Zelle bzw. im Gewebeverband bestimmen. Lokalisation und Phänotyp können also wertvolle Informationen für das Verständnis von Kandidatenproteinen liefern. Die Größe des Maispollens erleichtert desweiteren die Durchführung von histologischen, ultrastrukturellen und histochemischen Untersuchungen.

4 Material und Methoden

4.1 Pflanzenmaterial

4.1.1 Anzucht von *Zea mays* Pflanzen der Sorte „Lixis“

Im Rahmen der Arbeit wurden Maispflanzen der Sorte *Zea mays* „Lixis“ im Freiland und im Gewächshaus angezogen. Die Anzucht von Maiskeimlingen erfolgte in Minigewächshäusern auf nassem Küchenpapier. Zur Anzucht von Mais in Erde wurden Maiskörner direkt in Schalen mit Erde gepflanzt und regelmäßig gegossen. Zur Bestäubung wurde frischer Maispollen auf frisches Narbengewebe gegeben.

Die reifen Pollen wurden während der Blütezeit mehrmals am Tag in einem großen Becherglas geerntet und anschließend gewogen. Proben, die nicht sofort verwendet werden konnten, wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt. Neben Maispollen wurden noch verschiedene andere Proben wie z.B. Entwicklungsstadien von Antheren, intakte bzw. leere Pollensäcke, mit Pollen bestäubtes bzw. unbestäubtes Narbengewebe, Blattproben und verschieden Samenproben genommen.

4.1.2 Pollenproben von *Nicotiana tobaccum*

Zur heterologen Expression von potentiellen PMEIRps und PMEs wurde wildtyp Tabakpollen der Sorte *Nicotiana tabacum* verwendet.

4.2 Isolation von Zellwandproteinen aus Maispollen bzw. aus aufgeschlossenen Zellen

Die Proben wurden gründlich in Flüssigstickstoff gemörsert bzw. in der Retsch-mühle pulverisiert und jeweils mit 1 ml / 500 mg Frischgewicht Extraktionspuffer versetzt. Nach 15 Minuten Zentrifugation bei 13000 rpm wurde der Überstand, welcher die löslichen Invertasen, PMEs und Zucker enthält, abgenommen. Das Sediment wurde drei Mal gewaschen durch Resuspension in Tris-Maleatpuffer und jeweils 15 minütiger Zentrifugation bei 13000 rpm. Da das erhalten Sediment recht locker ist, wird es anschließend bei 100k rpm in einer Beckmann Tischultrazentrifuge für 30 Minuten abzentrifugiert.

Um die Zellwandgebundenen Proteine zu eluieren wurde das Sediment in Salzelutionspuffer gelöst

und 30 Minuten bei 4°C geschüttelt. Nach 30 Minuten Zentrifugation bei 100k rpm wurde der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt.

Extraktionspuffer A: 0.1 M Maleinsäure und 0.1 Tris-base werden gegeneinander titriert bis ein pH von 7 eingestellt ist (~ 0,025 M Maleinsäure und 0,075 M Tris-base). Pro 50 ml Extraktionspuffer wird eine Tablette Complete™ Mini Protease Inhibitor Cocktail mit EDTA (Roche Diagnostics GmbH) gelöst.

Salzelutionspuffer: 1 M NaCl gelöst in Extraktionspuffer

4.3 Isolation der Zellwandproteine aus Maisblütengewebe zur Auftrennung in einer Gelfiltration

Für diese Isolation wurden unterschiedliche Proben wie z.B. Maispollen, Maispollen gekeimt, Pollen auf Narbengewebe gekeimt und Narbengewebe alleine herangezogen. Die Proben wurden ähnlich wie unter 4.2 aufgereinigt, jedoch wird hier ein Puffer gewählt, der die physiologischen Bedingungen der Pollenzellwand simulieren soll. Da sich die meisten PMEs und Zellwandinvertasen nur mit hohen Salzwerten eluieren lassen, wurde zu manchen Extraktionen noch KCl bis zu einer finalen Konzentration von 0,6 mM hinzugegeben. Nach Elution der Zellwandproteine wurde wieder auf den Extraktionspuffer B umgepuffert und die Probe konzentriert.

Die Proben wurden bis zu einer Proteinkonzentration von 1,5-2,5 mg/ml konzentriert und anschließend in Gelfiltrationen bzw. Inhibitionsversuchen eingesetzt.

Extraktionspuffer B: 50 mM MES Puffer pH 5,5, 250 mM KCl, 2 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 1 mM PMSF

Extraktionspuffer C: wie Extraktionspuffer B jedoch mit insgesamt 0,6 mM KCl

4.4 Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen nach Bradford

Basische Aminosäuren-Seitenketten von Proteinen bilden mit Coomassie Brilliant Blue G-250 Komplexe, die in Lösung blau erscheinen. Die Intensität der Färbung ist proportional zu der Menge Protein im Reaktionsansatz (Bradford, 1976). Das Absorptionsmaximum der Komplexe liegt bei 595 nm. Die Proteinkonzentration kann durch Messung der OD₅₉₅ im Vergleich mit einer Eichkurve bestimmt werden. 800 µl in H₂O verdünnte Proteinlösung (für Nullabgleich 800 µl H₂O verwenden) werden zu 200 µl filtrierter Bradford-Reagenz-Stocklösung pipettiert und 5 bis maximal 30 min inkubiert. Die Messung der OD₅₉₅ erfolgt am Spektralphotometer. Die Ermittlung der

Konzentration, einer Proteinlösung, erfolgt durch den Vergleich mit den Werten einer Eichkurve, die aus Verdünnungen eines Proteinstandards (BSA) erstellt wurde.

4.5 Proteinfällungen

4.5.1 Acetonfällung von Proteinen aus einer wässrigen Lösung

Bei der Acetonfällung wurden vier Volumen eiskaltes 100 %iges Aceton mit der Probe gemischt und mindestens eine Stunde bei -20 °C inkubiert. Die gefällten Proteine wurden anschließend 30 min bei 15.000 x g und 4 °C abzentrifugiert und das Sediment mit 90 % Aceton gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation (15 min bei 15.000 x g und 4 °C) konnte das Sediment kurz bei 37 °C getrocknet und in dem SDS-Probenpuffer (z.B. Rotiload, Roth) aufgenommen werden. Zur Verwendung in Enzymmessungen wurde das Sediment im jeweiligen Puffer aufgenommen.

4.5.2 Trichloressigsäure-fällung von Proteinen

Eine selektivere Fällung von Proteinen ist mit Trichloressigsäure (TCA) möglich. Dazu wurde die Probe mit 1/9 Volumen eiskalter 100 % TCA versetzt und 30 min auf Eis inkubiert. Die gefällten Proteine wurden wie nach der Acetonfällung abzentrifugiert und weiterbehandelt. Die Zugabe von Desoxycholat (4mg/ml) hilft auch sehr kleine Proteine, die sonst in Lösung bleiben, auszufällen.

4.6 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Proteine wurden über diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt (Laemmli, 1970). Dabei werden die Proteine im Sammelgel zu einer scharfen Bande fokussiert und im sich anschließenden Trenngel nach ihrem relativen Molekulargewicht aufgetrennt. Der Acrylamidgehalt des Sammelgels lag bei 4,5 % (w/v), die Trenngele wiesen dagegen 8 bis 15 % (w/v) Acrylamid auf. Der Gelansatz enthielt Acrylamid, Sammelgelpuffer (4 x Sammelgelpuffer: 0,5 M Tris-base, 0,4 % SDS, pH 6,8 (HCl)) bzw. Trenngelpuffer (4 x Trenngelpuffer: 1,5 M Tris-base, 0,4 % SDS, pH 8,8 (HCl)) und A. bidest. Zuletzt wurden Ammoniumperoxodisulfat und TEMED zugegeben, die die Polymerisationsreaktion starten. Es wurde zuerst das Trenngel gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Sobald das Gel auspolymerisiert war, wurde das Isopropanol entfernt, das Sammelgel gegossen und der Kamm für die Ausbildung der Probenaschen platziert. Die Proben wurden vor dem Auftragen kurz abzentrifugiert, um unlösliche Bestandteile zu entfernen. Außerdem wurde auf das Gel ein

Proteingrößenmarker (meist LMW Calibration Kit, Pharmacia) aufgetragen, um eine Größenbestimmung der Proteine nach dem Lauf zu ermöglichen. Der Gellauf erfolgte in 1 x Laufpuffer (20 mM Glycin, 2,5 mM Tris-base, 0,1 % SDS) bei 100 V im Sammelgel und 200 V im Trenngel bis die Bromphenolblaufront (aus Probenpuffer) aus dem Gel austrat.

Die Gele wurden entweder mit Coomassie gefärbt (6.7) oder in der „Western-Blot“ Analyse eingesetzt(6.8).

4.7 Proteinfärbungen

4.7.1 Coomassiefärbung von Gelen

Das Proteingel wurde nach der Gelelektrophorese mit in 0,2 % Coomassie Brilliant Blau G-250 in 45 % Ethanol (v/v), 10 % Essigsäure (v/v) für 30 bis 60 Minuten gefärbt. Die Gele wurden in der gleichen Lösung ohne Farbstoff entfärbt und anschließend in Aufbewahrungslösung (45 % (v/v) Methanol, 2,5 % (v/v) Glycerol) bei 4 °C gelagert oder zwischen Cellophan im Trockenschrank getrocknet.

4.7.2 Amidoschwarzfärbung

Die Amidoschwarzfärbung, auch Naphtolblau-färbung genannt, wurde benutzt, um Proteine nach dem immunologischen Nachweis direkt auf der PVDF- bzw. Nitrocellulose-Membran sichtbar zu machen. Eine kurze Inkubationszeit von 5 bis 10 Minuten in der Färbelösung (0,1% Naphtol Blue Black (Sigma-Aldrich), 20% Methanol, 7% Essigsäure) reicht aus um die Proteine sichtbar zu machen. Das Detektionslimit liegt bei ca. 100ng Protein.

4.7.3 Ponceaurotfärbung

Die Amidoschwarz-färbung lässt erst nach dem immunologischen Nachweis der Proteine einen Rückschluss auf die Proteinmenge und Proteinverteilung in der Probe zu. Nach einer solchen Färbung ist jedoch die Membran und die darauf befindlichen Proteine nicht mehr weiter zu verwenden. Um direkt nach einem „Western-Blot“-transfer auf einer PVDF- bzw Nitrocellulose-Membran die Proteine sichtbar zu machen wurden die Membranen direkt nach dem Proteintransfer in die Ponceaufärbelösung (0,2% Ponceau S, 3% TCA, 2% Sulfosalicylsäure) gelegt und für 5-10 Minuten gefärbt. Anschließend wurden die Membranen mit H₂O kurz gewaschen, eingescannt und mit 1x TBST gewaschen.

4.8 Western-Blot Analyse

Der „Western-Blot“ ermöglicht die Erkennung spezifischer Proteine. Eine Proteinmischung wird nach elektrophoretischer Auftrennung an eine Nitrocellulose-Membran gebunden und die Einzelkomponenten durch spezifische Antikörper identifiziert. Das „Western-Blot“-Gel wird entweder nass oder halbtrocken auf eine PVDF- bzw. Nitrocellulose-Membran transferiert (Immobilon P, Millipore; Fast-Blot, Biometra; Transblot SD Semi-Dry Transfer Cell, BioRad). Geblottet wird 30-45 Minuten bei 15 mA („Semidry“-Blot). Die Membran wird nach dem Transfer mit Ponceau S Lösung gefärbt, um den Transfer der Proteine zu überprüfen.

Anschließend wird die Membran ÜN bei 4°C oder 1h bei RT in Blockierungslösung (5% Magermilchpulver in TBST (100 mM NaCl, 20 mM Tris-base pH 7,5, 1 mM EDTA, 0,005% Tween-20)) abgesättigt. Alle weiteren Schritte erfolgen bei RT auf dem Schüttler. Zuerst erfolgt die 45 minütige Inkubation mit dem Erst-Antikörper in 2% Milch-TBST. Drei Waschschritten mit 1x Waschlösung, TBST, für 5 min folgt die Inkubation (45 min) mit dem Zweit-Antikörper (HRP-Konjugat 1:10000 verdünnt in 2% Milch-TBST). Nach drei weiteren Waschschritten in 1x Waschlösung inkubiert man die Membran mit SuperSignal™ Substrate (Lösung A und B vorher im Verhältnis 1 : 1 mischen) bei Verwendung eines Zweit-Antikörpers mit HRP-Konjugat (SuperSignal™ Substrate, Western Blotting Kit, Pierce). Der Membran wird in einer Autoradiographiekassette ein Hyperfilm™ aufgelegt. Die Expositionsdauer hängt von der Signalstärke ab und kann variiert werden.

4.9 Arbeiten mit *Escherichia coli*

Für alle Klonierungsarbeiten wurde der *E. coli* Stamm XL1-Blue (Stratagene) verwendet. Genotypische Besonderheiten: *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac[F'proAB lacI^q ZΔM15 Tn10(Tet^r)]^c.*

Zur Überexpression von Proteinen wurde der *E. coli* Stamm Rosetta-gami™ (Novagen) verwendet. Dieser besitzt das Plasmid pRARE (codiert für sechs tRNAs, die selten in *E. coli* genutzt werden, sowie eine Chloramphenicol-Resistenz zur Selektion). Zudem ist in diesem Stamm die Ausbildung von Disulfidbrücken durch Mutationen in den Thioredoxin (*trxB*) und Glutathion (*gor*) Reduktase Enzymen begünstigt. Genotypische Besonderheiten: *Δara-leu7697 ΔlacX74 ΔphoAPvu II phoR araD139 ahpC galE galK rpsL F'[lac⁺(lacI^q)pro] gor522::Tn10 trxB::kan pRARE.*

4.9.1 Bakterienmedien

LB-Medium: 1 % Bacto Tryptone (Difco); 0,5 % Bacto Yeast Extract (Difco); 1 % NaCl, pH 7 (NaOH); Low Salt LB: wie LB, aber nur 0,5 % NaCl.

TB-Medium (für Proteinüberexpression): TB I und TB II getrennt ansetzen und erst nach dem Autoklavieren 1 Teil TB I mit 9 Teilen TB II mischen. TB I: 0,17 M KH_2PO_4 , 0,72 M K_2HPO_4 . TB II: 12 g Tryptone, 24 g Hefeextrakt, 4 ml Glycerol, ad 900 ml mit H_2O .

Für Festmedien wurde zusätzlich 1,5 % Agar eingewogen. Der Zusatz von Antibiotika erfolgte nach dem Autoklavieren und Abkühlen auf circa 60 °C unter sterilen Bedingungen mit folgenden Endkonzentrationen: Ampicillin: 100 mg/l; Kanamycin: 50 mg/l; Spectinomycin: 100 µg/ml; Zeocin: 20 µg/ml (in „Low Salt“-LB); Chloramphenicol: 34 µg/ml

4.9.2 Herstellung einer Glycerin-Bakterienstocklösung

Die Bakterien (z.B. transformierte XL1-Blue) werden auf einer LB_{Amp} -Platte ausplattiert und ÜN bei 37°C inkubiert. Von dieser Platte impft man eine Übernachtskultur (10 ml LB_{Amp} -Medium) an und inkubiert ÜN bei 37°C bei 180-200rpm auf dem Schüttler. Zu 500 µl 70% Glycerin-Lösung gibt man 500 µl Bakteriensuspension, mischt gut und lagert diese Bakterienstocklösung bei -80°C, wo sie für mehr als 2 Jahre haltbar ist.

4.9.3 Herstellung elektrokompetenter *E. coli*-(XL1-Blue)-Zellen

Es wurden 500 ml Low Salt LB-Medium mit 10 ml *E. coli* Übernachtskultur angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ nm von 0,7 bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurde die Kultur auf Eis gekühlt und 15 min bei 2.500 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Bakterien in 500 ml eiskaltem A. bidest (alle Lösungen steril) resuspendiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt bei 2.500 g und 4 °C für 15 min, wurde das Sediment in 250 ml eiskaltem A. bidest resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Sediment in 20 ml 10 % Glycerin resuspendiert. Die Bakterien wurden wieder 15 min bei 2.500 g und 4 °C zentrifugiert und das Sediment schließlich in 2 ml 10 % Glycerin resuspendiert. Die Bakterien wurden nun in 50 µl Aliquots auf Eppendorfgefäße verteilt und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bis zur Transformation bei -80 °C. Die Zellen wurden durch eine Kontrolltransformation mit pUC19 überprüft, wobei die Transformationseffizienz über 10⁸ cfu/µg DNA liegen sollte.

4.9.4 Elektroporation von *E. coli*

Die Elektroporation wurde in speziellen Küvetten (Innendurchmesser: 0,1 cm) mit dem „Gene PulserII“ (Bio-Rad) bei folgenden Geräteeinstellungen durchgeführt: 200 Ohm; 1,8 kV; 25 µF. Dazu wurden die kompetenten Zellen kurze Zeit auf Eis aufgetaut und zu 50 µl Bakterienlösung 0,5 bis 2 µl eines Ligationsansatzes oder reiner Plasmidlösung zugegeben. Nach einer Minute wurde das Gemisch aus Bakterien und DNA in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette gegeben und für mindestens 4,5 msek das elektrische Feld angelegt. Danach wurde sofort 1 ml SOC-Medium in die Küvette gegeben und gut durchmischt. Die Suspension wurde in ein Eppendorfreaktionsgefäß überführt und 1 h bei 37 °C inkubiert. Je nach Ansatz wurden variable Volumina auf Selektionsplatten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

SOC-Medium: 20 g/l Bacto Tryptone (Difco); 0,5 g/l Bacto Yeast Extract (Difco); 0,5 g/l NaCl; 0,186 g/l KCl; 2,03 g/l MgCl₂; 3,96 g/l Glucose (Monohydrat), pH 7,0

4.9.5 Proteinexpression der vier rekombinanten Pektin-Methylesterase-Inhibitor-verwandten-Proteine PME1-RP1 bis PME1-RP4 in *E. coli*

Zur Expression von rekombinanten Proteinen in *E. coli* wurde in dieser Arbeit das QIAexpress pQE-System (Qiagen) verwendet.

Aus einer elektro-transformierten *E. coli* Kultur (Rosetta-gamiTM), die das entsprechende Expressionsplasmid (siehe Vektorliste) enthält, wird jeweils eine 50 ml ÜNK in LB_{Antibiotikum} ,Chloramphenicol mit 0,6 % Glukose bei 37 °C angelegt. Diese ÜNK wird nun in ein größeres Volumen LB mit 0,6 % Glukose überführt. Das Verhältnis von ÜNK zum neuen Medium sollte ca. 1/30 für eine Inkubation bei 18 °C betragen. Die Bakteriensuspension wird bis zu einer OD_{600nm} von 0,8-1 wachsen gelassen. Nun wird eine Probe von 200 µl genommen, die als Nullprobe dient. Gleichzeitig wird ein Teil des Volumens in einen neuen Kolben überführt, der als negative Kontrolle zur nun folgenden Induktion dient. Induziert wird mit 0,1–1 mM IPTG (Isopropyl-β-D-Thiogalactosid). IPTG bindet an das lac Repressorprotein und inaktiviert dieses. Ist der lac Repressor einmal inaktiviert, können von der RNA-Polymerase stromaufwärts gelegene Sequenzen transkribiert werden. In verschiedenen Zeitabständen, meist 2h + 4h + 6h + ÜN, werden nun Proben von 200 µl von dem induzierten und nicht induzierten Ansatz entnommen. Diese werden bei 4500 Upm für 5 min in der Tischzentrifuge abzentrifugiert und der Überstand wird verworfen. Die Sedimente werden mit 200 µl 2x Probenauftragspuffer (mit DTT) versetzt und 1/8 der Probe (25µl) in der SDS-PAGE analysiert, 1/40 (5µl) im Western Blot.

Die vier PME1-RPs wurden nach Vortests in zwei Liter TB-Medium bei 18 °C für 16-18h bei 200Upm induziert. Die Bakterien wurden anschließend bei 18 °C und 200upm geerntet, mit 200ml Waschpuffer (500mM NaCl, 50mM NaPO₄, 25mM Imidazol, 10% Glycerol, pH 7,5) gewaschen und mit einer „French Press“ (EmulsiFlex-C5, Avestin) bei 70-100 MPa aufgeschlossen. Unlösliches Protein wurde 45min lang bei 22000g abzentrifugiert und anschließend in eine IMAC-Säule, die mit 2-3ml Ni-NTA Agarosematrix (Qiagen) gefüllt ist, gegeben. Nach Bindung des 6_{His}-markierten rekombinanten Proteins an die Matrix, wurde diese mit 300ml Waschpuffer gewaschen. Das gereinigte Protein wurde schließlich in 10 1ml Fraktionen eluiert (500mM NaCl, 50mM NaPO₄, 250mM Imidazol, 10% Glycerol, pH 7,5).

4.9.6 Proteinexpression verschiedener Pektin-Methylesterasen und PME-Fragmente in *E. coli*

Siehe Tabelle 3.2. Es wurden verschiedene Vektoren und Bakterienstämme ausgetestet. In keinem Expressionsversuch konnte rekombinantes Pektin Methylesterasen Protein nachgewiesen werden.

4.10 Arbeiten mit *Pichia pastoris*

4.10.1 *Pichia pastoris* Medien

YPD: 1% Hefe Extrakt, 2% Peptone, 2% Dextrose

YPDS: 1% Hefe Extrakt, 2% Peptone, 2% Dextrose, 1 M Sorbitol

BMGY: 1% Hefe Extrakt, 2% Peptone, 100 mM Kalium Phosphat Puffer pH 6, 1,34% Hefe Stickstoff Basis (YNB) w/o Ammonium Sulfat, 1 % (w/v) Ammonium Sulfat, 4*10⁻⁵% Biotin, 1% Glycerol

BMMY: 1% Hefe Extrakt, 2% Peptone, 100 mM Kalium Phosphat Puffer pH 6, 1,34% Hefe Stickstoff Basis (YNB) w/o Ammonium Sulfat, 1 % (w/v) Ammonium Sulfat, 4*10⁻⁵% Biotin, 1% methanol

4.10.2 Herstellung von elektrokompetenten *Pichia pastoris*

Die Hefen wurden in 500 ml YPD Medium bis zu einer OD₅₉₅ von 1,5 angereichert und anschließend mit 1500 x g bei 4°C geerntet. Die Hefen werden zwei mal mit je 500 ml eiskaltem sterilen Bidest und 20 ml eiskaltem 1 M Sorbitol gewaschen. Die Hefen wurden schließlich in 4 ml Sorbitol aufgenommen und in 80 µl Aliquots aufgeteilt. Die beste Transformationseffizienz hatten

die kompetenten Hefen direkt nach Herstellung. Die restlichen wurden in Flüssigstickstoff schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt.

4.10.3 Elektroporation von *Pichia pastoris*

Die Hefen wurden auf Eis mit $5\ \mu\text{g}$ des gewünschten zuvor linearisierte pPICZalphaA Plasmids versetzt. Die Elektroporation wurde in $0,2\text{cm}$ Küvetten mit dem „Gene PulserII“ (Bio-Rad) bei folgenden Geräteeinstellungen durchgeführt: $1,5\ \text{kV}$, $200\ \Omega$, $25\ \mu\text{F}$. Anschließend wurden die Hefen in $1\ \text{ml}$ $1\ \text{M}$ sterilem Sorbitol bei 30°C für zwei Stunden geschont. Die Selektion von transformierten Hefen erfolgte auf YPDS Platten die mit $100\ \text{mg/l}$ Zeocin versetzt wurden.

4.10.4 Proteinexpression in *Pichia Pastoris*

Die Hefeklone wurden bei 30°C in $50\ \text{ml}$ BMGY Medium ÜN angezogen und am nächsten Tag mit $1500 \times \text{g}$ geerntet. Anschließend wurde das Sediment mit $100\ \text{ml}$ BMGY Medium resuspendiert und für 2-5 Tage bei 28°C kultiviert. Zur Proteinexpression wurde das Medium mit 1% Methanol alle 24h komplementiert. Der Überstand mit dem rekombinanten Protein wurde anschließend geerntet und zur Proteinfällung mit 80% Ammonium Sulfat versetzt. Das erhaltene Sediment wurde in Bindungspuffer ($300\ \text{mM}$ NaCl, $50\ \text{mM}$ Phosphat Puffer pH 7,5) aufgenommen und über eine Nickel-Ionen-Säule gereinigt.

Zur Identifizierung von positiven Klonen wurden die Hefen im kleinen Maßstab angezogen und im Western-Blot mit anti-myc Antikörpern analysiert.

4.11 Affinitätsreinigung von Antiseren

Um Antikörper zu reinigen bzw. aufzukonzentrieren, nutzt man die spezifische Bindung zwischen Antigen und Antikörper aus. Die Antigen-Antikörper-Bindung kann durch Veränderung der Ionenkonzentration, des pHs etc. wieder gelöst werden. Polyklonales Kaninchenserum enthält ca. $8 - 16\ \text{mg}$ Immunglobulin. Davon sind ca. 1% spezifisch gegen das zum Immunisieren gerichtete Epitop als IgG vorhanden. Die unspezifischen Antikörper können z.B. in „Western-Blots“ zu einer Vielzahl von Banden, die die spezifische(n) überlagern, führen.

Das PMEI-RP3-Antiserum, das PMEI-RP2, PMEI-RP3 und PMEI-RP4 detektiert, wurde mit rekombinanten PMEI-RP3 Protein affinitätsgereinigt. Ca. 2mg des rek. Proteins in Koppelungspuffer ($0,1\text{M}$ NaHCO_3 , $0,5\text{M}$ NaCl, pH 8,3) werden mit $0,5\text{g}$ vorbereiteter CNBr-aktivierter Sepharose 4B versetzt und eine Stunde bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Matrix

in eine Econo-Pac-Säule überführt, mit Koppelungspuffer gewaschen und verbliebene Bindungsstellen gegen Amine mit 10ml 100mM Tris-HCl, pH 8 für 2h bei RT abgeblockt. Schwach gebundene Proteine wurden durch abwechselndes Waschen (3x) mit 10ml 100mM Natrium Acetat, 500mM NaCl, pH4,5 und 10ml 100mM Tris-HCl, 500mM NaCl, pH 8 entfernt.

Die Matrix wird in 1x TBS (20mM Tris, 150mM NaCl, pH 7,4) überführt und bei 4°C gelagert.

5ml des Antiserums werden mit 500µl 10x TBS versetzt und ÜN bei 4°C mit der vorbereiteten Sepharose 4B-PMEI-RP3 Matrix inkubiert. Nicht gebundene Antikörper werden durch Waschen mit 1x TBS entfernt. Anschließend werden die spezifischen Antikörper in 500µl Fraktionen mit Elutionspuffer (200mM Glycin, 1mM EGTA, pH 2,8) eluiert. Der saure pH wurde durch Zugabe von 1/10 Volumen 200mM Tris, pH 8,5 neutralisiert. Zur Stabilisierung und Konservierung wurden den Fraktionen 0,1mg/ml BSA und 0,02% NaN₃ zugesetzt. In den ersten Fraktionen eluieren Antikörper mit einer relativ schwachen spezifischen Bindung gegen PMEI-RP3. In den späteren Fraktionen eluieren PMEI-RP3 Antikörper mit einer relativ starken spezifischen Bindung gegen PMEI-RP3. Je nach Fragestellung hat man verschiedene PMEI-RP Antikörper zur Verfügung. Im Western-Blot wurden Verdünnungen von 1:200 bis 1:1000 verwendet.

4.12 Lektin Chromatographie

Zur Aufreinigung von glycosilierten Proteinen wurden Pflanzenlysate über eine Concanavalin A (ConA) Sepharose Matrix gegeben. Pflanzenproben wurden in 1x ConA Puffer (50mM Na Acetat, 1mM CaCl₂, 1mM MgCl₂, 1mM MnCl₂, 1mM PMSF, pH 6,3) aufgenommen, der Überstand nach Zentrifugation mit der ConA-Sepharose gemischt und für 1h bei RT inkubiert. Die Suspension wurde in eine Säule gegeben und die nicht-glykosilierten Proteine im Durchfluss aufgefangen. Die Matrix wird mit 50ml 1x ConA-Puffer gewaschen und die gebundenen Proteine anschließend mit ConA-Puffer und 15% methyl- α -D-Glucopyranosid eluiert.

4.13 Größenausschluss-Flüssigkeitschromatographie

Zum Auftrennen von Protein und Proteinkomplexen wurden verschiedene Pflanzenproben auf eine Sephadex G100F Säule (BIO-RAD) und über eine Superdex200 Hiload16/60 Säule (Pharmacia) geladen. Im folgenden werden die Daten der Pharmacia Anlage beschrieben. Das System bestand aus einer P-500 Kolbenpumpe, einer Superdex200 Säule (120ml Volumen), einem UV-MII UV-Meter und dem Fraktionssammler Frac-100. Die Ergebnisse und das System wurden mit der Software „FPLC-Director V.1.1“ bearbeitet bzw. konfiguriert. Alle verwendeten Puffer wurden

sterilfiltriert (0,2µm filters) und entgast. Während einem Pufferwechsel wurde die Säule mit mindestens 2 Säulenvolumen des neuen Puffers equilibriert. Proben wurden mittels einer 1ml Probenschleife auf die Säule geladen.

Pflanzenextrakte wurden in MES-Puffer (50mM MES pH 5,5, 250mM KCl, 5mM MgCl₂, 1mM CaCl₂), rekombinante Proteine in NaPO₄-Puffer (50mM NaPO₄, 300mM NaCl, pH 7,5) aufgetrennt. Die Fraktionen wurden entweder in Enzymmessungen verwendet oder aber für Western-Blot Versuche mit Aceton bzw. TCA sedimentiert. Das Acetonsediment wurde direkt in SDS-Probenauftragspuffer aufgenommen. Das TCA-Sediment wurde einmal mit Aceton gewaschen und ebenfalls in SDS-Probenauftragspuffer aufgenommen.

4.14 Ballistische Transformation

Zur ballistischen Transformation von Zellen wurde die Partikelkanone Biolistic PDS-1000/He (Bio-Rad) nach Anleitung des Herstellers verwendet. Dabei werden mit DNA beladene Goldpartikel unter hohem Druck auf das Gewebe geschossen. Dringt der DNA-beladene Artikel im Bereich des Zellkerns in die Zelle ein, kann es zu einer Expression der DNA und damit transienten Transformation der Zelle kommen.

4.14.1 Funktionsprinzip der 'Particle Gun'

Plasmid-DNA wird auf kleinste Wolframpartikel bzw. Goldpartikel (1,3 µm bzw. 1,6 µm) aufgebracht. Diese gelangen bei starker Beschleunigung unter Zerstörung der Zellwand in die Zelle und ihren Kern. Hier kommt es zur Expression der eingebrachten Gene.

Die Partikelkanone besitzt eine Überdruckkammer, die durch eine Berstscheibe von der unteren Unterdruckkammer getrennt ist. In der unteren Kammer wird das zu transformierende Pflanzenmaterial positioniert und ein Vakuum angelegt. In der oberen Kammer wird mittels Helium ein Überdruck erzeugt. Sobald die Druckdifferenz zwischen den Kammern einen für die Berstscheibe charakteristischen Wert erreicht, zerreißt diese. Es entsteht eine nach unten gerichtete Druckwelle, die einen mit Wolframpartikeln (Microcarrier) beladenen Macrocarrier beschleunigt. Dieser fliegt nach unten, bis er auf ein Stopnetz trifft. Die Microcarrier selbst gelangen durch die Maschen des Netzes und fliegen nahezu ungebremst auf die Zellen.

4.14.2 Partikelpräparation

60 mg Goldpartikel (1-1,6 μm) wurden in 1 ml 100 % Ethanol 2 min gevortext, abzentrifugiert, 2mal mit sterilem Bidec gewaschen und in 1 ml 50 % Glycerol aufgenommen.

Zur Präparation eines Doppelschusses wurden unter kontinuierlichem vortexen 25 μl der Goldpartikellösung mit 2-5 μg DNA (nicht mehr als 10 μl) kombiniert. Darauf folgten 25 μl CaCl_2 (2,5 M) und 10 μl Spermidin (0,1 M) und es wurde weiter für 2 min gevortext. Nach kurzem Abzentrifugieren (max. 4000 rpm) wurde der Überstand entfernt und das Pellet in 200 μl 100 % Ethanol resuspendiert. Nach erneutem Abzentrifugieren wurde der Ethanol entfernt und durch frische 15 μl ersetzt. Anschließend wurde das Pellet durch 2 min Sonifikation im Wasserbad und heftigem Pippettieren gelöst und jeweils 8 μl auf die Mitte der Makrocarrier (Bio-Rad) verteilt. Die Partikel sollten dabei möglichst gut verteilt sein, um eine Streuung beim Beschuss zu erreichen.

4.14.3 Transformation von *Nicotiana tabacum* Pollen

10xSalze: 10mM CaCl_2 , 10mM KCl, 8mM MgSO_4 , 16 mM H_3BO_3 , 300 μM CuSO_4

2xPTNT (steril filtriert): 10 % Saccharose, 0,6% MES (15mM), 0,06 % Casein acid-hydroxylase (1,5%, Sigma), 2x Salz, 20 mg/l Rifampicin, 25 % PEG-6000

PTNT-5 cm-Petrischalen: 25 ml 2x PTNT, 25 ml Phytigel (0,5 %, Sigma)

4.14.4 Pollenkeimung

Die Keimung von Tabakpollen wurde im Zusammenhang mit deren ballistischer Transformation durchgeführt. Es wurde das Pollenkeimmedium PTNT verwendet. Alle Antheren einer Blüte wurden in 5 ml 1x-PTNT-Medium gegeben und kräftig gevortext. Um die Antheren zu entfernen, wurde der gesamte Ansatz sofort durch ein Sieb gegeben und gleich im Anschluss daran mittels Vakuumpumpe und Abnutschflasche auf eine mit Wasser angefeuchtete Filtermembran (Millipore, HAWP 047 00) gebracht. Diese wurde kopfüber auf eine PTNT-Platte gelegt. Beim anschließenden Abziehen der Membran blieben die Pollen auf der Platte haften. Die Transformation erfolgte unmittelbar nach dem Aufbringen der Pollen auf die Platte.

1x PTNT-Flüssigmedium(pollentube *Nicotiana tabacum*): 5 % Saccharose, 0,3 % MES (Sigma), 0,03 % Caseinacidhydrolysat (Sigma 'Amicase'), 1 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1 mM KCl, 0,8 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1,6 mM H_3BO_3 , 10 μM $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 10 mg/l Rifampicin (in Methanol) (Sigma), pH 5,9 mit KOH, 12,5 % PEG (BDH, specially purified)

PTNT wurde als 2x-Medium angesetzt, sterilfiltriert und bei 4°C gelagert. 1x PTNT entstand durch

Verdünnung des 2x PTNT mit A.bidest.

Pollenkeimplatten: 2x PTNT wurde im Wasserbad (90°C) erhitzt und 1:1 mit kochendem Phytigel (0,5%) (Sigma) gemischt. Es wurden sofort je 3 ml in eine Petrischale (5,5 cm) gegossen. Die Platten wurden bis zum Gebrauch bei 4°C gelagert.

4.14.5 Beschuss der Zellen

Die Transformation wurde unter der Sterilbank durchgeführt. Sämtliche Materialien waren autoklaviert oder mit absolutem Ethanol desinfiziert. Für jeden Schuss wurde eine Berstscheibe in ihre Halterung eingesetzt. Stopnetz und Macrocarrier wurden gemäß der Anleitung in ihre Halterung eingesetzt und im obersten Einschub der Unterdruckkammer positioniert. Das in der Unterdruckkammer angelegte Vakuum betrug 25 Inches Hg. Die Petrischalen mit den Pollen befand sich auf der Halterung im zweituntersten Einschub (Position 3, Abstand zum Macrocarrier 9 cm). Zum Beschuss der Pollen wurden Berstscheiben (Bio-Rad) verwendet, die bei 1100 psi reißen. Nach dem Beschuss wurde der Tabakpollen im Dunkeln inkubiert und in Schalen mit Parafilm umwickelt. Die Analyse der Tabakpollen erfolgte nach 6 bis 16 Stunden unter dem Mikroskop.

4.15 Mikroskopie

Fluoreszenz Mikroskopie

Der keimende Pollen wurden 6 bis 16 Stunden nach der transienten Transformation unter dem Lichtmikroskop analysiert. Der Pollen wurde hierfür mit der Oberseite auf ein Deckgläschen übertragen. Verwendet wurde ein Inverslichtmikroskop (DMIL, Leica). Bilder wurden mit einer angeschlossenen Digitalkamera und dem Software-Programm 'Analysis' aufgenommen. Zur Detektion der grünen Fluoreszenz des GFP wurde ein FITC-Filter verwendet: er lässt Anregungslicht der Wellenlängen von 450 nm bis 490 nm passieren. Die Emission ist durch einen 515 nm Langpassfilter auf die Wellenlängen oberhalb von 515 nm beschränkt. Das GFP leuchtet mit diesem Filter intensiv grün. RFP fluoresziert mit diesem Filter gelblich. Zur Detektion des RFP wurde der für das DsRed-Protein optimierte Filter XF 137-2 verwendet. Sein Anregungsbereich liegt bei 540 nm; durchgelassen werden Wellenlängen über 585 nm. RFP fluoresziert mit diesem Filter intensiv rot.

Confokale Laser Scanning Mikroskopie

Weitere mikroskopische Analysen wurden mit einem konfokalen Laser scanning Mikroskop (LSM510 Meta, Zeiss) durchgeführt. Die folgenden Anregungs- und Detektions-Wellenlängen

wurden verwendet:

GFP: Anregung 488nm; Nachweis: Breitband 505-530nm

RFP: Anregung 543nm; Nachweis: Breitband 560-615nm

YFP: Anregung 500nm; Nachweis: 535nm

CFP: Anregung 436nm; Nachweis: 480nm

4.16 PME Assay

Der verwendeten PME-Assay [67] basiert auf der Bildung von Methanol, das während der Demethylesterifizierung des Pektins von den PMEs abgegeben wird. Das Methanol (COOCH_3) kann mit Hilfe einer Alkoholoxidase (AO) zu Formaldehyd (CH_2O) umgesetzt werden, welches wiederum als Substrat für eine Formaldehyd-Dehydrogenase (FDH) dient, die daraus Formiat (COOH) bildet. Die bei der Dehydrogenierung des Formaldehyds freiwerdenden Elektronen werden zur Reduktion von NAD^+ zu NADH genutzt. Dieser Schritt lässt sich photometrisch bei 340 nm verfolgen.

Beispiel eines Assayansatzes (600 μl):

542,4 μl NAD^+ -Lösung (0,4 mM NAD in Natriumphosphat-Puffer pH 7,5)

4,8 μl FDH (= 0,2 U, Sigma F-1879)

48 μl Pektin-Lösung (0,5%ig in Bidest, Sigma P-9135)

4,8 μl AO (= 1 U, Sigma A-2404)

2-20 μl PME-Extrakt

Für ein Experiment wurden die 12fachen Menge des obigen Ansatzes ohne PME-Extrakt als Mastermix vorbereitet und auf Polystyrol-Küvetten verteilt. Anschließend wurde die entsprechende Menge PME-Extrakt zugegeben, schnell gemischt und im Photometer vermessen.

Zur Berechnung der PME-Aktivität in Katal wird die Steigung im linearen Bereich der Kurve bestimmt. Aus der Steigung wiederum lässt sich nach dem Lambert-Beer'schen-Gesetz der Umsatz an NADH berechnen ($\text{mol} = 6178$ für 1 mol NADH)

$$\Delta E = \epsilon_{\text{mol}} * c * d$$

c = Konzentration von hier NADH in mol/l

d = Schichtdicke der Küvette in cm (meist 1)

Gleichzeitig ist die Definition von Katal: 1 Katal = 1 mol/sec

Daraus lässt sich unter Berücksichtigung der eingesetzten PME-Extrakt- bzw. Pflanzenmaterial-Mengen die Aktivität in nKatal / mg FG bestimmen.

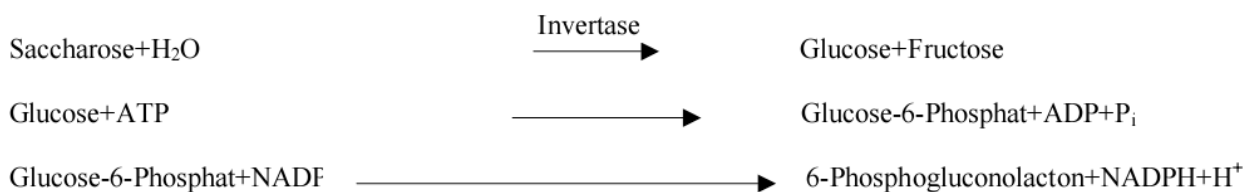
4.16.1 Inhibitionstest für PMEs

Die zu untersuchenden PME/ RP Proben/Fraktionen werden 30min mit den PME Proben/Fraktionen bei RT in MES-Puffer inkubiert. Dies soll die Bindung der Interaktionspartner sicherstellen. Die Bindung kann durch Substrat verhindert werden. Anschließend werden die Ansätze, wie oben beschrieben, im Photometer vermessen.

4.17 Invertase-Assay

Aktivitätsbestimmung und Inhibitionstests der Invertasen

Invertasen spalten das Disaccharid Saccharose in die Einfachzucker Glucose und Fructose. Es wird ein Messverfahren angewendet, bei dem man indirekt die entstehende Glucosemenge misst. Da Glucose selbst schwer photometrisch zu bestimmen ist, wird folgender gekoppelter Enzymtest verwendet:



Das entstehende NADPH absorbiert Licht der Wellenlänge 340 nm. Diese Absorption ist mit dem Photometer bestimmbar. Es wird also mit dem Photometer nach oben genannter Reaktion die OD gemessen. Die Extinktion gibt Aufschluss über die Menge an 340nm entstandener Glucose und damit über die Enzymaktivität der Invertase.

Durchführung der Messung

Saccharoselösung: 100mM Saccharose 0,342 g/10 ml

Stoplösung 1M NaPO₄-Puffer pH 7,2 : 37,9 g/l NaH₂PO₄ pH 7,2, 97,1 g/l NaH₂PO₄

Reaktionspuffer: 40mM TEA pH 7,2 mit KOH einstellen, 8mM MgSO₄·7H₂O

NADP-Lösung: 36mM NADP 19 mg/ml in ddH₂O

ATP-Lösung: 30mM 23,6 mg/ml in ddH₂O

Vorinkubationsansatz: 10-50 µl Invertasefraktion
[5-10 µl Inhibitor (unterschiedliche Konzentrationen)]
Ad 200 µl P1-Puffer
200 µl Endvolumen

Zuerst wird ein Vorinkubationsansatz vorbereitet. Dieser ist nötig, da evtl. endogenem bzw. zugesetztem Inhibitor Zeit gegeben werden muss, an die Invertase zu binden. Das Substrat stört diesen Prozess (Substratschutz des Enzyms) (Sander 1996).

Der Ansatz wird ca. 30 min bei 37°C leicht auf dem Wärmeblock geschüttelt.

Hydrolyse: Vorinkubationsansatz
+100 µl Saccharoselösung
300 µl Gesamtansatz

Dem Vorinkubationsansatz wird Saccharoselösung zugegeben, die eigentliche Enzymreaktion findet für 1 h bei 37°C statt.

Stop der Hydrolyse: Hydrolyseansatz
+30 µl Stoplösung
330 µl Endvolumen

Direkt nach dem Zugeben der Saccharoselösung für die Negativkontrolle oder nach einer Stunde Hydrolyse wird das Stopreagenz zur Neutralisation des pH-Wertes zugegeben und der gesamte Ansatz für 5 min bei 95°C denaturiert.

Danach kann die Lösung bis zur eigentlichen Messung bei -20°C auch längere Zeit gelagert

werden.

Messansatz: 20 µl NADP-Lösung
 20 µl ATP-Lösung
 2 µl Hexokinase/Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (3mg/ml Roche)
 20-100 µl des gestoppten Hydrolyseansatzes
Ad 1000 µl Reaktionspuffer
 1 ml Messansatz

Vor Zugabe des Hydrolyseansatzes kann man diesen nochmals kurz abzentrifugieren um evtl. Schwebeteilchen, die die Messung stören könnten, zu verhindern. Nach Zusammenpipettieren wird der Messansatz noch 15 min inkubiert. Danach erfolgt die Extinktionsbestimmung bei 340 nm Wellenlänge. Als Referenz dient eine Küvette mit P1-Puffer anstelle des Hydrolyseansatzes in der Messlösung. Berechnung der entstandenen Glucosemenge:

$$\text{Glucosemenge [nmol]} = \frac{E}{6,23} * \frac{V(\text{GesSH})}{V(\text{SH})} * V(\text{GesR})$$

E : OD_{340nm}

V(GesR) : Gesamtvolumen des Messansatzes[µl] (1000 µl)

V(SH) : Volumen des eingesetzten gestoppten Hydrolyseansatzes[µl] (20-100 µl)

V(GesSH): Gesamtvolumen des Hydrolyseansatzes[µl] (330 µl)

Berechnung der relativen Enzymaktivität:

$$\frac{\text{Glucosemenge [nmol]}}{T[\text{s}] (3600 \text{ s})} = \text{nkatal} * 1000 = \text{pkatal (pkat)}$$

Die Enzymaktivität in pkatal kann auf die Menge eingesetzten Materials bezogen werden, um die relative Enzymaktivität einer Proteinaufreinigung darzustellen.

4.18 DNA-Methoden

4.18.1 Isolierung von Plasmid DNA im kleinen Maßstab

Zur schnellen Identifizierung von positiven Bakterienklonen wurde das Protokoll zur alkalischen Lyse von Birnboim und Doly abgeleitet (Birnboim & Doly, 1979). Dazu wurden zunächst 1 bis 5 ml einer Bakterienübernachtskultur 1 min bei 15.000 x g sedimentiert und in 300 µl GTE-Puffer (50 mM Glukose, 25 mM Tris-base, 10 mM EDTA, pH 8,0) resuspendiert. Nach Zugabe von 300 µl Lysispuffer (200 mM NaOH, 1% SDS) wurden die Bakterien 5 min bei RT lysiert. Die Zugabe von 300 µl 3 M Kaliumacetat (pH 4,8) führte zum Ausfallen der genomischen DNA sowie Proteinen, die 15 min bei 15.000 x g abzentrifugiert wurden. Der resultierende Überstand wurde mit dem gleichen Volumen Isopropanol versetzt und die Plasmid-DNA 15 min bei 14.000xg und 4 °C abzentrifugiert. Das Pellet wurde mit 500 µl 70% (v/v) Ethanol gewaschen und nach 5 minütiger Zentrifugation bei 37 °C getrocknet. Die DNA wurde in der Regel direkt in dem Verdauansatz aufgenommen, dem außerdem RNase zugesetzt wurde.

4.18.2 Isolierung von Plasmid DNA über Ionenaustauschersäulen

Eine Minipräparation wurde ausgehend von 1 bis 2 ml Übernachtskultur mit dem QIAprep^R Miniprep Kit (QIAGEN) durchgeführt. Zur Gewinnung größerer Mengen Plasmid DNA wurde ausgehend von 50 oder 100 ml Übernachtskultur der QIAGEN^R Midi Kit (QIAGEN) verwendet.

4.18.3 Isolierung von genomischer DNA aus Pflanzenmaterial

Zur Isolation genomischer DNA wurden circa 20 bis 100 mg Gewebe in Flüssigstickstoff zerkleinert und mit 500 µl Extraktionspuffer (200 mM Tris-HCl pH 9, 400 mM LiCl, 25 mM EDTA, 1 % SDS) versetzt. Nach einer Zentrifugation für 5 min bei 15.000 x g wurden 350 µl des Überstandes mit dem gleichen Volumen Isopropanol gemischt und die genomische DNA 10 min bei 15.000 x g sedimentiert. Nach einem Waschschrift mit 70 % EtOH wurde das Sediment getrocknet und je nach Größe in circa 20 bis 50 µl ½ TE-Puffer aufgenommen. Die DNA wurde anschließend bei 4 °C bzw. -20°C gelagert.

4.18.4 Bestimmung der Konzentration und Reinheit von DNA (OD-Messung)

Die in die DNA eingebauten Basen absorbieren Licht verschiedenster Wellenlänge mit einem Absorptionsmaximum im UV-Bereich bei 260 nm. Dies macht man sich für die Konzentrations- und Reinheitsbestimmung zunutze. Um die Konzentration einer DNA-Lösung zu bestimmen, misst man die Absorption dieser Lösung bei einer Wellenlänge von 260 nm (OD260). Die Konzentration einer Lösung mit doppelsträngiger DNA berechnet sich dann wie folgt:

$$(\text{OD}_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 50) / 1000 = \text{DNA-Konzentration (in } \mu\text{g/ml)}$$

Berechnet man die Konzentration einer Lösung mit einzelsträngiger DNA (zum Beispiel die Konzentration von Oligonukleotiden für die PCR oder für Sequenzierungen), verwendet man die Formel:

$$(\text{OD}_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 33) / 1000 = \text{DNA-Konzentration (in } \mu\text{g/ml)}$$

Das Verhältnis von OD260/OD280 gibt Aufschluss darüber, wie rein die isolierte DNA tatsächlich ist, da z.B. Verunreinigungen durch Proteine eine höhere Extinktion bei 280nm ergeben. Liegt der Quotient zwischen 1,8 und 2,0, so ist die DNA-Lösung sehr rein und kann für weitere Experimente eingesetzt werden.

4.18.5 DNA-Fällung zur Reinigung und Konzentrierung

Gibt man Ethanol oder Isopropanol zu einer DNA-Lösung hinzu, so bildet sich in Anwesenheit einwertiger Kationen ein DNA-Präzipitat, das sich durch Zentrifugation sedimentieren lässt. Eine DNA-Lösung wird mit 1/10 Volumen einer 3 M Natriumacetatlösung pH 5,2 versetzt. Hinzu gibt man das 2,5-fache Volumen an absolutem Ethanol. Nach gründlichem Mischen fällt man mindestens 30 min bei -20°C. Fällt man mit Isopropanol, so wird die DNA-Lösung mit dem 0,7-fachen Volumen an Isopropanol versetzt und für 30 min bei RT inkubiert. Beide Fällungen ziehen eine 15-minütige Zentrifugation mit 15000 x g bei 4°C nach sich. Das Sediment wäscht man ein- bis zweimal mit 70%igem Ethanol und trocknet es für 2 min bei 37°C oder in einer „Speed Vac“. Aufgenommen wird es schließlich in 0,1-1x TE, pH 8,0 oder in H₂O.

4.18.6 Restriktion von DNA

Restriktionsenzyme sind bakterielle Restriktionsendonukleasen, die die DNA sequenzspezifisch schneiden, wobei 5'- bzw. 3'-Überhänge („sticky ends“) oder doppelsträngige DNA-Enden („blunt ends“) entstehen. Die Fragmentierung von DNA mit Restriktionsenzymen dient u.a. der Analyse

von Plasmiden und in präparativem Maßstab zur Gewinnung von DNA-Fragmenten zur *in vitro* Rekombination neuer Plasmide. Pro Mikrogramm zu verdauender DNA werden 1-5 „Units“ Restriktionsenzym eingesetzt. Das Endvolumen des Ansatzes (20-200µl) richtet sich nach der Menge des eingesetzten Enzyms, da die Glycerinkonzentration (die Enzym-Lagerpuffer enthalten bis 50% Glycerin) 10% nicht überschreiten sollte. Die vom Hersteller mitgelieferten, den Enzymen entsprechenden 10-fach konzentrierten Reaktionspuffer werden so eingesetzt, dass sie ein Zehntel des Ansatzvolumens betragen. Die Inkubationszeit (i.d.R. bei 37°C) beträgt zwischen 0,5 und 2 h, um einen vollständigen Verdau zu gewährleisten, kann auch ÜN verdaut werden.

4.18.7 Dephosphorylierung der 5'-Enden von DNA-Fragmenten mit alkalischer Phosphatase

Wird linearisierte Vektor-DNA für eine Ligation eingesetzt, so können die endständigen 5'-Phosphatgruppen mittels alkalischer Phosphatase (CIAP = Calf intestinal alkaline phosphatase) abgespalten werden, um eine intramolekulare Religierung des linearisierten Vektors bei der Ligation zu verhindern. 5-10 µg linearisierte Vektor-DNA werden sowohl mit 5 µl 10x CIAP-Dephosphorylierungspuffer als auch mit 3 µl CIAP (5 U/µg DNA) in einem Gesamtvolumen von 50 µl inkubiert. Alternativ wurden 5 µl 10x CIAP-Dephosphorylierungspuffer und 3 µl CIAP (5 U/µg DNA) direkt zu einem Restriktionsverdau-Ansatz (50 µl) pipettiert und mit H₂O auf ein Volumen von 100 µl eingestellt. Die Inkubationszeit beträgt mindestens eine Stunde und erfolgt bei 37°C. Vor der Ligation mit dem "Insert" erfolgt eine Reinigung des Vektors

4.18.8 Ligation von DNA Fragmenten

Das Enzym DNA-Ligase (Roche) des Bakteriohagen T4 katalysiert in Anwesenheit von ATP die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen benachbarten 3'-Hydroxyl- und 5'-Phosphatgruppen doppelsträngiger DNA. Pro Ligationsansatz wird die Ligasekonzentration üblicherweise auf 1 U/10 µl eingestellt. An Vektor-DNA werden 100-200 ng eingesetzt und die 4-5 fache Molarität an Insert-DNA. Es wird 1µl des vom Hersteller mitgelieferten 10-fach Puffers zugegeben und das Endvolumen mit sterilem bidest. Wasser auf 10 µl eingestellt. Der Ansatz wird entweder bei 4°C für 4 h oder bei 16°C im Wasserbad ÜN inkubiert.

4.18.9 RNA-Reinigung und cDNA Synthese

Zur Herstellung von cDNA wurde aus den entsprechenden Geweben Gesamt-RNA über einen RNA-Extraktionskit (RNeasy Plant Mini Kit, Quiagen) isoliert. Dabei erfolgte auf der Säule ein DNase-Verdau, um eine Kontamination der RNA mit genomischer DNA auszuschließen. Nach photometrischer Konzentrationsbestimmung wurden jeweils 2 µg Gesamt-RNA unter Verwendung der Omniscript^R Reversen Transkriptase (Quiagen) mit einem Oligo-dT Primer nach Herstellerprotokoll in cDNA umgeschrieben. Um einer Degradation der RNA vorzubeugen, wurde den Reaktionen jeweils RNaseOUTTM (Invitrogen) zugesetzt. Die cDNA wurde anschließend kurz denaturiert und in Aliquots bei -20 °C gelagert.

4.18.10 PCR-Techniken

Zur Anreicherung von bestimmten Sequenzbereichen wurden die Taq-, Pfu- und Vent-Polymerase sowie die zugehörigen Puffer von Invitrogen, Promega bzw. NEB verwendet. Ein Standard-PCR Ansatz setzte sich zusammen aus: 1 µl template (z.B. 10 - 20 ng Plasmid/cDNA), 0,5 µl sense-Primer (50 µM), 0,5 µl antisense-Primer (50 µM), 0,5 µl dNTP-Mix (10 mM), 2,5 µl 10 x Puffer, 0,9 µl MgCl₂ (50 mM), 0,1 µl Polymerase (5 U/µl) und ad 25 µl Bidest.

Standard PCR-Programm (Gerät: RoboCycler^R Gradient 40, Stratagene):

1. Denaturierung 3 - 5 min 94 °C
2. Amplifikationszyklen (35 x) Denaturierung 30 s 94 °C
Primer-Annealing 30 s (zwischen 50 und 64 °C)
Elongation (0,5 bis 5) min 72 °C
3. Elongation 5 bis 10 min 72 °C

Die Elongationszeit in den Zyklen wurde in Abhängigkeit von der Länge des zu amplifizierenden Bereiches modifiziert.

4.18.11 RLM RACE zur Amplifikation von Vollängen cDNAs

Der GeneRacerTM-Kit (Invitrogen) ermöglicht eine spezifische Amplifikation von Vollängen cDNAs (Schaefer, 1995). Ausgehend von Gesamt-RNA werden in einem ersten Schritt alle freien Phosphatgruppen durch eine alkalische Phosphatase gespalten. Im nächsten Schritt wird die 7-Methylguanosin-Kappe am 5'Ende von Vollängen RNAs gespalten und das entstehende 5'Ende mit einem RNA-Oligonukleotid (Adapter) ligiert. Nach der reversen Transkription kann mit einer Kombination aus einem Adapter-spezifischen 5'Primer sowie einem genspezifischen 3'Primer das

5'Ende der cDNAs amplifiziert werden, wohingegen für das 3'Ende ein genspezifischer sowie ein Oligo-dT-Primer kombiniert werden. Um die Spezifität zu erhöhen, kann eine zweite „nested“ PCR mit Primern innerhalb des Amplifikats durchgeführt werden. Die RACE-PCR Produkte wurden über einen PCR-Reinigungskit aufgereinigt und anschließend in den Vektor pGEM-T kloniert.

4.18.12 Reinigung von DNA Fragmenten

DNA-Fragmente aus PCR-Reaktionen, Restriktionen und anderen Ansätzen wurden über das PCR Purification Kit^R von Qiagen aufgereinigt.

4.18.13 Sequenzierung von Plasmiden

Alle Sequenzierungsreaktionen wurden bei der Firma SeqLab (Göttingen) durchgeführt.

4.18.14 DNA-Gelelektrophoresen

4.18.14.1 Agarosegele

Zur Auftrennung von DNA-Proben wurden standardmäßig Gele mit 0,8 bis 1,5 % Agarose in 1 x TAE verwendet (20 x TAE: 2 M Tris-base, 1 M Natriumacetat, 50 mM Na₂-EDTA, pH 7,2). Vor dem Gelauftrag wurde die Probe mit einem entsprechenden Volumen 5 x DNA-Auftragspuffer (50 % Glycerin, 5 x TAE-Puffer, 1 % Orange G (w/v)) gemischt. Als Größenmarker dienen „Smartladder“ (Eurogentec) sowie die „2log ladder“ (NEB), der Gellauf erfolgte bei 70 bis 100 V in 1 x TAE. Zur Visualisierung der DNA wurde das Gel nach dem Lauf 10 min in einer Ethidiumbromid-Lösung (1 mg/l) gefärbt und zweimal für 5 min in VE-Wasser geschwenkt. Anschließend wurde das Gel unter UV-Licht digitalisiert, wobei die DNA durch das interkalierte Ethidiumbromid violett fluoreszierte.

4.18.14.2 Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

DNA-Fragmente unter 300 bp sowie geringe DNA-Mengen konnten besser in nativen Gelen analysiert werden. Dazu wurden 12 % PAA-Gele verwendet, die aus 2,45 ml Bidest, 1,75 ml nativer Trenngelbuffer (1,5 M Tris-base, pH 8,8), 2,8 ml Acrylamid (29,2 % (w/v) Acrylamid, 0,8 % Bisacrylamid (37,5:1)), 30 µl APS (10 % Ammoniumperoxodisulfat in Bidest) sowie 7 µl TEMED hergestellt wurden. Die DNA-Proben wurden mit 5 x Auftragspuffer versetzt und mit einem Größen- und Mengenstandard auf das Gel geladen. Der Gellauf erfolgte in nativem

Elektrophoresepuffer (3,6 g/l Tris-Base, 14,4 g/l Glycin, pH 8,6) bei 200 V. Danach wurde das Gel 5 min in einer Ethidiumbromidlösung (1 mg/l) gefärbt, 5 min in VE Wasser entfärbt und unter UV-Licht visualisiert.

4.18.14.3 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die entsprechende Probe wurde in einem Agarosegel aufgetrennt und anschließend ein Teil der Spur mit Ethidiumbromid gefärbt sowie die Position des gewünschten Fragmentes unter UV-Licht markiert. Das Gel wurde anschließend wieder zusammengesetzt, ein Gelstück an entsprechender Position ausgeschnitten sowie die DNA über einen Geextraktionskit (QIAquick Gel Extraction Kit^R, Qiagen) isoliert.

4.19 RNA-Methoden

Die RNA für die cDNA-Synthese wurde wie unter 6.11.8 beschrieben mit einem Kit isoliert. Für die Isolation und Reinigung von RNA aus Pollen und Samen wurde jedoch ein Protokoll verwendet, dass die RNA Reinigung aus Pflanzenorganen, die reich an Polysacchariden, Sporopollenin und weiteren problematischen Pflanzenverbindungen sind, erlaubt (Ying Zeng & Tao Yang, 2002). Ca. 0,7g Pflanzenproben wurden in Flüssigstickstoff gemörsert bzw. in der Retsch-Mühle pulverisiert, in 15 ml 65°C vorgewärmten RNA-Extraktions Puffer (2% CTAB, 2% PVP (mol wt 25,000), 100 mM Tris-HCl pH8, 25 mM EDTA, 2 M NaCl, 0,05% Spermidin Trihydrochlorid, 2% β -Mercaptoethanol) aufgenommen und 10 min lang bei 65°C inkubiert (zwischendurch vortexen). Anschließend wurde das gleiche Volumen Chloroform-Isoamylalkohol (24:1) zugesetzt, gevortext und 10 min mit 10.000 x g bei 4°C abzentrifugiert. Der sehr dickflüssige Überstand wurde nochmals mit Chloroform-Isoamylalkohol gereinigt und schließlich mit 30.000 x g für 20 min bei 4°C zentrifugiert. Zu der erhaltenen Lösung wurde das 0,25fache Volumen von 10 M LiCl zugegeben, gemischt und über Nacht bei 4°C aufbewahrt. Die ausgefallene RNA wurde drei mal mit 75% Ethanol gewaschen, mit 30.000 x g für 30 min bei 4°C abzentrifugiert, luftgetrocknet und in DEPC-H₂O aufgenommen. Die erhaltene RNA wurde Aliquotiert und bei -80°C aufbewahrt.

4.19.1 Bestimmung der Konzentration und Reinheit von RNA

Die Konzentrationsbestimmung erfolgte photometrisch in wässriger Lösung bei 260 nm ($\epsilon=25 \mu\text{l} \times \mu\text{g}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$). Die Absorption bei 280 nm gab zudem einen Hinweis auf die Reinheit der RNA-Präparation. Die Konzentration einer Lösung von RNA berechnet sich wie folgt:

$(OD_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 40) / 1000 = \text{RNA-Konzentration (in } \mu\text{g/ml)}$

4.19.2 RNA-Agarosegelelektrophorese

Zur Überprüfung der RNA-Qualität und Konzentration wurden jeweils 1 μg der RNA-Präparationen auf ein 1 % Agarose Gel in TBE (0,98 M Tris-base, 0,89 M Borsäure, 25 mM EDTA, pH 8,4) aufgetragen. Die RNA wurde mit RNA-Auftragspuffer (50 % Glycerin, 5 x MOPS, 1 % Bromphenolblau) versetzt und nach dem Gelauftrag bei 70 V aufgetrennt. Den Gelen wurde entweder direkt Ethidiumbromid zugesetzt oder diese nach dem Lauf gefärbt und die RNA unter UV-Licht visualisiert.

4.20 Vektoren und Oligonucleotide

Vektoren:

| Name | Herkunft | Verwendung |
|-------------------|------------|---|
| pET-22b(+) Vektor | Novagen | Proteinexpression in den periplasmatischen Raum |
| pHD32::YFP | AG Kost | Transiente Transformation von Pollen |
| pHD223::RFP | AG Kost | Transiente Transformation von Pollen |
| pETM20 | EMBL | Proteinexpression |
| pQE30 | Novagen | Proteinexpression |
| pICZ α A | Invitrogen | Proteinexpression in <i>Pichia pastoris</i> |

Oligonucleotide (Hergestellt von MWG):

| Name | Sequenz (5'-3') | Verwendung |
|-------------------|---|--|
| IPME1-S | cgg ggt acc ttg cgc ggc cgg cgt | Klonierung PME1-RP1 in pETM20 |
| IPME1-AS | acc gct cga gtc aat gga cat gtt cgt aa | Klonierung PME1-RP1 in pETM20 |
| IPME2-S | cgg ggt acc tta cgc ctg cgg cgg t | Klonierung PME1-RP2 in pETM20 |
| IPME2-AS | tcc gct cga gtc aga tca tgt tgg aga g | Klonierung PME1-RP2 in pETM20 |
| IPME3-S | acg ggg tac ctt aag ggt agg gga gg | Klonierung PME1-RP3 in pETM20 |
| IPME3-AS | catgct cga gtc ata tca tgt ttg caa gcg | Klonierung PME1-RP3 in pETM20 |
| IPME4-S | cgg ggt acc tta acg gca agg gca agg | Klonierung PME1-RP4 in pETM20 |
| IPME4-AS | catgct cga gtc ata tca tgt ttg caa gcg | Klonierung PME1-RP4 in pETM20 |
| ZmC5short | cgg ggt acc gtc ggt gtg gtc gcc | Klonierung PME1 ohne SP in pQE30 |
| ZmC5Nfull | cgg ggt acc atg gca aag gct ctc cta ggt | Klonierung PME1 in pQE30 |
| ZmC5Nhalf | cgc gga tcc acg ceg aac geg atc gtg g | Klonierung PME1 für AS bzw. Enzymassay |
| Phactin_L | GGTAACATTGTGCTCAGTGGTGG | semiquantitative RT-PCR |
| Phactin_R | CTCGGCCTTGGAGATCCACATC | semiquantitative RT-PCR |
| ZmC5_pET22b_Sense | cgg gaa ttc agg tgt ggt cgc cac cgt cac | Klonierung PME1 in pET22b |

4. Material und Methoden

| | | |
|-----------------------|---|--|
| ZmC5_pET22b_AS | tcc gaa gct tct tga act tga aac caa gta tg | Klonierung PME1 in pET22b |
| ZmC5_pYEX-BX_S+PMEI | aaa ctg cag atg agaggatcg cat cac cat cac cat cac atg gca aag gct ctc cta ggt | Klonierung PME1 mit Prodomäne in pYEX |
| ZmC5_pYEX-BX_S-PMEI | aaa ctg cag atg aga gga tgc cat cac cat cac cat cac atg gac ctc ggc atg ttc ag | Klonierung PME1 ohne Prodomäne in pYEX |
| PME3_S_pQE30_BamHI | aca tgg atc caa gtc gaa gct cgc caa ga | Klonierung PME3 in pQE30 |
| PME3_AS_pQE30_HindIII | cgc aag ctt atg cat gct tgt tgc atc c | Klonierung PME3 in pQE30 |
| PME3_S_pET_KpnI | cgg ggt acc aag tgc aag ctc gcc aag | Klonierung PME3 in pETM20m |
| PME3_AS_pET_XhoI | ccg ctc gag tat gca tgc ttg ttc gat cc | PME3 in pETM20m |
| pETM20V8mod_AS | cat gct cga gtc ata tca tgt ttg caa gag | Seuenzierungsprimer |
| ZmC5realEndPstI | gca ttg gtt ctg cag cct cta gaa ctt gaa acc aag tat gtg c | Klonierung in pQE30 |
| ZmC5Seq1 | aag cgg tcc ggg aac a | Sequenzierungsprimer |
| ZmC5Seq2 | acc atg acg atc tgc t | Sequenzierungsprimer |
| ZmC5Seq3 | cgc gct ctc ggt cat g | Sequenzierungsprimer |
| PME2_Sense2 | aca tac atg cat gcg cca tgg cgc agc gag cgg tgg c | Klonierungsprimer |
| PME_RACE_S_nested | aga cgc aga tct aca act gca cca tc | RACE Primer |
| PME_RACE_AS_nested | cgg cgc gtc gtt ccg gaa cac cac gcc gta c | RACE Primer |
| putPME_Sense | aca tac atg cat gcg cca tgg cgc agc gag cgg tgg ac | Klonierungsprimer |
| putPME_Antisense | atg cca agc ttg gta cct act tgg gcg gtg gct gga tcc ac | Klonierungsprimer |
| PME_RACE_AS | tgg ccg ccc ttg gcg ccg ggc ttg | RACE Primer |
| PME_RACE_Sense | gcc gct ggc caa gcc cgg cgc caa g | RACE Primer |
| pPICZalphaA_Forw | tct ctc gag aaa aga gag gct g | Sequenzierungsprimer |
| pICZalphaA_Rev | ttg ttc tag aaa gct ggc ggc | Sequenzierungsprimer |
| PMEIrp1 Sense | tat agt cga cat ggc tgg agc ccg ggc act g | Klonierung PME1-RP1 in pHD32 |
| PMEIrp2 Sense | tat agt cga cat ggc ggg aac ccg tgc cct g | Klonierung PME1-RP2 in pHD32 |
| PMEIrp3 Sense | tat agt cga cat ggg gca agc ctc acg gct c | Klonierung PME1-RP3 in pHD32 |
| PMEIrp4 Sense | tat agt cga cat ggg gca agc cta ccc acg | Klonierung PME1-RP4 in pHD32 |
| PME3 Sense | tat agt cga cat ggc ccg gcc gcg cct c | Klonierung PME3 in pHD32 |
| PMEIrp1 AS | gta ggg ccc atg gac atg ttc gta agg gat c | Klonierung PME1-RP1 in pHD32 |
| PMEIrp2 AS | gta ccc ggg gat cat gtt gga gag cga gc | Klonierung PME1-RP2 in pHD32 |
| PMEIrp3 AS | gta ccc ggg tat cat gtt tgc aag agc ca | Klonierung PME1-RP3 in pHD32 |
| PMEIrp4 AS | gta ccc ggg tat cat gtt tgc aag cgt atg | Klonierung PME1-RP4 in pHD32 |
| PME3 AS | tgg ctg ccg gcg tac tac tac ccc ggg tac | Klonierung PME3 in pHD32 |
| PME4_pHD32_Sense | atg tgc aca tgg ccg cgg tga cca gcg ccg ac | Klonierung PME4 in pHD32 |
| PME4_pHD32_AS | ata tgg gcc ccc ctt tgg tga atc cca tga cg | Klonierung PME4 in pHD32 |
| PME2_pHD32_Sense | atg tgc aca tgg cgc agc gag cgg tgg cca c | Klonierung PME2 in pHD32 |
| PME2_pHD32_AS | atg ggc ccc ttg ggc ggt ggc tgg atc cac g | Klonierung PME2 in pHD32 |
| PME1_pHD32_Sense | atg gta aca tgg caa agg ctc tcc tag gtg gc | Klonierung PME1 in pHD32 |
| PME1_pHD32_AS | atg agc tgc aac ttg aaa cca agt atg tg | Klonierung PME1 in pHD32 |
| ZmC5_Northern | cag caa gag ggt caa ctg g | Northern Blot |
| ZmC5_Northern_AS | agg aat gca aac ggt aaa gg | Northern Blot |
| PME2_Northern_Sense | gag cag cgg cat cta cta cg | Northern Blot |
| PME2_Northern_AS | tta gac ctt taa gcc tcc ttt gt | Northern Blot |

4. Material und Methoden

| | | |
|---------------------|---|--|
| PME3_Northern_Sense | tgc cag aca cct acc tct cc | Northern Blot |
| PME3_Northern_AS | atg gaa acg cgt gtc agt a | Northern Blot |
| PME1_put_S | gca tgt ccg cca gcg tga ag | Klonierungsprimer |
| PME1_put_S2 | cag gaa gcc aaa gct ctg aac | Klonierungsprimer |
| PME1_AK_S_BamHI | cgc gga tcc atg aag acc gcc acc ttc tc | Klonierung PME 1 Fragment für Antiserum |
| PME4_5_RACE | aac ccg tcg gcg cag gtg tag | RACE Primer |
| PME4_5_RACE_nested | ggc gtc gtc cag gag ctt ctt gca c | RACE Primer |
| PME4_PMEID_S_pQE30 | cgc gga tcc gtg acc agc gcc gac gac aac g | Klonierung PME4 Prodomäne in pQE30 |
| PME4_PMEID_AS_pQE30 | tcc ccc ggg tca gga cag gag ctt ccg gtt tg | Klonierung PME4 Prodomäne in pQE30 |
| PME4_PMED_S_pETM20 | tgc cat ggt gca gct gcc cgg ctt tca gag | Klonierung PME4 Domäne in pETM20 |
| PME4_PMED_AS_pETM20 | tcc gct cga gtt acc ctt tgg tga atc cca | Klonierung PME4 Domäne in pETM20 |
| PME4_K_AS_HindIII | ccc aag ctt acc ctt tgg tga atc cca | Klonierung PME4 in pETM20 |
| Pichia_Rev2 | agg aac agt cat gtc taa ggc tac | Sequenzierungsprimer |
| Pichia_S_ID | ccg gaa ttc aaa gac tcg cgc cgc cga ctg | Klonierung PME1 Prodomäne in pICZ α A |
| Pichia_AS2 | cgg ggt acc gcg aac ttg aaa cca agt atg tgc | Klonierung PME1 Prodomäne in pICZ α A |
| pETM20V8mod_AS | cat gct cga gtc ata tca tgt ttg caa gag | Sequenzierungsprimer |

4.21 Abkürzungen und Internetadressen

| | |
|-----------------------------|--|
| A | Adenin |
| A.bidest | zweifach destilliertes Wasser |
| <i>Arabidopsis thaliana</i> | Ackerschmalwand |
| Abb. | Abbildung |
| Amp | Ampicillin |
| AP | Alkalische Phosphatase |
| APS | Ammoniumperoxodisulfat |
| ATP | Adenosin-5'-triphosphat |
| bp | Basenpaar(e) |
| bzw. | Beziehungsweise |
| C | Cytosin |
| ca. | circa |
| CaMV | Engl.: Cauliflower mosaic virus (Blumenko |
| cDNA | copy DNA |
| Cm | Chloramphenicol |
| C-terminal | Carboxyterminal |
| CWI | Zellwand-Invertase |
| dATP | Desoxyadenosin-5'-triphosphat |
| dCTP | Desoxycytidin-5'-triphosphat |
| DEPC | Diethylpyrocarbonat |
| dGTP | Desoxyguanosin-5'-triphosphat |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| dNTP | 2'-Desoxynukleosid-5'-triphosphat |
| DTT | Dithiotreitol |
| dTTP | Desoxythymidin-5'-triphosphat |
| E.coli | <i>Escherichia coli</i> |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| EGTA | Ethylenglykol-bis-(β-Aminoethylether)N,N |
| ER | Endoplasmatisches Retikulum |
| EtOH | Ethanol |
| F | Farad |
| g | Erdbeschleunigung |
| G | Guanin |
| GFP | Grünes Fluoreszierendes Protein |
| h | Stunde |
| Hz | Hertz (Frequenz) |
| IPTG | Isopropylthiogalactosid |
| kb | Kilobase(n) |
| kD | Kilodalton |
| Km | Kanamycin |
| kV | Kilovolt |
| M | Nukleotide A oder C |
| MCS | engl.: Multiple Cloning Site |
| mRNA | engl.: messenger RNA |
| N | Nukleotide A, G, T oder C |
| <i>Nicotiana tabacum</i> | Tabak |
| Nr. | Nummer |
| NtCIF | <i>Nicotiana tabacum</i> Zellwand-inhibitor der β-Fructofuranosidase |
| N-terminal | Aminoterminal |
| NtVIF | <i>Nicotiana tabacum</i> Vacuolen-inhibitor der β-Fructofuranosidase |
| OD x nm | Optische Dichte bei x nm |

4. Material und Methoden

| | |
|------------------|--|
| ORF | Open reading frame |
| PAA | Polyacrylamid |
| PAGE | Polyacrylamid-Gelelektrophorese |
| PCR | engl.: polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion) |
| PEG | Polyethylenglycol |
| pH | Negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration |
| pI | Isoelektrischer Punkt |
| PME | Pektin Methylesterase |
| PMEI | Pektin Methylesterase-Inhibitor |
| PMEI-RP | Pektin Methylesterase-Inhibitor related protein |
| psi | engl.: pounds per square inch (Einheit für Druck) |
| PTNT | Pollen Tube <i>Nicotiana tabacum</i> (<i>N.t.</i> Pollenkeimmedium) |
| R | Nukleotide A oder G |
| RFP | Rotes Fluoreszierendes Protein |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| rpm | engl.: rotations per minute (Umdrehungen pro Minute) |
| RT | Raumtemperatur |
| RT-PCR | Reverse transkriptions PCR |
| s.o. (u.) | siehe oben (unten) |
| SDS | Natriumdodecylsulfat |
| T | Thymin |
| Tab. | Tabelle |
| TAE | Tris-Acetat-EDTA (Puffer) |
| Taq | <i>Thermus aquaticus</i> (thermophiler Prokaryot) |
| TBE | Tris-Borsäure-EDTA (Puffer) |
| TBS | engl.: tris buffered saline |
| TBST | TBS mit Tween |
| TE | Tris-EDTA-Puffer |
| TEMED | N,N,N',N' Tetramethyldiamin |
| Tet | Tetracyclin |
| Tris | Tris(hydroxymethyl) |
| U | Unit (Enzymaktivität) |
| UTR | Engl. : untranslated region |
| UV | Ultraviolett |
| v/v | Volumenprozent (Volumen pro Volumen) |
| VE-Wasser | Vollentsalztes Wasser |
| VI | Vakuoläre Invertase |
| Vol. | Volumen |
| W | Nukleotide A oder T |
| w/v | Massenprozent (Masse pro Volumen) |
| wt | Wildtyp |
| X-Gal | 5-Bromo-4-chloro-3-indoxyl- β -D-Galaktopyranosid |
| Y | Nukleotide C oder T |
| YFP | Gelbes (yellow) Fluoreszierendes Protein |
| <i>Zea mays</i> | Mais |
| z.B. | zum Beispiel |

Nicht angegeben sind die Abkürzungen von international gebräulichen SI-Einheiten und Internetseiten für standard *in silico* Untersuchungen.

5 Ergebnisse

Eine der Hauptkomponenten der Pollenzellwand ist Pektin. Pektin wird während des Pollenschlauchwachstums an der Spitze stark methylesterifiziert in die Zellwand sekretiert. Durch die Aktivität von Pektin Methylesterasen wird das Pektin mit zunehmender Entfernung von der Pollenschlauchspitze fortschreitend demethyliert. Es bildet sich ein von der Spitze abnehmender Gradient im Methylierungsgrad der Homogalacturon-Komponente des Pektins. Mit dem Methylierungsgrad verändern sich auch die mechanischen Eigenschaften der Pollenschlauchzellwand. Pektin Methylesterasen und deren Regulation spielen damit eine zentrale Rolle während des Pollenschlauchwachstums. PME-Enzyme kommen in Pflanzen als große Genfamilien vor und auch im Pollen werden mehrere Isoformen exprimiert. Aus *Arabidopsis thaliana* wurden vor kurzem die ersten pflanzlichen Pektin Methylesterase Inhibitoren (PMEI) aus Pollen kloniert und ihre Expression in Pollen bestätigt. Die Proteinsequenz der identifizierten PMEIs weisen eine signifikante Sequenzähnlichkeit mit den Pro-Domänen der so genannten Typ I PMEs auf.

Pektin Methylesterasen regulieren den Methylierungsgrad der Pektinmatrix und damit die mechanischen Eigenschaften der Pollenschlauchzellwand. Dabei können verschiedene PME Isoformen unter der Regulation unterschiedlicher PMEIs sowie/oder autoinhibitorischer Typ I Domänen stehen. Um diesen Sachverhalt weiter aufzuklären, wurden putative PMEIs und PMEs identifiziert und charakterisiert. Darüber hinaus wurden Hinweise auf mögliche Funktionen der beteiligten Proteine während des Pollenschlauchwachstums gefunden.

5.1 cDNS-Klonierung von vier in Maispollen exprimierten PME-Isoformen

5.2 Identifizierung und Re-Klonierung von zwei Typ I PMEs aus Mais

5.2.1 Re-Klonierung der pollenspezifischen ZmC5 PME: Sequenzkorrektur

1998 beschrieb Wakeley *et al.* eine Pektin Methylesterasen DNS Sequenz, die ausschließlich in der späten Pollenentwicklung transkribiert werden soll (Wakeley *et al.*, 1998). Während Klonierungsarbeiten viel auf, dass die vorhergesagten Proteindomänen teilweise nicht vollständig

sind und dass es durch eine Basen-Insertion und -Deletion im Bereich der Prodomäne zu einem „Frameshift“ gekommen ist. Das Ergebnis wurde mittels korrekturlesender Polymerasen und Sequenzierung der unterschiedlichen PME1 Klone bestätigt. In Abbildung 5.1 sind die abgeleiteten Aminosäuresequenzen der von Wakeley *et al.* publizierten „ZmC5“, PME1 im folgenden und der korrigierten cDNS Sequenz mittels des „ClustalW“ Algorithmus gegenübergestellt.

| | | | |
|------|--|---|-----|
| ZmC5 | MAKALLGGLSAILVVAVVVGVA | TVTRSGKKAGDNFTVPGEASLANVVRQVGVVRAHPV | 60 |
| PME1 | MAKALLGGLSAILVVAVVVGVA | TVTRSGKKAGDNFTVPGEASLATSGKSVKSLCAPPLY | 60 |
| | ***** | . : : . | |
| ZmC5 | QGVVREDVVPGHQWHREPQGGVPRQGGAGVGPDGGRAVQVDRRGQG | SDSMTESAREDC | 120 |
| PME1 | KESCEKTLTQATNGTENPKVFFHSVAKVALESVQTAVEQSKSIGEAKA | SDSMTESAREDC | 120 |
| | : . : : . : . : * : . . : . . . : . . . | ***** | |
| ZmC5 | KKLEDAADDLRGMLEMAGGDIKVLFSRSDDLTWTGVTMFMDT | CVDGTFVDEKCLKADMH | 180 |
| PME1 | KKLEDAADDLRGMLEMAGGDIKVLFSRSDDLTWTGVTMFMDT | CVDGTFVDEKCLKADMH | 180 |
| | ***** | | |
| ZmC5 | SVV | RNATELSSNALAITNSLGGILKKMDLGMFSKDSRRRLSSEQDEKGPVWMRSPERK | 240 |
| PME1 | SVV | RNATELSSNALAITNSLGGILKKMDLGMFSKDSRRRLSSEQDEKGPVWMRSPERK | 240 |
| | ** | ***** | |
| ZmC5 | LLASGNQPKPNAIVAKDGSQFKSIQQAVDAVPKGHQGRYVIYVKAGLYDEIVMVPKDKV | | 300 |
| PME1 | LLASGNQPKPNAIVAKDGSQFKSIQQAVDAVPKGHQGRYVIYVKAGLYDEIVMVPKDKV | | 300 |
| | ***** | | |
| ZmC5 | NIFMYGDGPKQSRVTGRKSFADGITTMKTATFSVEASGFICKNMGFHNTAGAERHQAVAL | | 360 |
| PME1 | NIFMYGDGPKQSRVTGRKSFADGITTMKTATFSVEASGFICKNMGFHNTAGAERHQAVAL | | 360 |
| | ***** | | |
| ZmC5 | RVQGDLAAFYNCRFDAFQDTLYV | QPRRQFFRNCVVSQTIDFIFGNSAAVFQNCIIITRRP | 420 |
| PME1 | RVQGDLAAFYNCRFDAFQDTLYV | HARRQFFRNCVVSQTIDFIFGNSAAVFQNCIIITRRP | 420 |
| | ***** | . : ***** | |
| ZmC5 | MDNQQNSVTAHGR | TDPNMKSGLVIQNCRLVPDQKLFDPDRFKIPSYLGRPWKEFSRLVIME | 480 |
| PME1 | MDNQQNSVTAHGR | TDPNMKSGLVIQNCRLVPDQKLFDPDRFKIPSYLGRPWKEFSRLVIME | 480 |
| | ***** | ***** | |
| ZmC5 | STIADFVKPEGYPWNGDFALKTLYAEYNNRGPAGTSKRNVNWPGFHVIGRKEAPEFTA | | 540 |
| PME1 | STIADFVKPEGYPWNGDFALKTLYAEYNNRGPAGTSKRNVNWPGFHVIGRKEAPEFTA | | 540 |
| | ***** | | |
| ZmC5 | GPFIDGAMWLKYGAPHLGFKF | | 563 |
| PME1 | GPFIDGAMWLKYGAPHLGFKF | | 563 |
| | ***** | | |

Abbildung 5.1

Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenzen der publizierten „ZmC5“ mit der korrigierten PME1 Pektine Methylesterase

Die Stellen an denen es durch Fehler in der cDNS Sequenz zu Änderungen in der Proteinsequenz kommt sind gelb unterlegt. Das Signalpeptid wurde mittels „SignalIP 3.0“ bestimmt und ist grün unterlegt. Mittels Datenbankabgleich mit der „Conserved Domain Database“ wurde die PME1-RP Domäne und die PME Domäne bestimmt und farblich hervorgehoben; blau=PME1-RP-, rot=PME-Domäne.

Die Unterschiede der abgeleiteten Aminosäuresequenzen sind in der Abbildung 5.1 gelb unterlegt. Die durch „CDD“ Datenbankabgleich erhaltenen konservierten Proteindomänen sind über den Sequenzen blau, PMEI-RP (pfam04043), und rot, PME Domäne (pfam01095) hervorgehoben. Das Singalpeptid, das für die Translokation in das ER benötigt wird ist grün unterlegt. Es wurde mittels „SignalIP 3.0“ bestimmt.

Für die weitere Charakterisierung dieser Mais PME wurde die proteinkodierende Sequenz in unterschiedliche Zielvektoren eingebracht. Die Klonierung und Expression von rekombinanten Pektin Methylesterasen ist im Abschnitt 5.4 beschrieben.

5.2.2 Identifizierung einer neuen Typ I PME aus *Zea mays*

Während der „MaizeGDB“ Datenbanksuche nach weiteren PMEI-RPs wurde eine genomisches Fragment identifiziert, dass durch Datenbankvergleiche mit konservierten Proteinsignaturen den PMEI-RPs zugeordnet wurde. Die Suche wurde auf genomische Klone ausgeweitet, da die Suchen gegen ESTs und TUGs keine neuen PMEI-RP Kandidaten lieferten. Mit der erhaltenen Sequenz wurde weiter nach genomischen Sequenzen bzw. ESTs gesucht und versucht, das komplette Gen zu identifizieren. Durch Sequenzüberlappungen konnte ein Teil der möglichen Zielsequenz und die dazugehörige Aminosäuresequenz ermittelt werden. Das identifizierte Teilfragment besteht aus 438 Aminosäuren und umfasst laut Proteinvorhersage eine PMEI-Domäne und einen Teil einer PME Domäne, Abbildung 5.2.

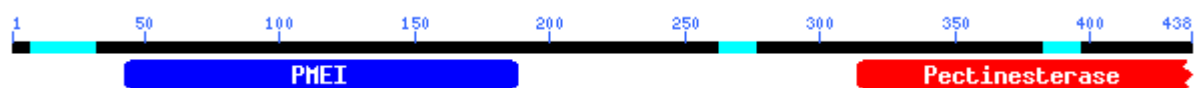


Abbildung 5.2

Schema des neu identifizierten Typ I Pektin Methylesterasen-Fragmentes

Im Schema lassen sich die vorhergesagte PMEI-Domäne in blau und ein Teil einer Pektin Methylesterase Domäne in rot erkennen. Vorhersage mittels „CDD“.

Die komplette Sequenz wurde durch die Kombination von „RACE“ und Datenbankabgleichen ermittelt und durch RT-PCR bestätigt. Die Primer für die 5'RACE wurden gegen Sequenzabschnitte innerhalb des PMEI-RP kodierenden Bereich erstellt. Die Primer für die 3'RACE wurden gegen Sequenzbereiche erstellt, die zwischen dem PMEI und PME kodierenden Bereich liegen, Abbildung 5.3.

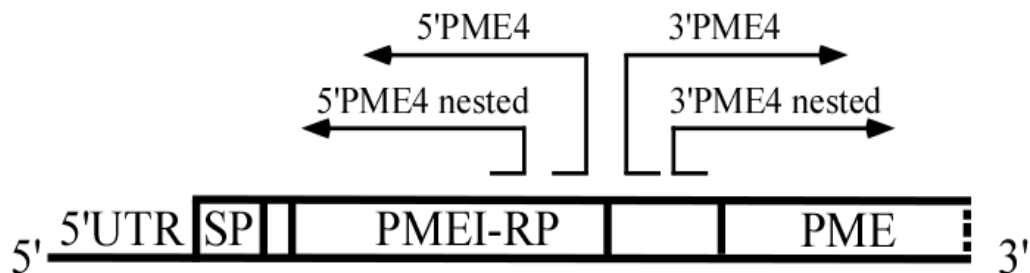


Abbildung 5.3

Schema der RACE Strategie zur Identifizierung einer neuen Typ I PME aus *Zea mays*, PME4

Schematische Darstellung der durchgeführten RACE zur Identifizierung der vollständigen DNS Sequenz von PME4. Ausgehend von dem putativen Startcodon wurden die 5' Primer gegen die Sequenzbereiche 383-403 sowie 260-284 gerichtet und die 3' Primer gegen die Sequenzbereiche 471-490 und 510-530 gerichtet. 5' UTR: 5' Untranslated Region; SP: Signalpeptid; PMEI-RP- und PME-Domäne

Mittels der 5' RACE konnte ein für AS 1 bis AS 86 kodierendes PMEI-RP Fragment identifiziert und die bereits vorhandene Sequenz korrigiert werden. Durch die 3' RACE konnten keine neuen Sequenzinformationen erhalten werden. Die mittels der 5' RACE korrigierte Sequenz wurde mit der MaizeGDB ein weiterer Datenbankabgleich durchgeführt und mit Hilfe des ESTs AY112201 die voraussichtliche DNS-Sequenz bestimmt. Die 1859 Basenpaare umfassende PME4 Sequenz konnte nach Datenbankabgleichen (MaizeGDB bzw. PlantaGDB) weder als EST bzw. TUG gefunden werden. Es wurden nur TUGs bzw. PUTs angezeigt, die keine PMEI-RP Domäne aufweisen bzw. in ihrer Sequenz Abweichungen zur neu identifizierten PME haben (Daten nicht gezeigt). Nach Korrektur der Sequenzdaten wurde festgestellt, dass der erste 3' RACE PME4 Primer aufgrund von Sequenzfehlern nicht mehr an die Ziel-cDNS binden konnte. Die Aminösäuresequenz der voraussichtlichen Typ I PME ist in Abbildung 5.4 dargestellt.

| | | | | | |
|------------|------------|------------|--------------|------------|------------|
| 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | 60 |
| MANRVTVASV | IAAVGIVAVI | GTMAAVTSAD | DNDGNMLSSV | KVSTVCAFTR | YPEKCEQSLK |
| 70 | 80 | 90 | 100 | 110 | 120 |
| HVVSdTSSPE | DVFRDALNVA | LDEVSTAFQR | SAHIGKDAQD | KLSRNAMDVC | KKLLDDATED |
| 130 | 140 | 150 | 160 | 170 | 180 |
| LRGMARLKPA | DLVRHVKDLR | VWVSGVMTYV | YTCADGFEKP | ELKEAMDKML | QNSTELSSNA |
| 190 | 200 | 210 | 220 | 230 | 240 |
| LAILTRLGEL | LPQEAKALNA | TLPGAGHG | RRLLGWQMGEAE | EVTSGGRGLP | AVNDKQLGEI |
| 250 | 260 | 270 | 280 | 290 | 300 |
| ADVANAN | RKL | LSDHAALRGR | GVLTTGLVGT | FDEIQYGRSG | VPPSDFPKWM |
| 310 | 320 | 330 | 340 | 350 | 360 |
| PGFQRPNKVV | AQDGSDFKT | ITEAITAVPN | TFEGRFVIYV | KAGTYKEYVT | VPKNMANIFM |
| 370 | 380 | 390 | 400 | 410 | 420 |
| YGDGPTQTVV | TGDKSNAGGF | ATFASATFSA | EGNGFICKSM | GFVNTAGPEG | HQAVAMHVQG |
| 430 | 440 | 450 | 460 | 470 | 480 |
| DKSVFYNCRF | EGYQDTLYVH | ANRQFFRDCE | VLGTVDFIFG | NSAALFQNCN | MTVRKPGDSQ |
| 490 | 500 | 510 | 520 | 530 | 540 |
| SNMVTAQGRT | DPNMPTGIVL | QGCRIVPEQA | LFPDRLQIAT | YLGRPWKEYA | RTVVMESTIG |
| 550 | 560 | 570 | 580 | 590 | 600 |
| DLIRPEGWAE | WMGDLGLKTL | YYAEYANTGP | GAGTSKRVNW | PGYHVIGQAD | ATAFTAGAFI |
| 610 | 620 | | | | |
| DGASWLQSTG | TPNVMGFTKG | | | | |

Abbildung 5.4

PME4 Aminosäuresequenz

Dargestellt sind die 625 Aminosäuren der unprozessierten PME4. Die ersten 29 AS sind grün hervorgehoben und stellen das durch *in Silica* analyse ermittelte Signalpeptid zur Translokation in das ER dar. Der Bereich, der durch Datenbankvergleiche als PME1-RP Domäne (pfam04043) erkannt wurde, ist in blau, die Pektinesterasedomäne (pfam01095) in braun dargestellt. Zusätzlich wurde in blau die durch einen Prosite Datenbankabgleich ermittelte PME-Signatur kenntlich gemacht (PS00503). Das Protein besitzt ohne Signalpeptid einen pI von 5,95 und ein Molekulargewicht von ca. 64302,71 Dalton. Mögliche Prozessierungsstellen (Konsensusmotiv R(R/K)L(L/M)) sind rot unterlegt.

Die PME4 cDNS kodiert eine 625 AS lange putative Typ I Pektin Methylesterase. Das Protein hat laut *in Silica* Vorhersage ein 29 AS langes Signalpeptid, eine PME1-RP Domäne (pfam04043) und eine putative konservierte Pektin Methylesterase Domäne (PS00503). In Abbildung 5.4 sind die beschriebenen Bereiche farbig hervorgehoben. Bei der identifizierten Pektin Methylesterase handelt es sich um eine Typ I PME mit einem vorhergesagten pI von 5,95 und einem Molekulargewicht von 64302,71 Dalton (ohne Signalpeptid). Durch „ClustalW“ Sequenzvergleiche konnte bei fast allen untersuchten Typ I PMEs (abgeleitet von Microarray Daten, „digitalen Northern“ Analysen und TUGs; www.tair.org, www.maizegdb.com) N-terminal ein vier Aminosäuren langes Motiv identifiziert werden, das als Erkennungs- bzw. Prozessierungs-Motiv dienen könnte (Micheli, 2001). Die Konsensussequenz dieses 4 AS langen Motivs lautet R(R/K)L(L/M). Die PME4

Aminosäuresequenz besitzt drei mögliche putative Prozessierungsstellen, die in der Abbildung 5.4 rot unterlegt sind. Das fertige Protein hat einen vorhergesagten pI von 6,5 bis 7,2 (je nach Prozessierungsstelle) und ist aufgrund seines pI vermutlich nur schwach an die Zellwand gebunden. In Abbildung 5.8 sind die Aminosäuresequenzen von ZmPME1 und ZmPME4 aus Mais, NtPPME1 aus Tabak, VANGUARD1 aus Arabidopsis und LePME aus Tomate gegenübergestellt. Wichtige Sequenzabschnitte sind farblich hervorgehoben. Die vier konservierten Cysteine der Pro-Domäne sind rot, das putative Prozessierungsmotiv R(R/K)L(L/M) blau und Aminosäuren, die im Reaktionszentrum liegen, sind grün unterlegt. Interessanterweise besitzen manche Typ I PMEs das vier Aminosäuren lange Prozessierungsmotiv mehrmals. Die Klonierung und Expression von rekombinanten Pektin Methylesterasen ist im Abschnitt 5.5 beschrieben.

5.3 Identifizierung und Klonierung von zwei Typ II PMEs aus Mais

5.3.1 Identifizierung einer neuen Typ II PME aus *Zea mays* Pollen

Mittels isoelektrischen Fokussierung wurden Extrakte aus Maispollen und Maiskeimlingen aufgetrennt. Von den Maiskeimlingen wurde der Vegetationskegel und bis zu ein Zentimeter darunter liegendes Pflanzengewebe, ohne Maiskorn, verwendet. Anschließend wurden die Gelbereiche mit PME-Aktivität mittels O-Naphtol-Nachweis identifiziert (Hou & Lin, 1998) und isoliert. In Abbildung 5.5 ist das Gel nach dem PME-Farbnachweis zu sehen.

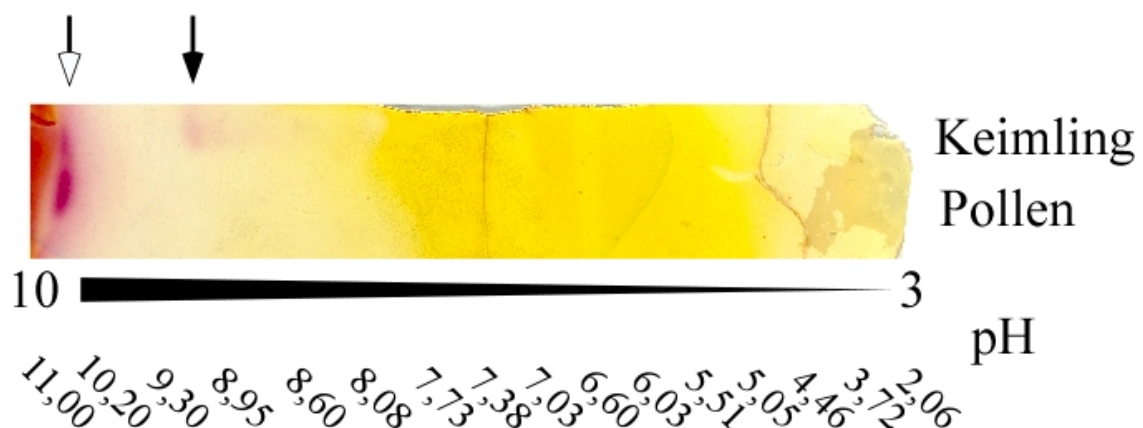


Abbildung 5.5

Isoelektrische Fokussierung von zwei *Zea mays* Proben

Durch den PME-Aktivitätsnachweis färben sich Bereiche mit PME-Aktivität rot. In beiden Proben kann in einem pH Bereich von ca. 10 (weißer Pfeil) PME-Aktivität nachgewiesen werden. Im Maispollen ist dies die einzige Bande die detektiert werden konnte. In der Probe aus Maiskeimlingen kann noch eine schwächere Aktivitätsbande im pH Bereich von ca. 9 nachgewiesen werden (schwarzer Pfeil).

Auf dem Gelphoto ist deutlich die Rotfärbung, die durch freigesetztes O-Naphtol hervorgerufen wird, zu erkennen. Zellwandgebundene Proteine besitzen meist einen stark basischen pI und werden durch ionische Wechselwirkungen an Zellwandkomponenten gebunden. Der pI der Aktivitätsbande liegt bei einem ungefähren pI von 10. Die zuvor von *Wakeley et al.* beschriebene PME1 „ZmC5“ besitzt ebenfalls einen pI von ~ 9,9 und könnte für die Aktivitätsfärbung in diesem pI Gelbereich verantwortlich sein. Anhand von Datenbankrecherchen konnten noch weitere PME ESTs identifiziert werden, deren abgeleitete PMEs ebenfalls einen stark basischen pI besitzen und in Maispollen exprimiert werden können. Man kann also davon ausgehen, dass in der Aktivitätsbande unterschiedliche PMEs vorliegen.

5.3.1.1 Analyse der erhaltenen PME Aktivitätsbanden

Nach IEF-Trennung wurde das gefärbte IEF-Gel in 20% Essigsäure fixiert und die Banden vorsichtig herausgeschnitten. Die Banden wurden mittels „MALDI TOF“ und „ESI TOF“ Verfahren am „Zentrum für molekulare Biologie Heidelberg“ (ZMBH) in der AG von Dr. Thomas Ruppert mit Hilfe von Dr. Matthias Reiss untersucht. Es ließen sich PME spezifische Fragmente aus der Aktivitätsbande der Pollenprobe nachweisen.

Durch die massenspektrometrischen Untersuchungen der gefärbten Gelbanden konnten zwei PME Fragmente identifiziert werden: **VILDLKPGAGFR** und **GSVDFIFGFGR**. Die Fragmente können von einer bzw. unterschiedlichen PMEs abstammen. Mit den erhaltenen AS-Sequenzen wurde anschließend ein „MASCOT“ Datenbankabgleich durchgeführt und 13 der Sequenz entsprechende ESTs identifiziert. 12 der ESTs sind aus Mais und 9 davon aus reifen Pollen bzw. Antheren, siehe Tabelle 5.1 im.

| | <i>Akzession</i> | <i>Masse</i> | <i>Mowse Bewertungsalgorithmus</i> | <i>Ursprung</i> |
|----|------------------|--------------|------------------------------------|-----------------------------|
| 1 | gi 5816332 | 5906 | 87 | Mais Antheren und Pollen |
| 2 | gi 13635176 | 15347 | 83 | Weizenähre |
| 3 | gi 6989610 | 17342 | 83 | Mais Antheren und Pollen |
| 4 | gi 7135152 | 16829 | 83 | Mais Antheren und Pollen |
| 5 | gi 6918388 | 19804 | 82 | Unterschiedliche Maisgewebe |
| 6 | gi 26454994 | 20142 | 82 | Mais Unigen IV |
| 7 | gi 26454989 | 20998 | 82 | Mais Unigen IV |
| 8 | gi 21481396 | 20849 | 82 | Maispollen |
| 9 | gi 21481435 | 21311 | 82 | Maispollen |
| 10 | gi 21236626 | 21711 | 82 | Maispollen |
| 11 | gi 21330094 | 21934 | 82 | Maispollen |
| 12 | gi 8318661 | 21983 | 82 | Unterschiedliche Maisgewebe |
| 13 | gi 5928701 | 22792 | 81 | Mais Antheren und Pollen |

Tabelle 5.1: „MASCOT“-Datenbankabgleich

Die zwei identifizierten Peptidfragmente werden jeweils zusammen einem EST zugeordnet.

Mit der konsensus DNS-Sequenz der 12 ESTs wurde anschließend die „Maize Genetics and Genomics“ Datenbank durchsucht und ein vorläufiges Genprodukt „TUG“ identifiziert: ZmTUC-02-12-23.7679. Die Benennung der TUGs wurde während der Arbeit mehrmals geändert und schließlich von der „Plant Genome Database“ fortgeführt. Die aktuelle Bezeichnung lautet PUT-151a-Zea_mays-905143604. Die vollständige DNS-Sequenz wurde mittels korrekturlesender DNS Polymerasen durch RT-PCR bestimmt. Die daraus abgeleitete Aminosäuresequenz und die mittels „Conserved Domain Database, CDD“ ermittelten putativen Proteindomänen sind in Abbildung 5.6 zu sehen.

Durch die MALDI- und ESI-TOF Verfahren konnte nur **eine** Pektin Methylesterase in der Aktivitätsbande der Pollenprobe nachgewiesen werden.

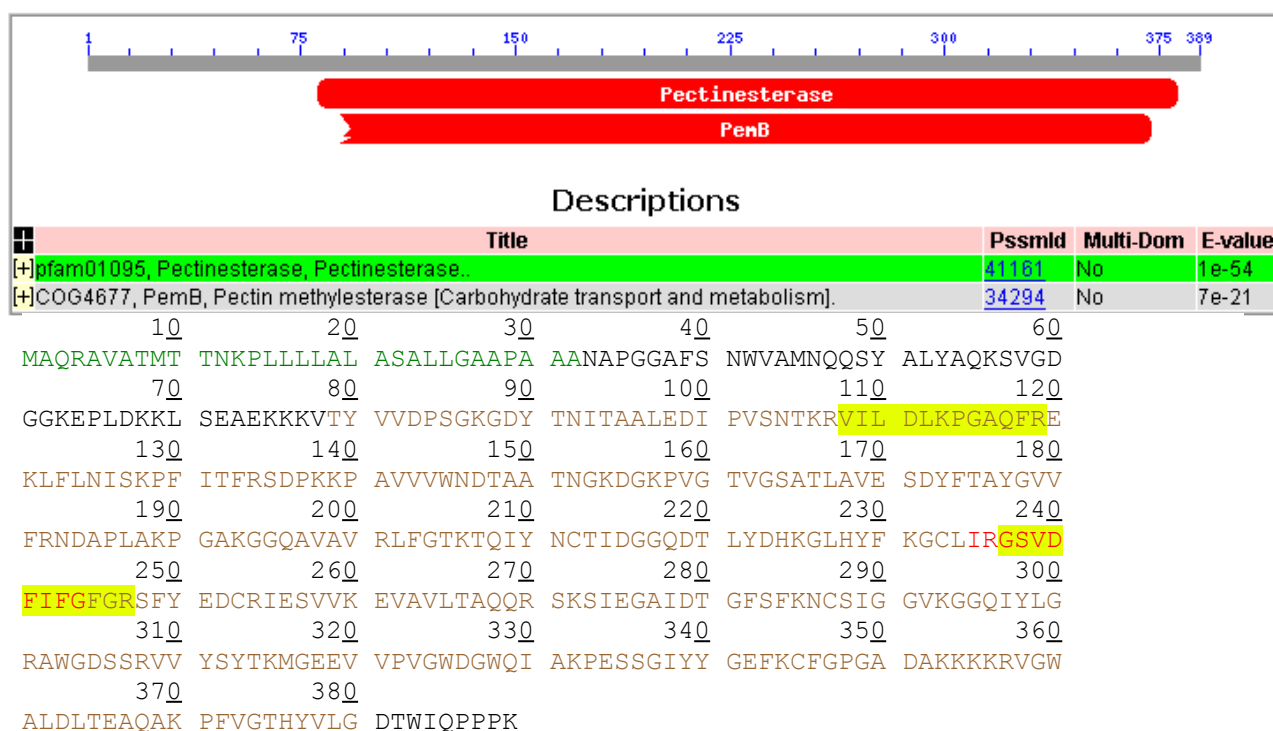


Abbildung 5.6

PME2 Aminosäuresequenz

Oben: „CDD“ Proteindomänenvorhersage Unten: Dargestellt sind die 389 Aminosäuren der unprozessierten PME2. Die detektierten MALDI TOF bzw. ESI TOF Fragmente sind gelb unterlegt. Die ersten 32 AS sind grün hervorgehoben und stellen das durch *in Silica* analyse ermittelte Signalpeptid zur Translokation in das ER dar. Der Bereich der durch Datenbankvergleiche als Pektinesterasedomäne erkannt wurde (pfam01095) ist in braun dargestellt. Zusätzlich wurde in rot die durch einen Prosite Datenbankabgleich ermittelte PME-Signatur kenntlich gemacht (PS00503). Das Protein besitzt ohne Signalpeptid einen pI von 9,07 und ein Molekulargewicht von ca. 39kDa.

Die PME2 cDNS kodiert ein 389 Aminosäuren langes Protein, das laut „Signal IP“ ein Signalpeptid von AS1 bis AS32 besitzt. Ein „CDD“ Datenbankabgleich klassifiziert das unbekannte Protein als Pektin Methylesterase. Der Erwartungswert für putative Proteindomänen wurde bei 0,010 belassen. Umso kleiner der Erwartungswert (E-value) ist, umso wahrscheinlicher ist die vorhergesagte Domänenfunktion. Eine putative konservierte Pektin Methylesterase Domäne liegt zwischen AS 79 und AS 381 (pfam01095). Die entsprechenden Bereiche sind in Abbildung 5.3 markiert. Die Prosite Pektin Methylesterase Signatur ist rot unterlegt (PS00503). Bei dem identifizierten Protein handelt es sich um eine Typ II PME mit einem vorhergesagten pI von 9,07 und einem Molekulargewicht von 38765 Dalton (ohne Signalpeptid). Die Klonierung und Expression von rekombinanten Pektin Methylesterasen ist im Abschnitt 5.4 beschrieben.

5.3.2 Identifizierung einer weiteren Typ II PME aus Mais

Während den Datenbankrecherchen unter www.maizegdb.org wurden noch weitere PMEs gefunden. Neben der im Maispollen exprimierten Typ II PME2 wurde noch eine weitere Typ II PME, TUG ZmTUC03-08-11.21451, identifiziert. Die Benennung der TUGs wurde während der Promotionszeit mehrmals geändert und anschließend von der „Plant Genome Database“ fortgeführt. Wird mit der durch RT-PCR verifizierten DNS Sequenz bzw. mit der ZmTUC03-08-11.21451 DNS Sequenz ein Datenbankabgleich mit der „PlantGDB“ durchgeführt, erhält man zwei PUTs: PUT-151a-Zea_mays-112399 und PUT-151a-Zea_mays-905143604. Diese von der PlantGDB zusammengesetzten putativen Transkriptfragmente stimmen in weiten Teilen mit der erhaltenen ZmTUC03-08-11.21451 Sequenz überein, sind jedoch nicht identisch. In Abbildung 5.7 ist die durch RT-PCR abgeleitete Aminosäuresequenz dargestellt.

| | | | | | |
|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | 60 |
| MARPRLLLT | LLAAAVLTT | VPGVALAKSK | LAKKSDDVVN | GPLLTEKIQA | KKTLIVGPDE |
| 70 | 80 | 90 | 100 | 110 | 120 |
| EFKTVQSAID | AVPAGNAEWV | IVHLRSLHR | GKVVIPENKP | FIFVRGNGKG | RTSISHESAS |
| 130 | 140 | 150 | 160 | 170 | 180 |
| SDNAESAAFT | VNSDNVIVFG | VSFRNSARVG | LVNDPEIRSV | AAMVAGDKVA | FYHCAFYSPH |
| 190 | 200 | 210 | 220 | 230 | 240 |
| HTLFDSAGRH | YYESCIIQGN | IDFIFGSGQS | IFQCPEIFVR | PDRRTEIRGS | ITAQVRQEED |
| 250 | 260 | 270 | 280 | 290 | 300 |
| SSGFVFLKKG | VYGVGEVYLG | RVTAPDSRVI | FADTYLSKTI | HPAGWTTIGY | SGSTDKVTLA |
| 310 | 320 | 330 | 340 | | |
| EFNCTGPGAD | VTNRVPWSRR | FSPDDAAKYL | TIDFINGKDW | LPAYYY | |

Abbildung 5.7

PME3 Aminosäuresequenz

Dargestellt sind die 346 Aminosäuren der unprozessierten PME2. Die ersten 27 AS sind grün hervorgehoben und stellen das durch *in Silica* Analyse ermittelte Signalpeptid zur Translokation in das ER dar („Signal IP“). Der Bereich der durch Datenbankvergleiche als Pektinesterasedomäne erkannt wurde (pfam01095) ist in braun dargestellt. In rot sind Teile der Prosite-Signatur dargestellt (PS00503). Das Protein besitzt ohne Signalpeptid einen pI von 7,82 und ein Molekulargewicht von ca. 35kDa.

Die 1038bp lange PME3 DNS kodiert ein 346 Aminosäuren langes Protein. Mittels „Signal IP“ wurde das 27 AS lange Signalpeptid vorhergesagt. Das Protein wurde mit Hilfe der „CDD“ Datenbank als putative Pektin Methylesterase identifiziert (pfam01095). Ohne Signalpeptid besitzt das Protein laut *in Silica* Vorhersage einen pI von 7,82 und ein Molekulargewicht von 35096 Dalton. In Abbildung 5.7 ist das Signalpeptid durch grüne Schrift und die PME Domäne durch braune Schrift dargestellt. Die teilweise vorhandene Prosite-Signatur ist rot dargestellt. Die Klonierung und Expression von rekombinanten Pektin Methylesterasen ist im folgenden Abschnitt 5.4 beschrieben.

5.4 Versuche zur heterologen Expression der rekombinanten PME-Proteine in verschiedenen Expressionssystemen

Antiseren gegen bestimmte Proteine sind ein hilfreiches Mittel um spezifische Charakteristika, wie z.B. die Lokalisation *in vivo*, zu bestimmen. Auch lassen sich mit ihnen eine Vielzahl an weiteren Fragestellungen, durch z.B. „Western-Blot“ Experimente, beantworten. Ein Ziel ist es folglich mit rekombinanten Proteinen Antiseren herzustellen bzw. biochemische Charakteristika der rek. Enzyme zu untersuchen.

Es wurden eine Vielzahl an unterschiedlichen Expressionsvektoren und -systemen für die

Herstellung von rekombinanten PME Protein verwendet. Es wurden unterschiedliche Kulturbedingungen, wie z.B. Induktionsstärke, Temperatur, Zeit und Kulturvolumen ausgetestet, sowie unterschiedliche Kontrollen, wie z.B. Promoteraustausch, Induktions DTT Kontrollen, etc. durchgeführt (siehe Material & Methoden). In keinem der Expressionssysteme ließ sich rekombinantes Protein nachweisen. Alle Klone wurden kontrollsequenziert. In Tabelle 5.2 sind die Unterschiedlichen Expressionsvektoren und Systeme aufgeführt.

| <i>Vektor</i> | <i>Expressionssystem</i> | <i>Geplante Verwendung</i> |
|----------------------|----------------------------|---|
| pQE30::PME1NtΔ314AS | <i>Escherichia coli</i> | PME-Domäne; Antiserum (AS) bzw. Charakterisierung |
| PQE30::PME1w/SP | BL21, Origami™, | Protein ohne Signalpeptid (SP); AS bzw. Charakterisierung |
| PQE30::PME1Ct240AS | Rosetta-gami™ | Fragment der PME-Domäne; AS |
| PQE30::PME2w/SP | | PME-Domäne, AS bzw. Charakterisierung |
| PQE30::PME3w/SP | | |
| PETM20m::PME3w/SP | | |
| PQE30::PME3w/SP | | |
| PET22b::PME1w/SP | | |
| PPICZαA::ProPME1w/SP | <i>Pichia pastoris</i> X33 | PME1 Pro-Domäne; AS bzw. Charakterisierung |
| PPICZαA::PME2w/SP | | PME-Domäne; AS bzw. Charakterisierung |
| PPICZαA::PME3w/SP | | |

Tabelle 5.2: Expressionsvektoren und -systeme, sowie die geplante Verwendung

5.5 Expressionsmuster der Pektin Methylesterasen PME1 bis PME4 in *Zea mays* mittels semi-quantitativer RT-PCR

Die durch Datenbankrecherchen erhaltenen PME Daten sind zum Großteil aus Pollen bzw. Antheren gewonnen worden. Um zu testen, in welchen Pflanzenorganen diese PMEs transkribiert werden, wurde aus verschiedenen Geweben gesamt-RNS isoliert und mittels RT-PCR auf die unterschiedlichen PMEs getestet. In Abbildung 5.8 ist das Vorkommen der vier PMEs in unterschiedlichen Geweben dargestellt.

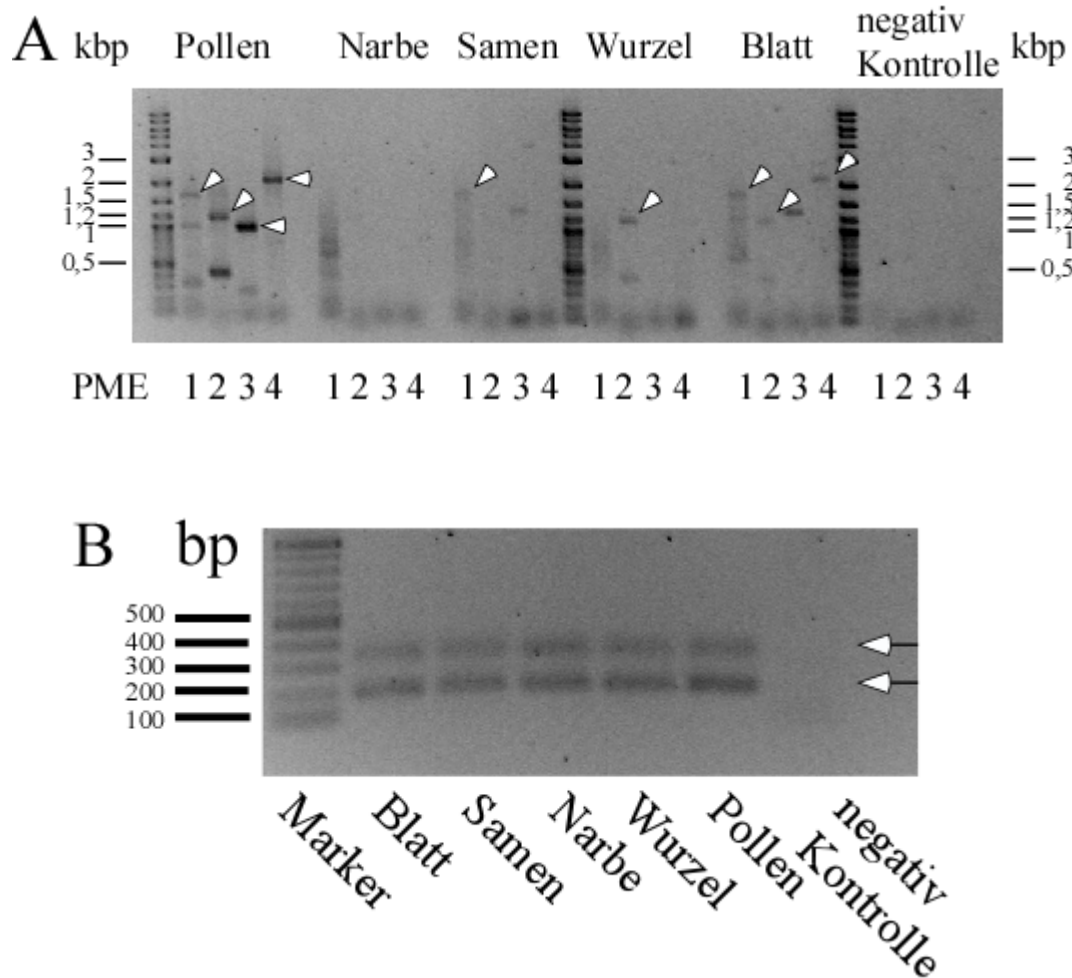


Abbildung 5.8

PME Expressionsmuster in unterschiedlichen Maisgeweben

A: Durch Pfeile sind die unterschiedlichen Mais PMEs markiert. Neben den spezifischen PCR Fragmenten wurden auch noch unspezifische PCR Produkte detektiert. Alle vier PMEs werden sowohl im Pollen als auch im Blatt, bis auf PME3, transkribiert. Im Samen lässt sich nur ein sehr schwaches PME1 PCR Produkt erkennen. In Wurzelgewebe lässt sich nur PME2 nachweisen. Im Narbengewebe lässt sich keine der vier Pektin Methylesterasen nachweisen. PME1 ~1700bp; PME2 ~1200bp; PME3 ~1000bp; PME4 ~1800bp; **B:** Aktinkontrolle; in allen Gewebeproben lassen sich zwei Aktintranskripte detektieren (weiße Pfeile). Die Transkriptmenge in den Gewebeproben erscheint gleichmäßig (semi-quantitative RT-PCR).

Wie aus der Abbildung zu entnehmen ist, werden die vier Pektin Methylesterasen aus *Zea mays* in unterschiedlichen Geweben transkribiert. Das Transkript der Pektin Methylesterase PME1 kann in Maispollen, Maissamen und Maisblättern nachgewiesen werden. Die spezifischen PCR-Produkte sind in Abbildung 5.8 durch weiße Pfeile gekennzeichnet. Im Narbengewebe konnten keine Transkripte der vier PMEs nachgewiesen werden. Im Samen kommt es zur schwachen

Transkription von PME1. In der Wurzel lassen sich nur PME2 Transkripte nachweisen. Das PME4 PCR Produkt wird bei ca. 2100 Basenpaare detektiert. Trotz dem etwas zu großen Laufverhalten im TAE-Agarosegel konnte während der späteren Klonierung die PME4 Sequenz bestätigt werden. In allen Ansätzen wurde die gleiche Menge cDNS benutzt. Da sich in allen PCR Reaktionen der internen Kontrolle zwei Aktinprodukte in ca. gleicher Menge nachweisen lassen, kann man von einer semi-quantitativen RT-PCR sprechen.

5.6 cDNS-Klonierung von vier in Maispollen exprimierten PME-Isoformen

Die vier Pektin Methylesterase Inhibitor verwandten Proteine PME1-RPs wurden durch eine Analyse der Mais-EST-Datenbank (ZmDB, (Gai *et al.*, 2000)) mit Hilfe der Sequenz eines Tabak Invertase Inhibitors, Nt-INH1 (Greiner *et al.*, 1998) identifiziert. Jan Eufinger konnte in seiner Diplomarbeit zeigen, dass die PME1-RPs ausschließlich in Maispollen vorliegen. Die Daten der ZmDB wurden später in die MaizeGDB integriert.

Die bisherigen Inhibitionsversuche mit rekombinanten PME1-RP-Proteinen auf Invertase- und PME-Proben haben bisher zu keinen eindeutigen Ergebnissen geführt. Dies könnte daran liegen, dass die erforderlichen Disulfidbrücken nicht bzw. falsch ausgebildet sind. Um die richtigen Ausbildungen der Disulfidbindungen zu gewährleisten, wurden die proteinkodierenden Sequenzbereiche ohne Signalpeptid mit Hilfe der PCR-Technik angereichert und nach enzymatischem Verdau mit den entsprechenden Restriktionsenzymen in die schon vorbereiteten pETM20m-Vektoren eingebracht. Der pETM20 Vektor musste vor der Klonierung jedoch noch modifiziert werden. Als einziges Restriktionsenzym für die 5'-Klonierung steht *NcoI* zur Verfügung. Diese Restriktionsschnittstelle kommt jedoch in jeder PME1-RP Sequenz vor und kann folglich nicht verwendet werden. Der Vektor wurde zur Modifikation mit *NcoI* verdaut, mit Mung Bohnen Nuclease behandelt, dephosphoryliert und anschließend mit dem „KpnI-Linker“ von „New England Biolabs“ zum Vektor pETM20m ligiert. In diesem Vektor wird das Kandidatengen hinter eine für Thioredoxin kodierende Sequenz fusioniert. Bei den vorangegangenen PME1-RP Proteinreinigungen wurde kaum lösliches Protein erhalten. Die Fusionierung mit Thioredoxin soll diesen Nachteil beseitigen. Das Kandidatenprotein erhält man nach anschließender Spaltung des Fusionsproteins mit der TEV-Protease. Desweiteren soll Thioredoxin die Bildung von Disulfidbrücken fördern und die Löslichkeit des Produktes erhöhen.

Die erhaltenen Klone wurden zur Kontrolle sequenziert und anschließend in den Rosetta-gamiTM

Bakterienstamm eingebracht. Der Rosetta-gamiTM-Stamm besitzt neben der Eigenschaft ein leicht oxidierendes Zellmilieu zu haben das Plasmid pRARE. Dieses Plasmid kodiert fünf tRNS Moleküle, deren Basentriplets in Bakterien kaum vertreten sind und das Fehlen dergleichen die Proteinsynthese verhindern kann. Die Expression von rekombinanten Pektin Methylesterase-Inhibitoren ist im Abschnitt 5.9 beschrieben.

5.7 Entwicklungsabhängige Expression der verschiedenen PMEIIsoformen

Es wurden unterschiedliche Pflanzenextrakte hergestellt und im „Western-Blot“ auf das Vorhandensein von PMEII-Proteinen getestet. In Abbildung 5.9 sind unterschiedliche Maisgewebe mit dem affinitätsgereinigtem PMEII-RP3 Antikörper inkubiert worden. Deutlich ist zu erkennen dass die nativen PMEIs nur im Pollen vorkommen. Ca. zwei Tage bevor der Pollen reif ist, sind bereits PMEIs nachweisbar. Am Tag an dem es zur Pollenausschüttung kommt, lässt sich die größte Menge an PMEIs nachweisen. Die Ergebnisse untermauern die vorangegangenen „Northern-Blot“ Untersuchungen (Diplomarbeit Jan Eufinger 2002).

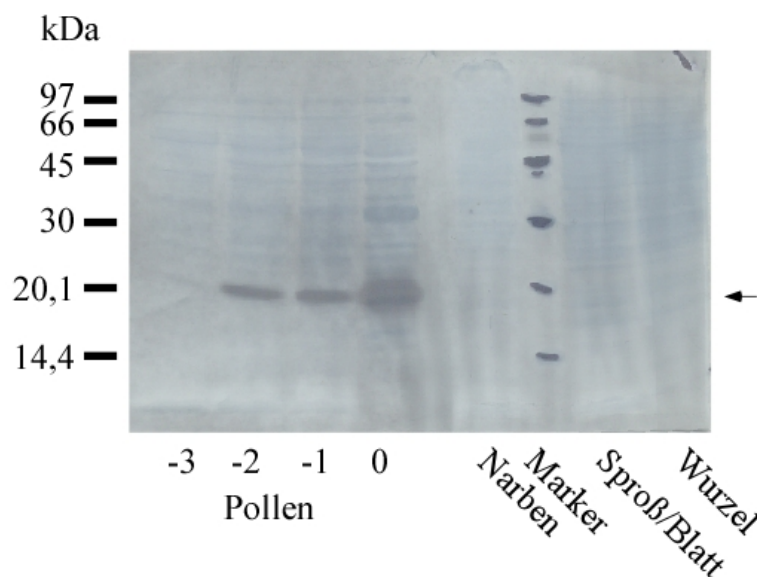


Abbildung 5.9

Expression von PMEII-RPs in *Zea mays* Geweben

Proben -3 bis 0: Maispollenproben kurz vor der Pollenausschüttung (Tag 0). Es lassen sich nur native PMEII-RPs in den Pollenproben nachweisen. Die Amidoschwarz gefärbte Membran ist gleichmäßig beladen. An Tag 0 lässt sich die größte Menge an PMEII-RPs nachweisen (Pfeil). (Tag 0 ist im Amidoschwarzstainig etwas stärker gefärbt. Das stärkere Immunsignal lässt sich dadurch jedoch nicht erklären. Im Narben-, Sproß-/Blatt- und Wurzelgewebe lassen sich keine PMEII-RPs nachweisen.

5.8 Sind die nativen PMEI-RPs aus *Zea mays* glykosiliert?

Möglicherweise ist für die Funktion der nativen PMEI-RPs eine Glykosilierung notwendig. Zum Nachweis wurden Maispollenproben über eine Concanavalin-A Säule gereinigt. Es handelt sich hierbei um eine Lektin Chromatographie bei der Proteine über ihre Zuckerreste an die Matrix gebunden werden. Wie in Abbildungen 5.10 und 5.11 zu sehen ist, binden die nativen Mais PMEI-RPs nicht an die Concanavalin-A Matrix. PMEI-RPs lassen sich nur im Rohextrakt und Con-A Durchfluss nachweisen. Eine Glykosilierung der nachgewiesenen nativen PMEI-RPs findet nicht statt und ist für die Funktion im Maispollen vermutlich nicht erforderlich. Der Bandensprung in 5.10 lässt sich durch das Vorhandensein von Disulfidbindungen der nicht-reduzierenden Proben erklären. Durch diese Bindungen kann sich das Protein nicht ganz entfalten und läuft in einer SDS-PAGE weiter, als wenn diese reduziert und gelöst wären.

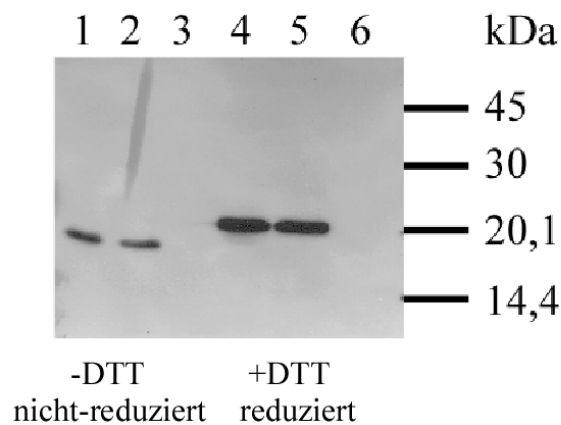


Abbildung 5.10

Nachweis eines redox-shift von PMEI-RP Banden

An die Concanavalin-A Säule binden spezifisch Glykoproteine. Es lassen sich nur in den Probenspuren 1,2 und 4,5 PMEI-RPs nachweisen. Im Con-A Eluat, Spuren 3 und 6, findet sich kein Immunsignal. Spur 1: Rohextrakt; Spur 2: Durchlauf; Spur 3: Eluat; Spur 4: Rohextrakt reduziert; Spur 5: Durchlauf reduziert; Spur 6: Eluat reduziert; 15%ige SDS-PAGE, affi-Anti-PMEI-RP3

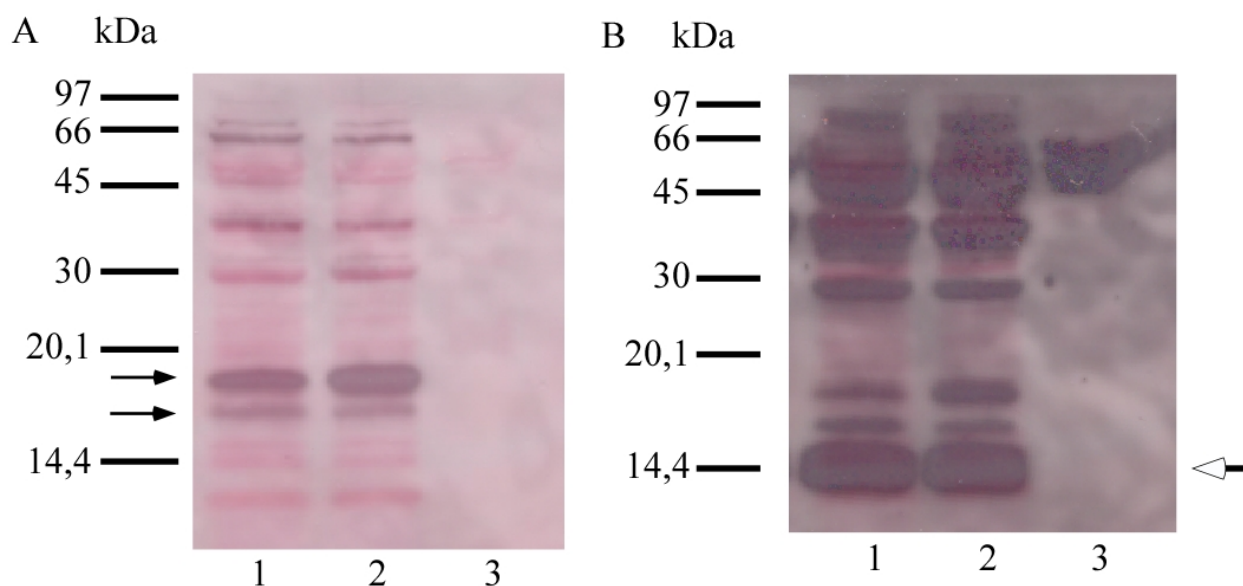


Abbildung 5.11

PMEI-RP Nachweis nach Concanavalin-A Chromatographie

Es lassen sich nur in den Proben Spuren 1 und 2 PMEI-RPs nachweisen. Im Con-A Eluat, Spur 3, findet sich kein Immunsignal. In A werden zwei Banden detektiert (schwarze Pfeile), in B überlagern sich zwei Banden (weißer Pfeil). Spur 1: Rohextrakt; Spur 2: Durchlauf; Spur 3: Eluat; 15%-ige Tris-Tricine SDS-PAGE, affi-anti-PMEI-RP3 A und anti-PMEI-RP1 B

5.9 Heterologe Expression von vier rekombinanten, in Maispollen exprimierten PMEI-Proteinen

Die besten Expressionsergebnisse wurden bei einer IPTG Konzentration von 0,1mM und einer Inkubation von 18h bei 16°C und 180rpm erreicht. Stellvertretend für alle durchgeführten Proteinreinigungen werden in Abbildung 5.12, 5.13, 5.14 und 5.15 jeweils eine Reinigung dargestellt. In Abbildung 5.16 sieht man die gesammelten Fraktionen einer Trx::PMEI-RP2 Proteinreinigung, die bereits mit der „TEVase“ gespalten und über eine Nickel-Säule von $_{\text{His6}}$ Thioredoxin und $_{\text{His6}}$ Tevase getrennt wurde. Im Verlauf der weiteren Proteinaufarbeitung wurden durch Dialysen und „TEV“ Spaltung große Mengen an rekombinanten Protein verloren. Es kommt bereits während der Dialyse zum TEV-Spaltungspuffer zum Ausfallen von rekombinantem Protein. Dies konnte bei allen vier PMEI-RP Proteinen beobachtet werden. Besonders Trx::PMEI-RP1 bzw. PMEI-RP1 neigt dazu, während den weiteren Schritten sehr rasch zu präzipitieren und zu degradieren. Meist lässt sich nur noch eine sehr geringe Menge an geschnittenem PMEI-RP1 Protein nachweisen. Trotz langem waschen, können kontaminierende Proteine nicht mehr ausgewaschen werden.

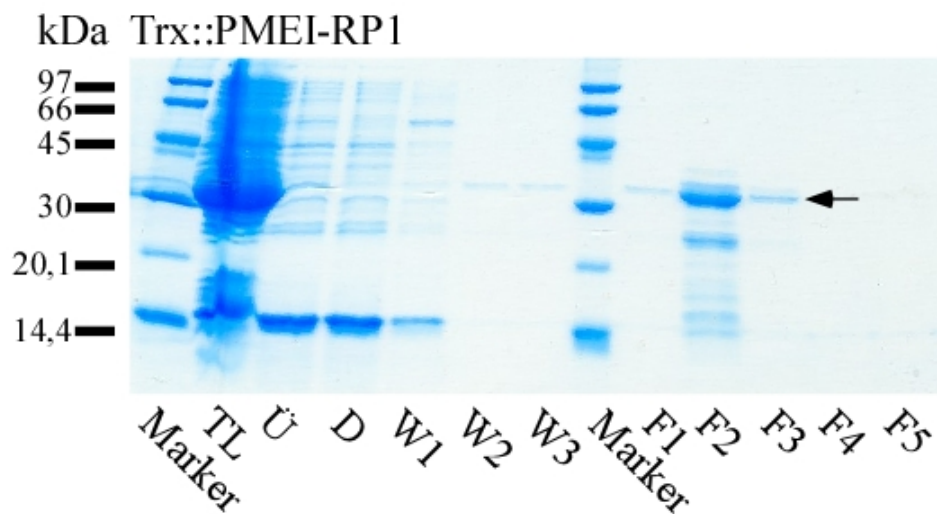


Abbildung 5.12

Reinigung von $\text{His}_6\text{Trx::PMEI-RP1}$ aus Rosetta-gamiTM Bakterien

Coomassiefärbung einer 15%-igen „SDS-PAGE“. Geladen wurden Totallysat 10 μl , Überstand 10 μl , Durchlauf 10 μl , Waschpuffer je 20 μl , Fraktionen 1 bis 5 je 10 μl geladen. Es wird sehr sauberes Protein erhalten, das kaum Kontaminationen aufweist. Trx::PMEI-RP1 bandet bei ungefähr 32 kDa (Pfeil). Nur wenig rek. Protein lässt sich nachweisen. 500 μl pro Fraktion.

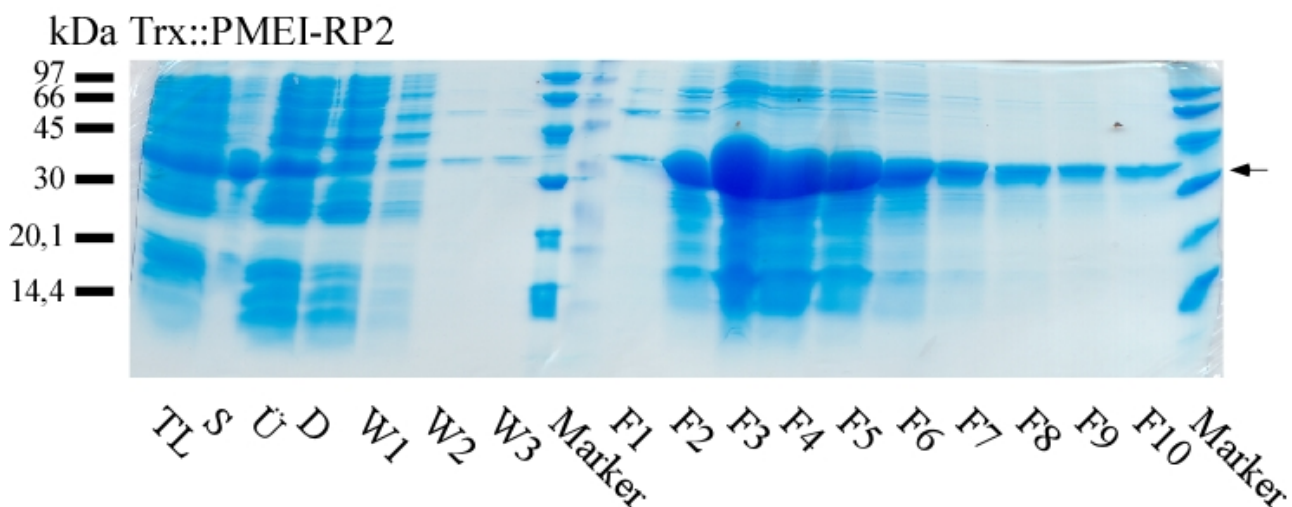


Abbildung 5.13

Reinigung von $\text{His}_6\text{Trx::PMEI-RP2}$ aus Rosetta-gamiTM Bakterien

Coomassiefärbung einer 15%-igen „SDS-PAGE“. Geladen wurden Totallysat 10 μl , Sediment 5 μl , Überstand 10 μl , Durchlauf 10 μl , Waschpuffer je 20 μl , Fraktionen 1 bis 10 je 10 μl geladen. Die Fraktionen F3 bis F5 weisen die höchste Konzentration an rekombinanten Protein auf. Neben dem rekombinanten Protein (Pfeil) lassen sich noch weitere Banden nachweisen. Trx::PMEI-RP2 lässt sich bei ~ 32 kDa nachweisen. Dies entspricht dem vorhergesagten Molekulargewicht. Das rekombinante Protein verteilt sich über mehrere 500 μl Fraktionen.

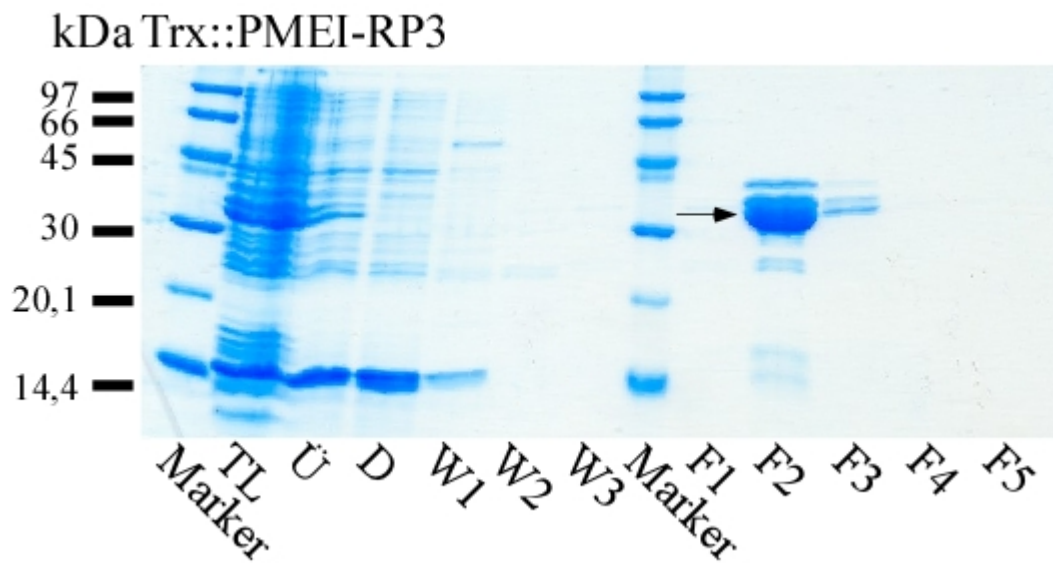


Abbildung 5.14

Reinigung von $\text{His}_6\text{Trx::PMEI-RP3}$ aus Rosetta-gamiTM Bakterien

Coomassiefärbung einer 15%-igen „SDS-PAGE“. Geladen wurden Totallysat 10 μl , Überstand 10 μl , Durchlauf 10 μl , Waschpuffer je 20 μl , Fraktionen 1 bis 5 je 10 μl geladen. Relativ saubere $\text{His}_6\text{Trx::PMEI-RP3}$ Reinigung mit wenig kontaminierenden Proteinen. Fast das gesamte rekombinante Protein lässt sich in Fraktion 2 nachweisen. Gesammelt wurden 1ml Fraktionen.

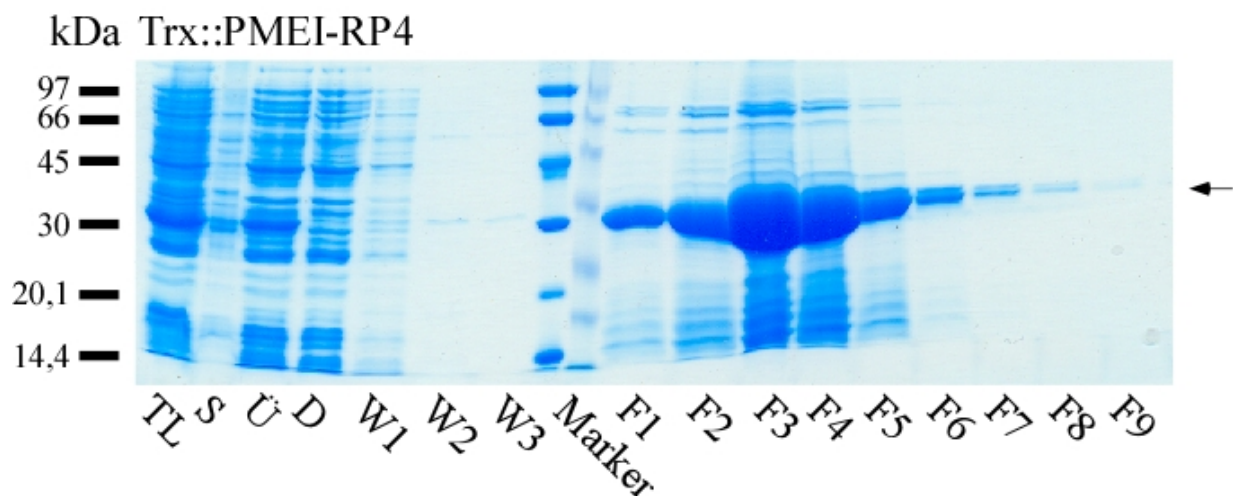


Abbildung 5.15

Reinigung von $\text{His}_6\text{Trx::PMEI-RP4}$ aus Rosetta-gamiTM Bakterien

Coomassiefärbung einer 15%-igen „SDS-PAGE“. Geladen wurden Totallysat 10 μl , Sediment 5 μl , Überstand 10 μl , Durchlauf 10 μl , Waschpuffer je 20 μl , Fraktionen 1 bis 9 je 10 μl geladen. In den Hauptfraktionen F2 bis F5 lassen sich neben großen Mengen an rekombinantem Protein bei ~ 32 kDa (Pfeil) noch weitere Banden nachweisen. Hierbei kann es sich um bakterielle Proteine oder aber um Degradationsprodukte von Trx::PMEI-RP4 handeln. 500 μl pro Fraktion.

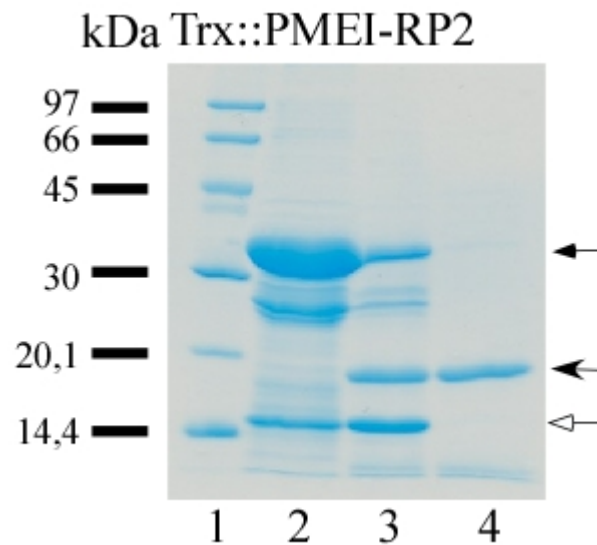


Abbildung 5.16

Prozessierung von $\text{His}_6\text{Trx-PMEI-RP2}$ in His_6Trx und PMEI-RP2

Spur 1: LMW-Marker; Spur 2: Trx-PMEI-RP2 vor TEV-Spaltung; Spur 3: 3h nach TEV-Verdau; Spur 4: Fertig prozessiertes rekombinantes PMEI-RP2 Protein, das von His_6Trx und $\text{His}_6\text{Tevase}$ gereinigt wurde. Einfacher Pfeil: $\text{His}_6\text{Trx::PMEI-RP2}$; Spitzer Pfeil; PMEI-RP2; weißer Pfeil: His_6Trx . Die Bande bei 28 kDa könnte $\text{His}_6\text{Tevase}$ sein (Spur 2&3). 15%-ige „SDS-PAGE“

5.10 Indirekter Nachweis von Disulfidbrücken in PMEI-RPs

Nach Reinigung und Prozessierung der rekombinanten PMEI-RPs wurden diese im „Western-Blot“ und mit Hilfe von Coomassiefärbung auf einen Bandensprung unter reduzierenden und nicht-reduzierenden Bedingungen untersucht. Nicht-reduzierte Proben besitzen noch Disulfidbindungen und halten das Protein in einer kompakteren Form. Durch die kompakte Form laufen die Proteine in einer „SDS-PAGE“ weiter als im reduzierten Zustand. In Abbildung 5.17 wurde die Membran mit affinitätsgereinigtem PMEI-RP3 Antikörpern inkubiert und ausgewertet. Die polyklonalen Antikörper binden an PMEI-RP2, PMEI-RP3 und PMEI-RP4. Das PMEI-RP2 Signal ist schwächer. Im Vergleich zu den anderen zwei dargestellten PMEI-RPs. wird nur das reduzierte Protein erkannt. Aus diesem Grund wurde der Bandensprung von PMEI-RP2 durch Coomassiefärbung nachgewiesen, Abbildung 5.18. Für PMEI-RP1 konnte ebenfalls ein Bandensprung nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

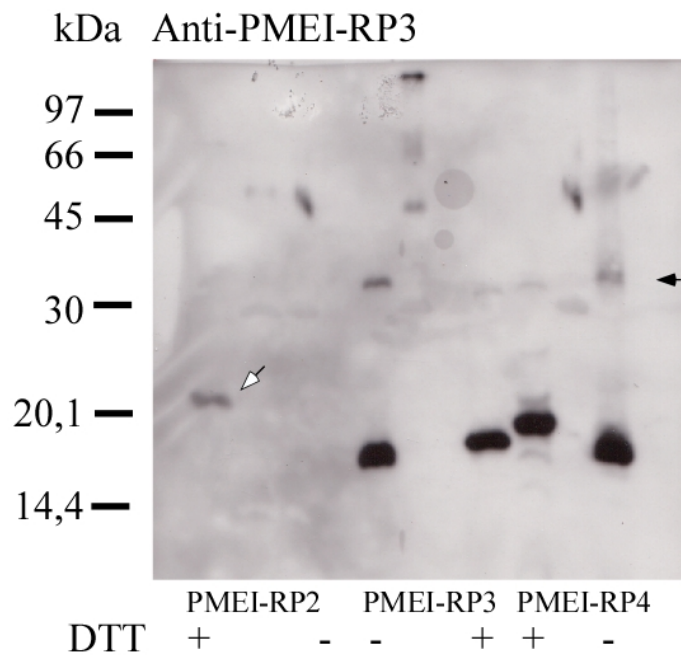


Abbildung 5.17

Hinweis von Disulfidbrücken bei den rekombinanten Proteinen PMEI-RP2, PMEI-RP3 und PMEI-RP4

Zwischen den Proben mit DTT und ohne DTT wurden jeweils Spuren freigelassen. Die gereinigten PMEI-RP3 Antikörper detektieren nur die reduzierte Form von PMEI-RP2 (weißer Pfeil). PMEI-RP3 und PMEI-RP4 werden sowohl reduziert als auch nicht reduziert vom Antikörper erkannt. Die Banden bei 32 kDa sind noch Überreste der Thioredoxininfusionsproteine. Die Banden zwischen den Probenspuren bei 45 und 66 kDa werden durch Kreuzreaktionen der Antikörper mit Markerproteinen verursacht. 15%-ige „SDS-PAGE“; affinitätsgereinigte PMEI-RP3 Antikörper.

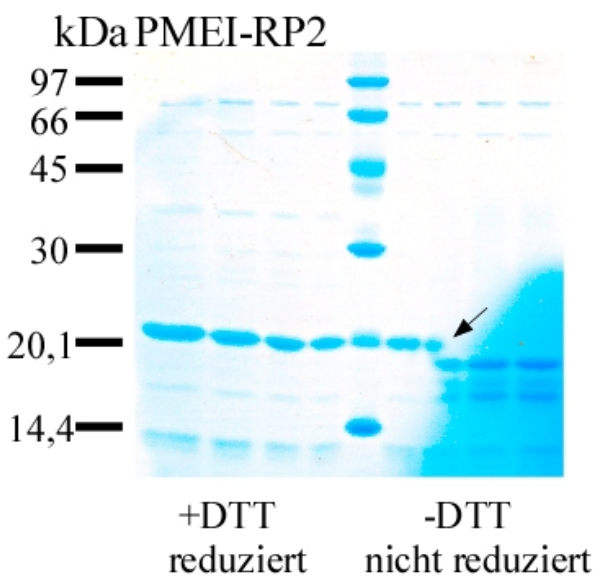


Abbildung 5.18

Hinweis von Disulfidbrücken von PMEI-RP2 unter reduzierenden und nicht-reduzierenden Bedingungen

Coomassie Färbung, da der Antikörper das nicht-reduzierte PMEI-RP2 nicht detektiert. Aufgetragen wurden unterschiedliche Mengen an prozessierten PMEI-RP2 Protein geladen. Der schwarze Pfeil zeigt den Bandensprung innerhalb einer Spur. Während dem Gellauf diffundiert DTT aus der Markerspur in die ersten zwei Probenspuren ohne DTT hinein; 15%-ige „SDS-PAGE“

5.11 Versuche zum Nachweis der Komplexbildung zwischen PME- und PMEI-Proteinen

In Publikationen, die sich mit Invertasen, PMEs und anderen am Zuckerstoffwechsel beteiligten Enzymen befassen, wurde gezeigt, dass unter physiologischen Bedingungen viele Inhibitor-Proteine mit ihren Zielproteinen einen stabilen Komplex bilden. Daher wurde versucht mit unterschiedlichen Methoden Proteinkomplexe zwischen PMEs und PMEIs nachzuweisen. Unter anderem wurde versucht durch Co-Immünpräzipitationen mit anti-PMEI-RP3 Antikörpern, die kovalent an eine Protein-A-Sepharose Matrix gebunden waren, natives PMEI-RP3 und mögliche gebundene Zielproteine nachzuweisen. In diesen Versuchen konnte kein natives PMEI-RP3 Protein und somit keine Zielproteine präzipitiert werden. Wie sich später in Immunfluoreszenzen herausstellte, sind die Antikörper gegen PMEI-RP1 und PMEI-RP3 nicht in der Lage, die nativen Proteine zu detektieren. Zusätzlich wurde auch ein „Far-Western Blot“ Versuch mit rekombinantem PMEI-RP3 Protein durchgeführt („Overlay“). Auch hier konnten keine neuen Banden oberhalb 20kDa detektiert werden. Anschließend wurden noch unterschiedliche „Cross-Linker“ wie DSP, DMP und EDC eingesetzt. Proteinkomplexe ließen sich so aber auch nicht nachweisen (Daten nicht gezeigt). Da die bisherigen Versuche Protein-Komplexe mit den PMEI-RPs nachzuweisen zu keinen Ergebnissen führten, wurde abschließend eine „Größen-Ausschluss-Flüssigkeitschromatographie“ durchgeführt. Als Matrix wurde „Sephadex G100-Fine“ verwendet.

Mit Hilfe der „Sephadex G100-Fine“-Säule wurden unterschiedliche Maisproben aufgetrennt. Unter anderem wurden Extrakte aus Pollen, Pollen mit Narbengewebe, Pollen gekeimt auf Narbengewebe sowie Narbengewebe alleine aufgetrennt. Die Probenvorbereitung wurden unter weitestgehend nativen Bedingungen durchgeführt. In allen durchgeführten Läufen konnten nur monomere PMEI-RPs nachgewiesen werden. Stellvertretend für die durchgeführten Läufe ist in Abbildung 5.19 die Auftrennung einer Maispollenprobe dargestellt. In Abbildung 5.20 sind die PME Aktivitäten der einzelnen Fraktionen abgebildet.

Neben der „Sephadex G100-F“ Säule wurde auch eine „Superdex 200“ FPLC von Pharmacia verwendet. Neben einer besseren Trennung der Proteine lässt sich jedoch kein Unterschied nachweisen.

In Tabelle 5.3 sind die Ergebnisse aller untersuchten Proben zusammengefasst.

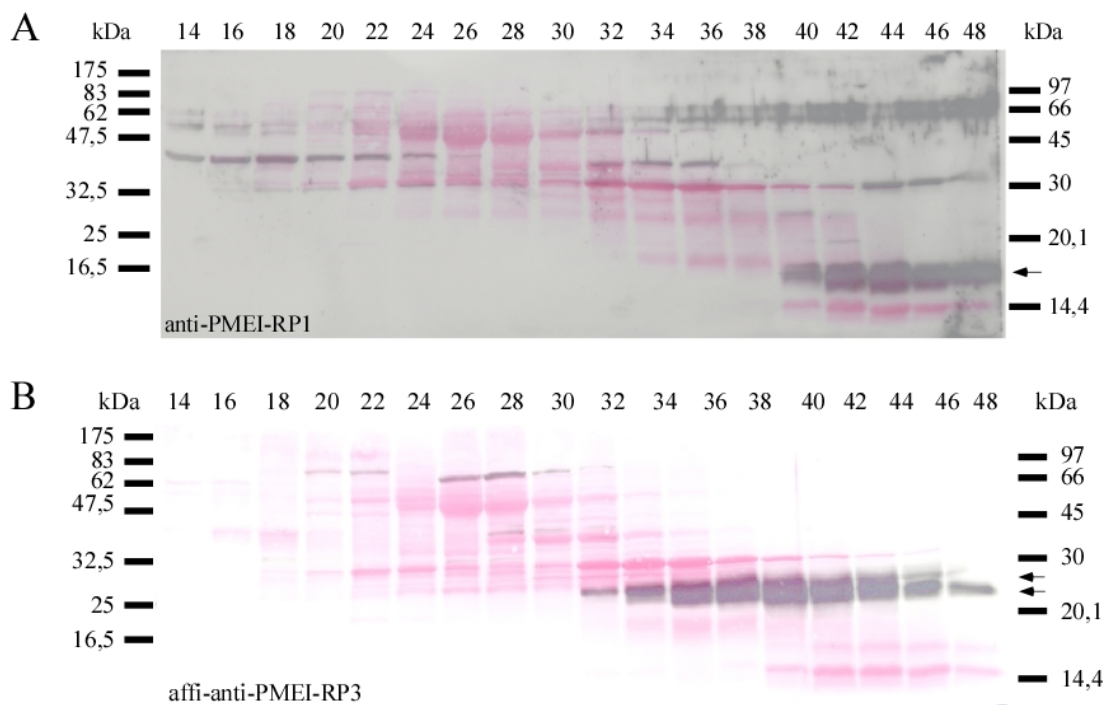


Abbildung 5.19

Maispollen „Sephadex G100-Fine“ Gelfiltration

Es lassen sich nur monomere Inhibitoren nachweisen (Pfeile). Die putativen Zielproteine sind um Fraktion 18 und um Fraktion 27 vorhanden. 15%-ige Tris-Tricine SDS-PAGE; anti-PMEI-RP1; Ponceaurot unterlagert

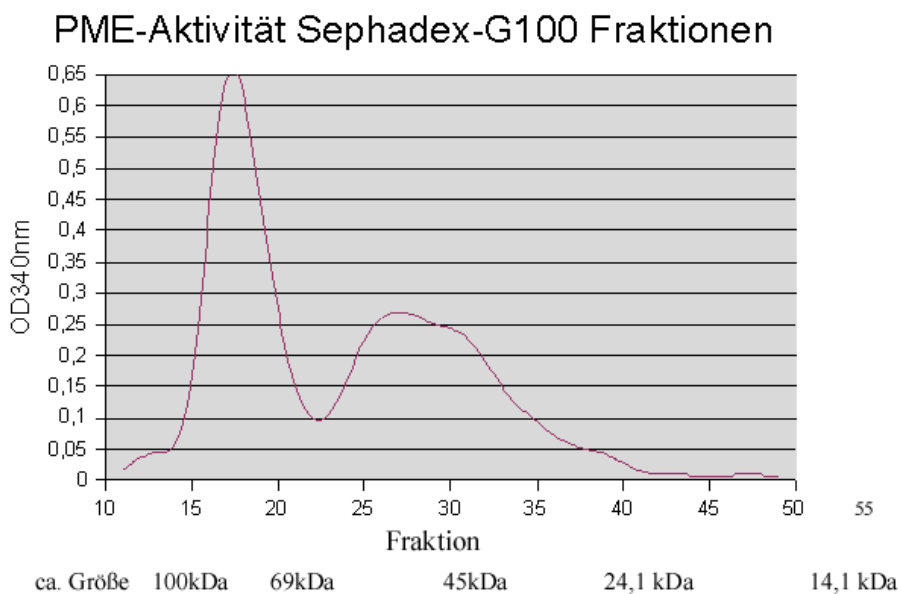


Abbildung 5.20

Relative PME Aktivität der einzelnen Sephadex-G100 Fraktionen

Es können zwei Pektin Methylesterase Aktivitätsmaxima nachgewiesen werden. Die erste Aktivitätsspitze liegt um Fraktion 17, die zweite um Fraktion 27. Eingesetzt 25µl von 600µl Fraktionen.

| | <i>Proben</i> | <i>Laufverhalten PMEI-RP1</i> | <i>Laufverhalten PMEI-RP2/3/4</i> |
|---|---------------------------------|-------------------------------|-----------------------------------|
| 1 | Pollen | monomer | monomer |
| 2 | Pollen mit Narbengewebe | monomer | monomer |
| 3 | Pollen auf Narbengewebe gekeimt | monomer | monomer |
| 4 | Rekombinantes PMEI-RP2 | | monomer |
| 5 | Rekombinantes PMEI-RP3 | | monomer |

Tabelle 5.3 Gelfiltration

Sollte es sich bei den Proteinen tatsächlich um Pektin Methylesterase Inhibitoren handeln, würde man eine Interaktion mit den Zielproteinen erwarten. In Abbildung 5.20 sieht man, dass es zwei Aktivitätsmaxima gibt. In den entsprechenden Fraktionen, Abbildung 5.19, lassen sich weder PMEI-RP1 noch PMEI-RP2/3/4 nachweisen.

In den Tabakpollen, die transient mit PME2::*RFP* und PMEI-RP1::*YFP* bzw. PMEI-RP3::*YFP* transformiert wurden, kann man sehen, dass beide Proteine in der Zellwand vorliegen. Es lässt sich jedoch beobachten, Abbildung 5.25, dass die Lokalisationen nicht übereinstimmen.

5.12 *In vitro*-Versuche zur Inhibition von PME-Aktivität

Die vier rekombinanten PMEI-RPs wurden auf ihre inhibitorische Wirkung gegen Mais Pollen, Samen-, Narben-, Wurzel-PMEs und PME aus der Spitze von Keimlingen (1cm der Spross-spitze) untersucht. Als PME bzw. Invertase Proben wurden unter anderem die Gelfiltrationsfraktionen verwendet. In diesen können keine der zu charakterisierenden PMEI-RPs nachgewiesen werden. Mit den rekombinanten PMEI-RPs ließ sich in *in vitro* Untersuchungen keine Inhibition der PME- und Invertase-Proben nachweisen. Mit dem *Arabidopsis thaliana* Pektin Methylesterase Inhibitor AtPMEI1 konnte jedoch die PME-Aktivität der Keimlingsproben komplett gehemmt werden, siehe Abbildung 5.21.

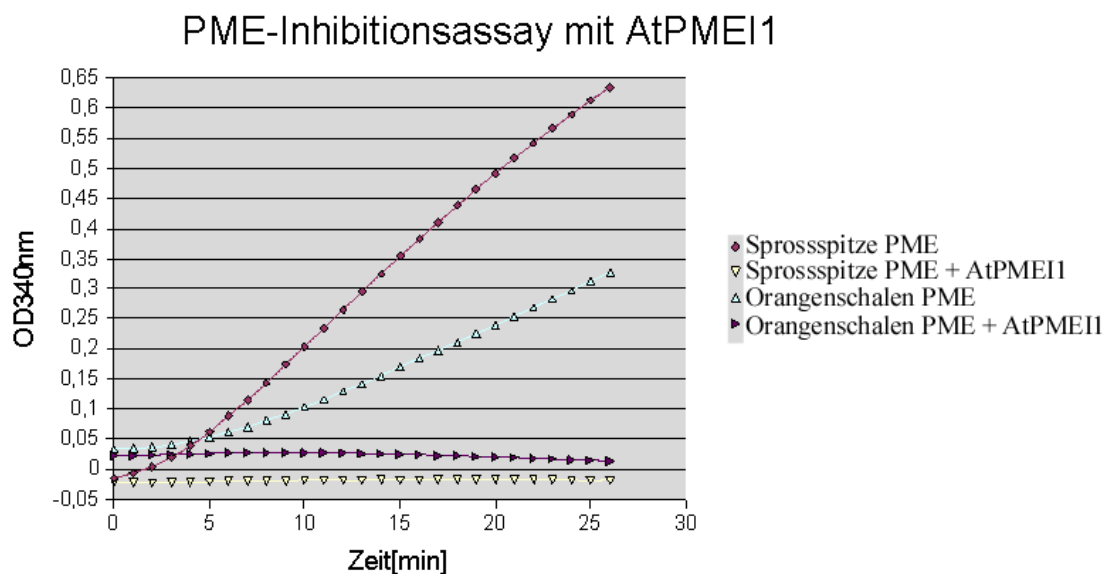


Abbildung 5.21

PME-Inhibitionsversuch mit AtPMEI1

Der *Arabidopsis thaliana* PME Inhibitor AtPMEI1 ist in der Lage, die Aktivität von Orangenschalen- (Sigma) und Mais Spross-spitzen PME (1cm der Spitze) vollständig zu inhibieren.

5.13 Wirkung von exogener PME-Gabe auf Pollenkeimung und Pollenschlauchwachstum

Biochemische Versuche Pektin Methylesterasen und PMEI-RPs zu charakterisieren haben zu keinen Resultaten, die Hinweise auf eine mögliche Interaktion der betreffenden Kandidatenproteine geben, geführt. Aus diesem Grund wurden zellbiologische Untersuchungen mit den betreffenden Proteingruppen durchgeführt.

Geht man davon aus, dass es sich bei den vier PMEI-RPs tatsächlich um Pektin Methylesterase Inhibitoren handelt, würde man erwarten, dass das Fehlen dieser zu einer erhöhten PME Aktivität führen würde. Im folgenden Versuch wurde untersucht, welche Effekte eine erhöhte PME Aktivität auf die Pollenkeimung bzw. auf das Pollenschlauchwachstum haben kann. Zu diesem Zweck wurden Petrischalen mit Pollen-Keim-medium, das unterschiedliche Orangenschalen PME Konzentrationen (Sigma-Aldrich) aufweist, hergestellt. Auf diese Pollenkeimplatten wurde anschließend Tabak- und Mais-pollen gegeben, siehe Abbildung 5.22. Man kann erkennen, dass mit steigender PME Aktivität die Pollenschläuche kürzer und schmaler werden Abbildung 5.22A > 5.22D > 5.22G.

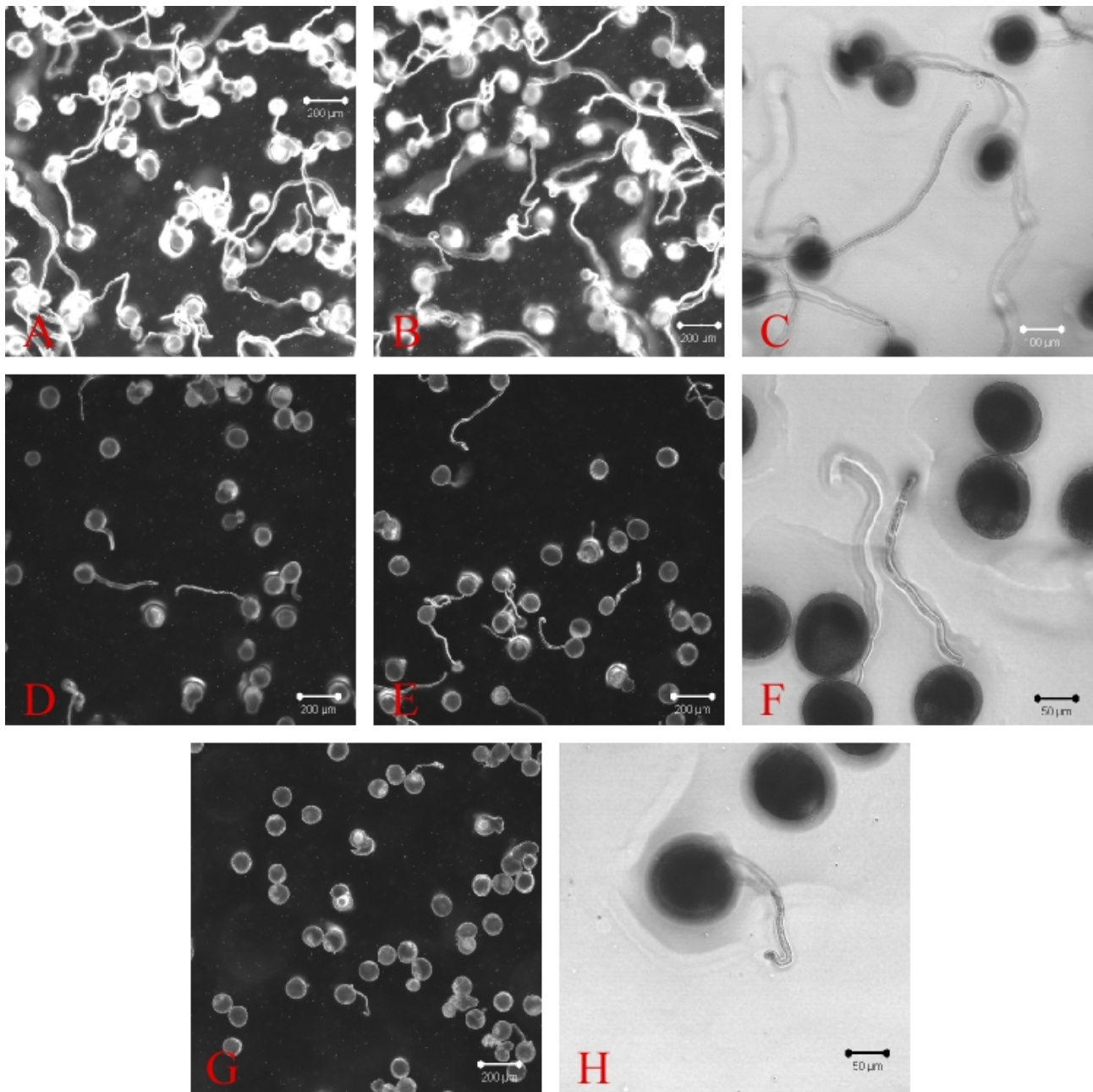


Abbildung 5.22

Gekeimter Maispollen auf Pollenkeimplatten, die mit unterschiedlichen PME Konzentrationen (Sigma, aus Orangenschalen) versetzt wurden

A,B,C: Kontrollplatten ohne PME-Zusatz, die meisten der Maispollen keimen aus und besitzen ein normales Pollenschlauchwachstum. D,E,F: Platten mit 0,3U/ml PME-Aktivität im Keimmedium, hier sind die Pollenschläuche kürzer und viele Pollen sind nicht in der Lage auszukeimen. Die Pollenschläuche sind teilweise dünner als die der unbehandelten Pollen. G,H: Platten mit 0,6U/ml PME-Aktivität im Keimmedium, nur noch sehr wenige Pollen sind in der Lage auszukeimen bzw. zu wachsen. Auskeimende Pollen sind sehr kurz und sehr dünn im Vergleich zu unbehandelten Pollenschläuchen. Maßstabsbalken A,B,D,G: 200µm; C: 100µm; F,H: 50µm

5.14 Subzelluläre Lokalisierung von Mais PME- und PMEI-Proteinen in wachsenden Pollenschläuchen mittels Reporter-Fusionen

Eine weitere Möglichkeit Kandidatenproteine zu charakterisieren, besteht darin, die betreffenden Zielproteine im heterologen Tabakpollen bzw. im Maispollen zu exprimieren. Die kodierenden Sequenzen der PMEI verwandten Proteine wurden in den Vektor pHD32::YFP und die der PMEs in den Vektor pHD223::RFP eingebracht. Die zwei unterschiedlichen Vektoren wurden aufgrund ihrer unterschiedlichen fluoreszierenden Proteine ausgesucht. Mit diesen ist es möglich, die putativen PMEI-RPs und die möglichen PME Zielproteine zusammen in Pollensystemen zur Expression zu bringen und mögliche Interaktionen zu beobachten. Die verwendeten Primer und die entsprechenden Restriktionsschnittstellen sind in der Primerliste im Material und Methodenteil aufgeführt.

Die Expressionvektoren pHD32::YFP und pHD223::RFP besitzen neben einer N-Terminalen fluoreszierenden Proteinsequenz den Promotor LAT52, der im Gegensatz zum CaMV35 Promotor in Pollen aktiv ist. Die beiden Vektoren wurden unserer Arbeitsgruppe von der AG Kost zur Verfügung gestellt. Alle erhaltenen Klone wurden mittels Sequenzierung überprüft.

5.14.1 Klonierungen von zwei Typ I PMEs und zwei Typ II PMEs aus *Zea mays* in den Vektor pHD223::RFP

Die Sequenzen der PME1, PME2, PME3 und PME4 wurden in den Hilfsvektor pCR2.1 (Invitrogen) eingebracht und kontrollsequenziert. Aus Zeitgründen konnte nur die PME2 kodierende Sequenz erfolgreich in den Zielvektor pHD223::RFP eingebracht werden. Die Integration der DNS an den Restriktionsschnittstellen wurde durch eine Kontrollsequenzierung bestätigt. In Abbildung 5.23 sind transient transformierte Tabakpollen abgebildet.

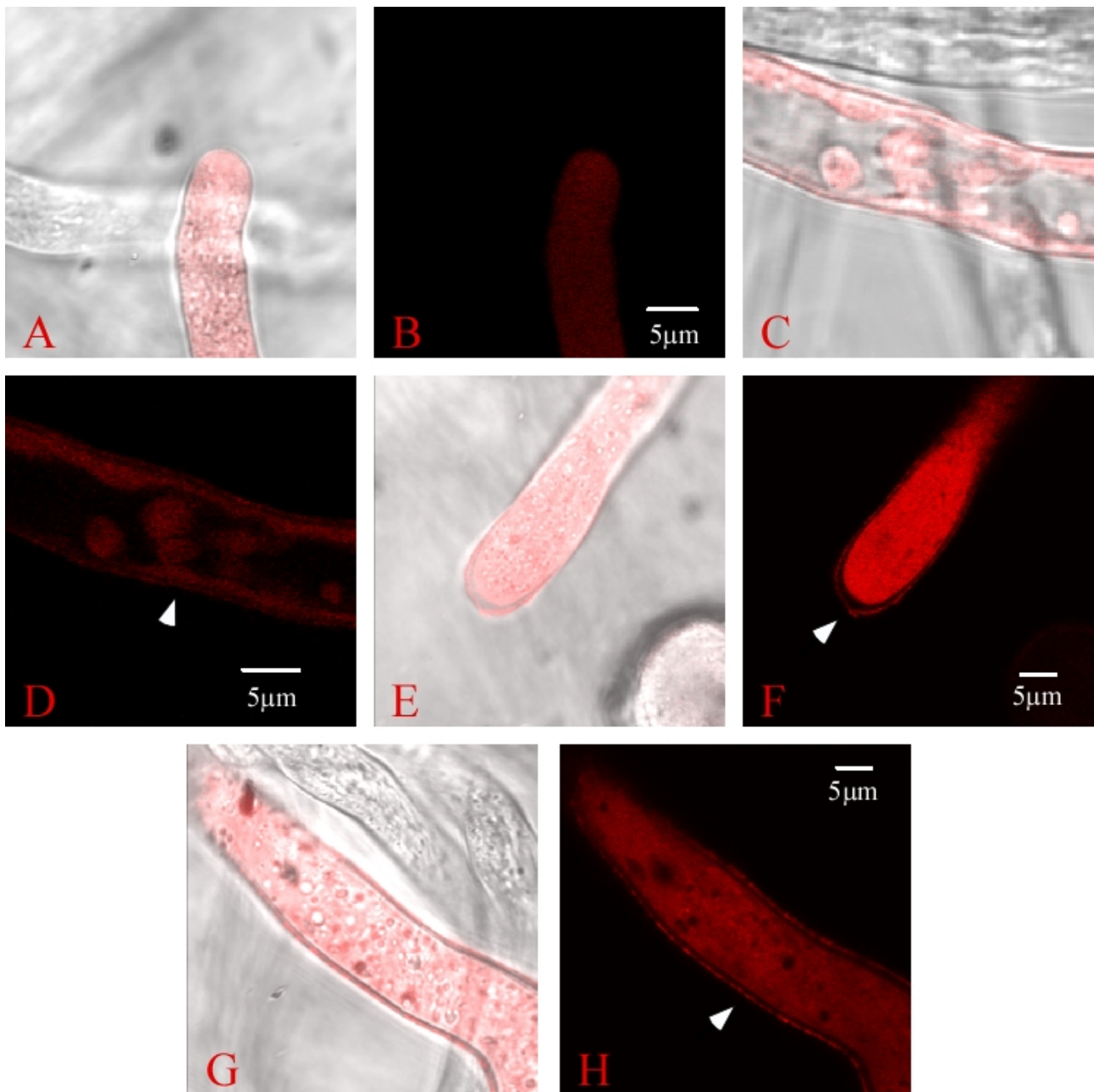


Abbildung 5.23

Fluoreszenz- und Hellfeld-Konfokalaufnahmen von pHD223::PME2::RFP transient transformierten Tabakpollen

A,B: Man kann ein diffuses Signal im gesamten Pollenschlauch bis zur Spitze sehen. C,D: schwaches diffuses Signal, das in der Vakuole zu fehlen scheint. Die großen globulären Gebilde sind vermutlich Cytoplasmaströme, die sich durch die ausgesparte Vakuole als große Vesikel abheben. Eine leichte Zellwandfärbung ist zu beobachten (Pfeil). E,F: Bis auf ein paar Ausparungen scheint der gesamte Pollenschlauch gefärbt zu sein. An der Pollenschlauchspitze findet sich ein schmaler Spalt ohne Signal (Plasmamembran). Die Zellwand ist stark gefärbt (Pfeil). G,H: Bis auf wenige Ausparungen erscheint der gesamte Pollenschlauch gefärbt. Sehr gut ist zu erkennen, wie das Cytoplasma durch die Plasmamembran von der durch Fluoreszenz gefärbten Zellwand getrennt ist (Pfeil).

Vor kurzem erschienen zwei Publikationen, die zeigen, dass die Überexpression einer PME in Pollen zu einem Phänotyp führen kann, der sich unter anderem durch verkürztes Streckenwachstum und eine dickere Zellwandspitze auszeichnet (Bosch *et al.*, 2005; Jiang *et al.*, 2005). Eine mögliche Verdickung der Zellwandspitze konnte teilweise beobachtet werden, siehe auch Abbildung 5.23,F. Eine Verkürzung der transient transformierten Tabakpollen konnte jedoch nicht beobachtet werden. Sie erreichen die gleiche Länge wie untransformierte Pollen (Daten nicht gezeigt).

5.14.2 Klonierung von PME1-RP1 bis PME1-RP4 aus *Zea mays* in den Vektor pHD32::YFP

Die kodierenden Sequenzen der jeweiligen PMEIs wurden in den Vektor pHD32::YFP kloniert und schließlich mittels ballistischer Transformation transient in Tabakpollen zur Expression gebracht. In Abbildung 5.24, 5.25, 5.26 und 5.27 sind Aufnahmen verschiedener Pollentransformationen zusammengefasst.

Das PME1-RP1::YFP Fusionsprotein (Abb. 5.24) wurde anhand der Fluoreszenz im sekretorischen Weg, ER und Golgi, detektiert. Sehr deutlich ist die Fluoreszenz im Zellwandraum zu erkennen, 5.24G Pfeil. Die beobachteten Lokalisierungen von PME1-RP1::YFP entsprechen den *in Silica* Vorhersagen. Auch befinden sich die putativen Zielproteine im sekretorischen Stoffwechselweg des Pollens. Eine Interaktion zwischen den PME1-RPs und PMEs bzw. Zellwandinvertasen ist also *in vivo* möglich. In Abbildung 5.25 lässt sich das fluoreszierende Fusionsprotein sehr gut in den einzelnen Bereichen, der Pollenschlauchspitze erkennen. Deutlich lässt sich die Fluoreszenz im Zellwandraum, in einer schmalen Zone an der Plasmamembran der Pollenschlauchspitze, sowie in Golgi und ER ähnlichen Strukturen nachweisen. In der Spitzenwachstumszone lässt sich eine Schwächung der Fluoreszenz nachweisen. Die Zone, in der das Spitzenwachstum stattfindet, ist meist frei von sichtbaren Zellstrukturen.

Im Gegensatz zum PME1-RP1::YFP lässt sich bei PME1-RP2::YFP ein Phänotyp nachweisen (Abb. 5.26). Die meisten (~80%) der transient transformierten Tabakpollen sind nicht fähig zu keimen, hören auf zu wachsen bzw. sterben während des späteren Pollenschlauchwachstums ab. In Abbildung 5.26,H wachsen die wildtyp Pollen durch das gesamte Gesichtsfeld und darüber hinaus weiter. Die meisten der transient transformierten Pollen zeigen ein stark eingeschränktes Wachstum und sind meist nicht länger als maximal 500µm (wildtyp Pollen ist zu diesem Zeitpunkt meist > 2000µm lang, das entspricht ca. der doppelten Breite des Gesichtsfelds von Abbildung 5.26,H); es gibt jedoch auch Pollenschläuche, die sich nicht vom wildtyp Phänotyp unterscheiden lassen.

Möglicherweise ist hier der Expressionsstärke und damit die biologische Aktivität zu schwach. In der Wachstumszone lässt sich in intakten Pollen kaum Fluoreszenz nachweisen.

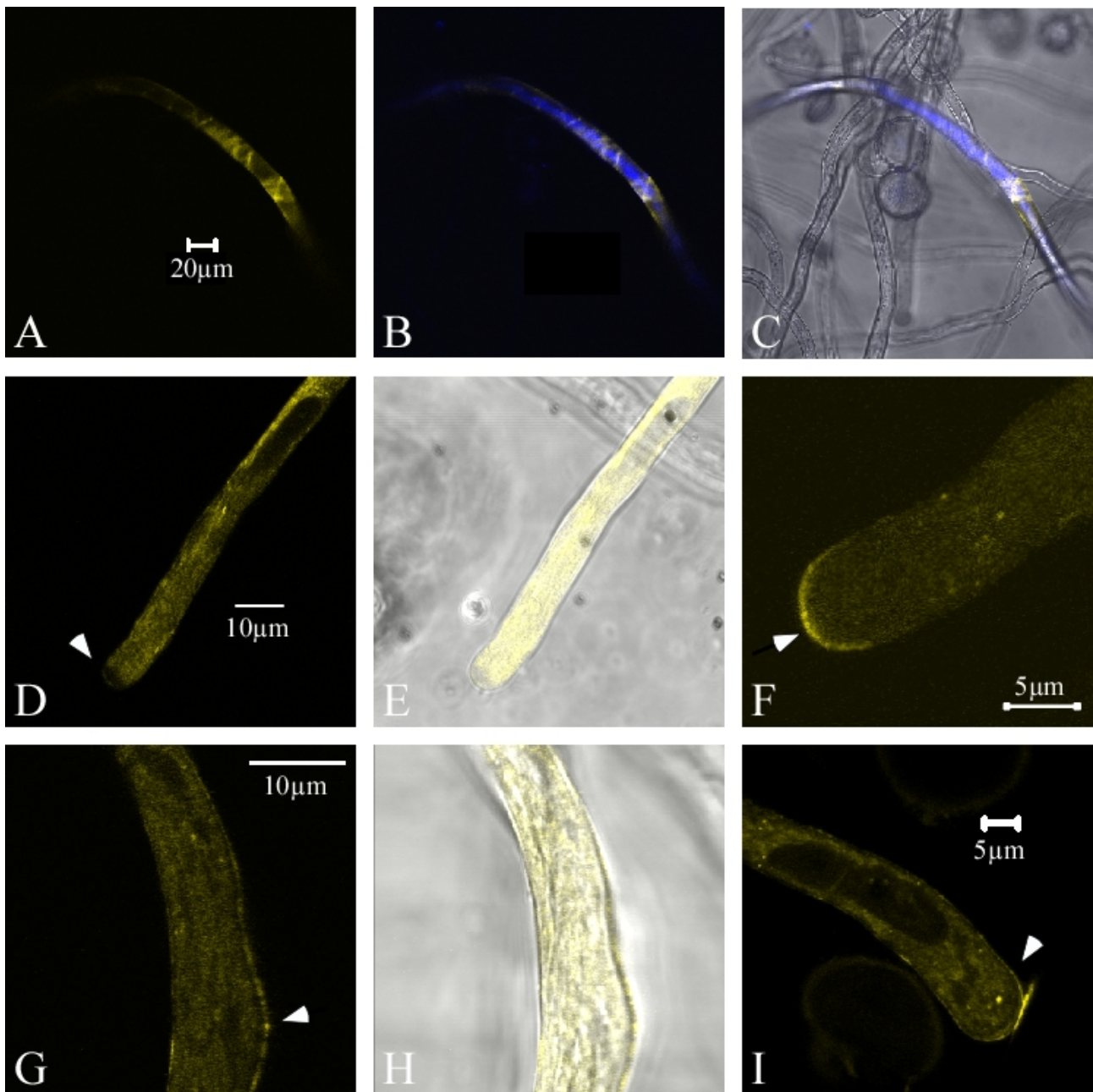


Abbildung 5.24

Fluoreszenz- und Hellfeld-konfokalaufnahmen von pHD32::PMEI-RP1::YFP transient transformierten Tabakpollen

A,B,C: Kotransformation mit einem Vakuolenmarker (CyanFP). Man erkennt sich kreuzende Querbanden in der Zellwand; D,E: schwaches Signal an der Pollenspitze (Pfeil); F: starkes Signal an der Pollenschlauchspitze; G,H: starkes Signal in der Zellwand, ER und Golgi; I: Fluoreszenz im der Pollenschlauchspitze, die Signalintensität nimmt mit Abstand zur Pollenspitze ab, im ER und im Golgi

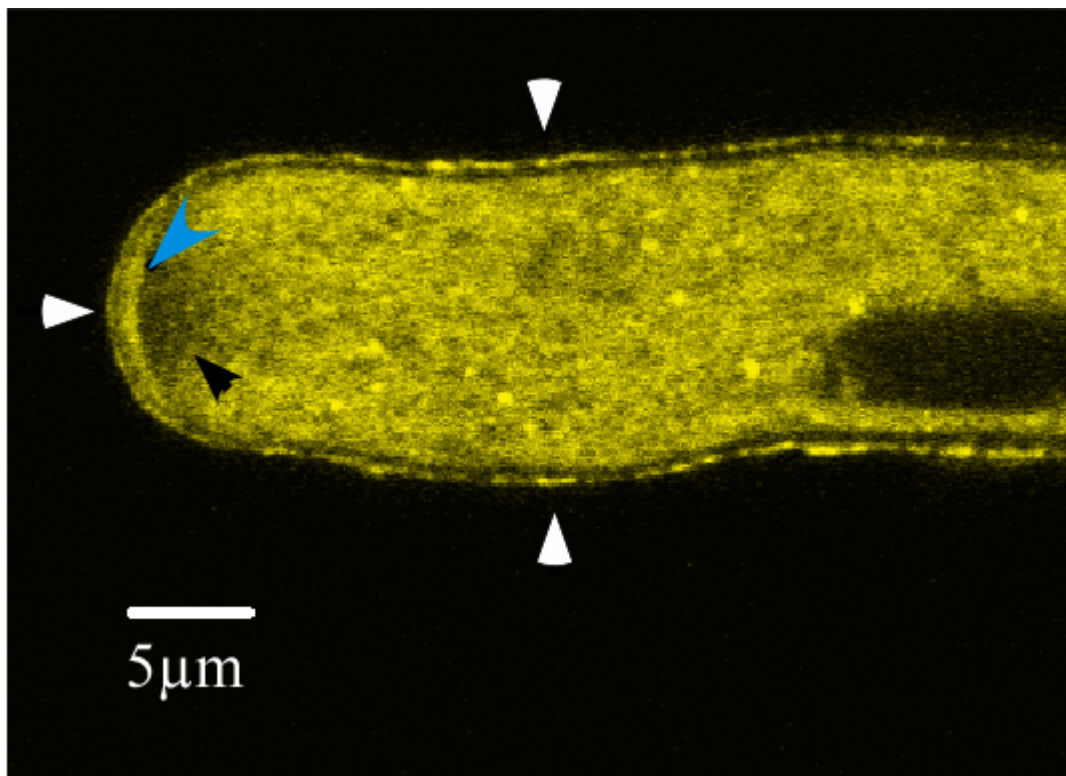


Abbildung 5.25

Fluoreszenz-konfokalaufnahmen von pHD32::PMEI-RP1::YFP transient transformierten Tabakpollen

Weißer Pfeil markieren den Zellwandraum. Der blaue Pfeil markiert die Anlagerung von PME1-RP1::YFP Fusionsproteinen an die Zellmembran der Pollenschlauchspitze. Der schwarze Pfeil zeigt auf die Wachstumszone der Pollenschlauchspitze. Man kann deutlich erkennen, dass in der Wachstumszone fast kein Fusionsprotein nachzuweisen ist.

Die Klonierung von pHD32::PMEI-RP4::YFP konnte wegen unterschiedlicher PCR- und Klonierungsartefakten, sowie der abgelaufenen Promotionszeit, nicht mehr untersucht werden. Aufgrund der hohen AS-Sequenzhomologie (76%) zu PME1-RP3 wird jedoch angenommen, dass die Proteine sehr ähnliche Funktionen besitzen und daher die Ergebnisse von PME1-RP3 auch für PME1-RP4 gelten könnten (Abb. 5.27). In der Abbildung lässt sich das Fusionsprotein im Zellwandraum, im ER und Golgi nachweisen. In der Wachstumszone des Pollenschlauchs, lässt sich im Vergleich zu PME1-RP1 transient transformiertem Tabakpollen, häufig Fluoreszenz nachweisen. Wie bei PME1-RP1 lässt sich auch hier kein Phänotyp nachweisen.

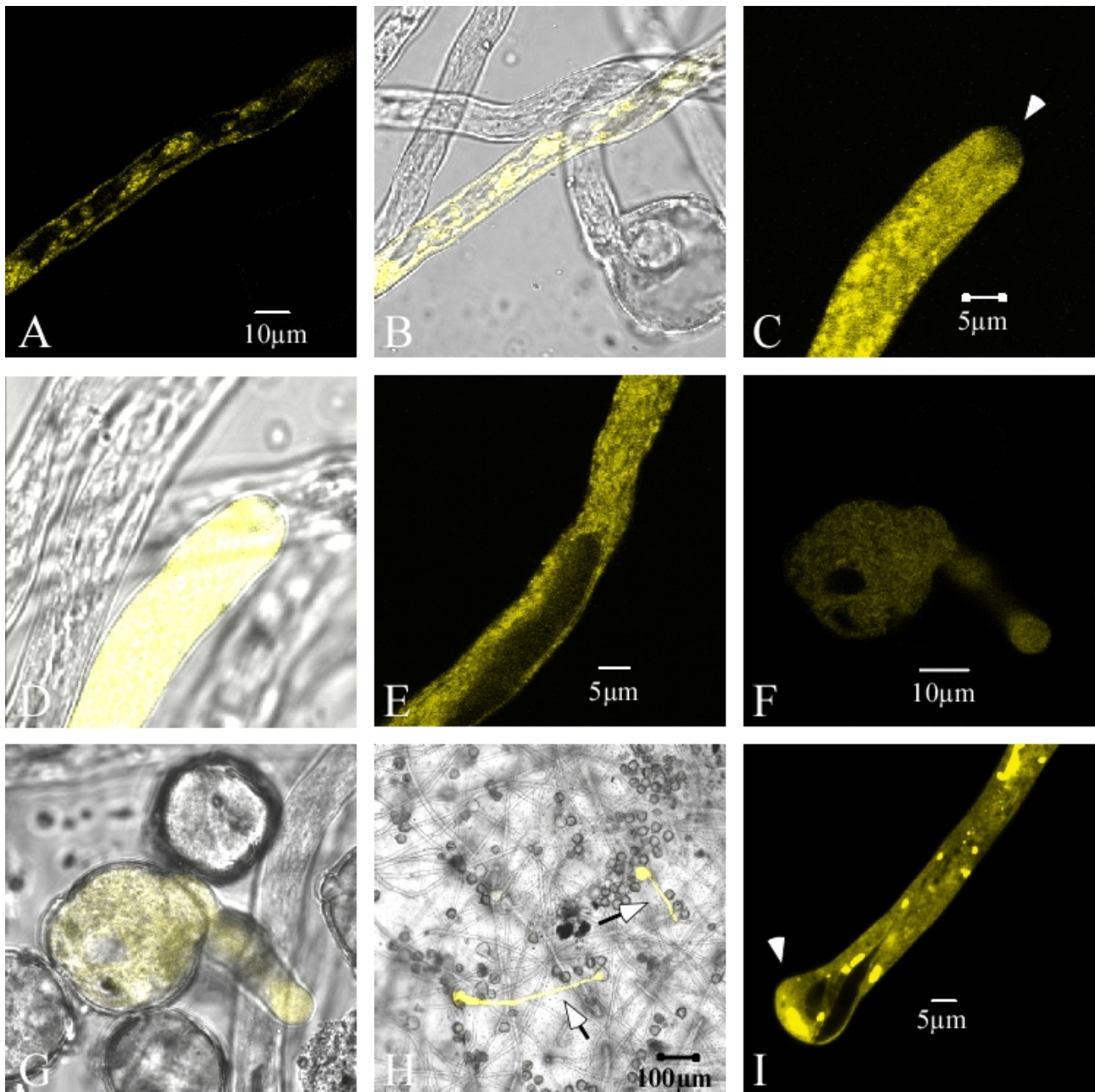


Abbildung 5.26

Fluoreszenz- und Hellfeld-konfokalaufnahmen von pHD32::PMEI-RP2::YFP transient transformierten Tabakpollen

A,B,E: Man kann ein ER und Golgi typisches Signal erkennen, jedoch kein Signal in der Zellwand. C,D: Die ER- und Golgi-färbung würden für den sekretorischen Weg sprechen, jedoch ist das Signal in der Pollenschlauchspitze schwächer (Pfeil). Man würde erwarten, dass bei einem sekretierten Protein auch hier das Signal stark ist. In der Zellwand ist kein Signal nachweisbar. F,G: kurz nach dem Auskeimen arretierter Pollenschlauch. H: Während die wildtyp Pollen eine normale Keimung und ein normales Pollenschlauchwachstum besitzen, sind die meisten der transformierten Tabakpollen in ihrer Keimfähigkeit und ihrem Wachstum stark benachteiligt (Pfeile). I: arretierter Pollenschlauch. Verdickte Pollenschlauchspitze (Pfeil), keine Zellwandfärbung

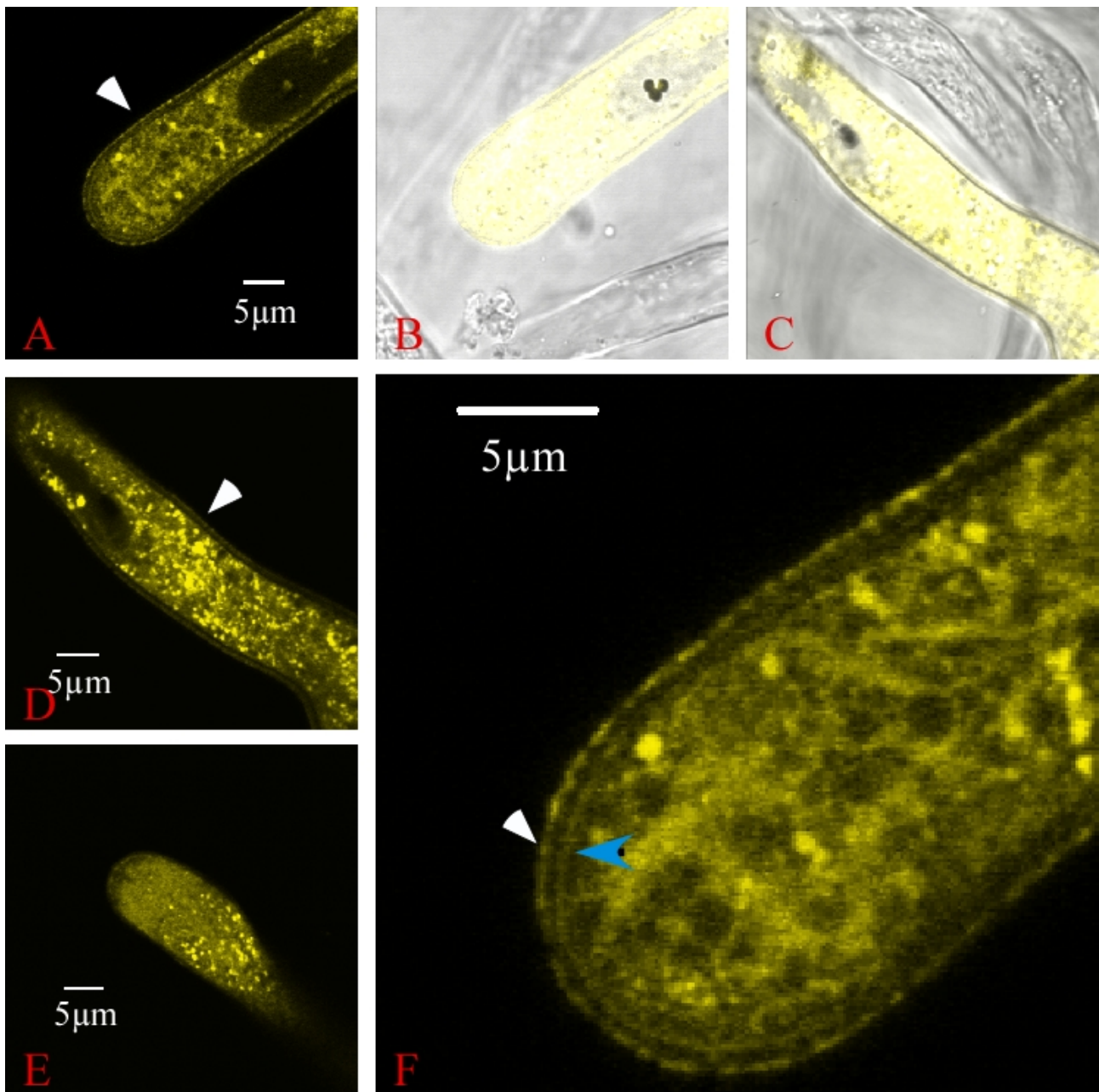


Abbildung 5.27

Fluoreszenz- und Hellfeld-konfokalaufnahmen von pHD32::PMEI-RP3::YFP transient transformierten Tabakpollen

A,B,C,D,E,F: Das gelb fluoreszierende Fusionsprotein kann im ER, Golgi und in der Zellwand nachgewiesen werden. Weiße Pfeile markieren die Zellwand. F: Teilausschnitt von A. Die Zellwand, weißer Pfeil, ist deutlich vom Zellinnenraum (blauer Pfeil) abgetrennt. Der blaue Pfeil markiert eine schmale Zone an der Pollenschlauchspitze, in der das PMEI-RP3::YFP Fusionsprotein vermutlich von Vesikeln vor der Freigabe in den Zellwandraum herantransportiert wird. Im Vergleich zu PMEI-RP1::YFP lässt sich hier die Wachstumszone in der Pollenschlauchspitze kaum wahrnehmen.

5.14.3 Kotransformation von Tabakpollen mit pHD228::PME2::RFP und den PME1-RP Vektoren

Die unter 5.3.1 beschriebene Typ II PME2 wurde mit den drei PME1-RP Isoformen PME1-RP1, PME1-RP2 und PME1-RP3 transient im heterologen Tabakpollensystem zur Koexpression gebracht. Mit diesen Versuchen sollte überprüft werden, ob das putative Zielprotein PME2 mit den PME1-RPs kolokalisiert. In Abbildung 5.28 sind einige transient kotransformierte Tabakpollen dargestellt. Die PME1-RP1::YFP Fluoreszenz lässt sich in ca. 90% der kotransformierten Tabakpollen nur noch sehr schwer im Zellwandraum nachweisen (Abbildung 5.28, DEF). In intakt aussehenden Pollenschläuchen ist keine PME1-RP1::YFP Fluoreszenz in der Zellwand zu lokalisieren. An der Pollenschlauchspitze hingegen lässt sich meist im Zellwandinneren eine schmale Zone mit PME1-RP1::YFP Fluoreszenz nachweisen (siehe auch Abbildung 5.25). Teilweise findet man Pollen, die zwar noch leben, aber kein Längenwachstum mehr aufweisen (Abbildung 5.28, DEF). In diesen lassen sich drei Bereiche unterscheiden: eine Zone in der PME2::RFP und PME1-RP1 Fluoreszenz nachweisbar ist (Abbildung 5.28, DEF blauer bzw. weiße Pfeil(e)); dahinter ein breite Zone in der sich nach außen hin abnehmend PME2::RFP Fluoreszenz nachweisen lässt; der dritte Bereich ist die Kontaktzone zwischen Zellinnenraum und Zellwandraum, die sich durch ein Fehlen an Fluoreszenz auszeichnet. Generell lässt sich festhalten, dass sich in noch wachsenden Pollenschläuchen so gut wie keine PME1-RP1::YFP Fluoreszenz und nur eine schwache PME2::RFP Fluoreszenz im Zellwandraum nachweisen lässt. Im Unterschied dazu lassen sich bei Einzeltransformanten die Fusionsproteine durch die entsprechende Fluoreszenz sehr gut im Zellwandraum nachweisen. In den PME2::RFP und PME1-RP2::YFP Kotransformanten ist die RFP::Fluoreszenz im Zellwandraum, im Vergleich zu einzeln transformierten Tabakpollen, nur noch schwach vorhanden.

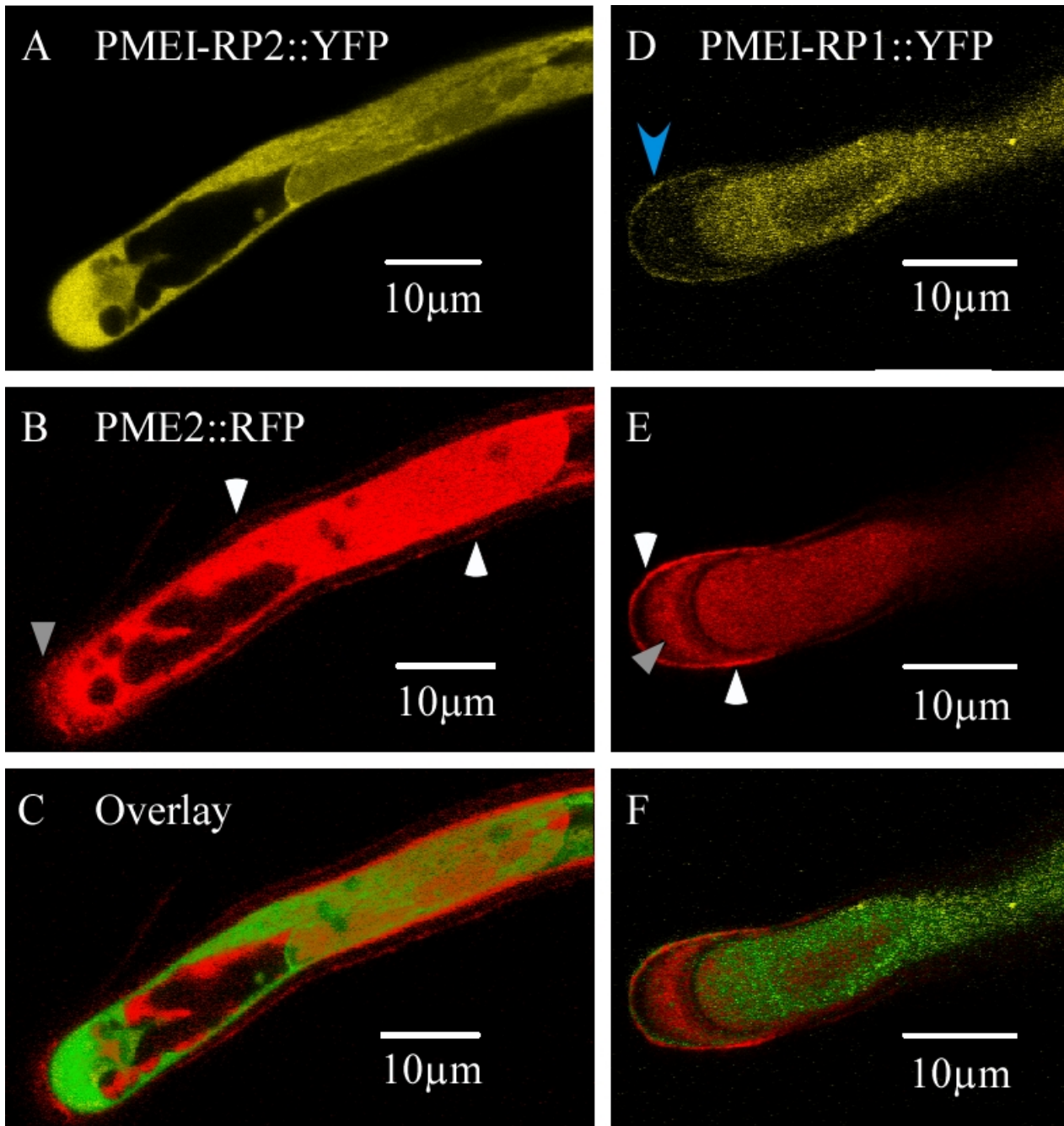


Abbildung 5.28

Fluoreszenz-konfokalaufnahmen von pHD32::PMEI-RP1::YFP und pHD228::PME2::RFP transient kotransformierten Tabakpollen

A: PMEI-RP2::YFP Fluoreszenz lässt sich nicht im Zellwandraum nachweisen. D: Es lässt sich eine leichte Fluoreszenz im Zellwandraum nachweisen. Zwischen der äußersten Zellwandschicht und dem Zellinnenraum hat sich eine breite Zone gebildet. Nur in der äußersten Zone lässt sich PMEI-RP1::YFP Fluoreszenz nachweisen (blauer Pfeil). B: Die PME2::RFP Fluoreszenz lässt sich im Zellwandraum und im Pollenschlauch nachweisen (weiße Pfeile). Die Pollenschlauchspitze erscheint ausgefranst (grauer Pfeil, B). E: Im Vergleich zu B ist das Signal in der Pollenschlauchspitze fokussiert. In der äußersten Zellwandschicht (weiße Pfeile), in der Zone dazwischen (grauer Pfeil) und im Zellinnenraum lässt sich PME2::RFP Fluoreszenz nachweisen. C und F: Überlagerung von A und B bzw. D und E

6 Diskussion

Die Forschungsarbeiten der letzten Jahre zeigen, dass Pektin Methylesterasen und Pektin Methylesterasen Inhibitoren im Pflanzenreich wichtige Funktionen ausüben können. Die Identifizierung und Charakterisierung spezifischer Pektindomänen in Zellwänden führt zu dem Schluss, dass verschiedene PME mit spezifischen Charakteristika für die Ausbildung solcher Domänen benötigt werden (Lenartowska *et al.*, 2001; Stepka *et al.*, 2000; Willats *et al.*, 2001b). Die Regulierung der an diesen Prozessen beteiligten PME durch Ionenzusammensetzung, Pektinzusammensetzung, pH und der kürzlich beschriebenen Inhibitorproteinen ist von großer Bedeutung (Balestrieri *et al.*, 1990; Catoire *et al.*, 1998; Denes *et al.*, 2000; Micheli, 2001; Wolf *et al.*, 2003).

Das Pollenschlauchsystem bietet zur Identifizierung und Charakterisierung von PME und deren Regulation durch Inhibitorproteine ideale Bedingungen. Pollen sind stark polarisierte Zellen mit einem sehr schnellen directionalen Wachstum und ihre Zellwand besteht hauptsächlich aus Pektin. An der Pollenschlauchspitze kommt es zur Sekretion von stark methyliertem Pektin, das mit zunehmender Entfernung von der Pollenschlauchspitze demethyliert vorliegt. Der unterschiedliche Methylierungsgrad der Pektinmatrix ist für die mechanischen Eigenschaften der Pollenschlauchwand von großer Bedeutung. Mit zunehmender Demethylierung und der sich daran anschließenden Quervernetzung durch z.B. Ca^{2+} Ionen wird die Pektinmatrix verfestigt und stabilisiert so den Pollenschlauch (Ferguson *et al.*, 1998; Li *et al.*, 1994; Taylor & Hepler, 1997). Die bisher beschriebenen PMEIs zeigen auf Proteinebene schwache aber signifikante Sequenzähnlichkeiten zur N-terminalen Pro-Domäne der so genannten Typ I PME (Micheli, 2001). Diese schwachen aber signifikanten Sequenzhomologien sind für PMEI-RPs typisch.

Es lässt sich folgendes Szenario ableiten: Pektin Methylesterasen regulieren den Methylierungsgrad des Pektinnetzwerkes. Dabei können unterschiedliche PME Isoformen unter der Regulation einer autoinhibitorischen Domäne stehen, oder Zielproteine eines PMEI sein. Um diesen Sachverhalt weiter aufzuklären wurde versucht, putative PME und PMEIs zu identifizieren und zu charakterisieren, sowie eine Funktion der beteiligten Proteine während des Pollenschlauchwachstums nachzuweisen.

6.1 Identifizierung von Typ I und Typ II PMEs aus Mais

Mittels Datenbankrecherchen (MaizeGDB) und MALDI bzw. ESI TOF MS Untersuchungen wurden verschiedene pollenexprimierte Typ I und Typ II Pektin Methylesterasen identifiziert. Es wurden zwei Typ I und zwei Typ II PMEs, die mit hoher Wahrscheinlichkeit in Maispollen exprimiert werden, in unterschiedliche Expressionvektoren kloniert (5.4). Mit den daraus resultierenden rekombinanten Proteinen sollten biochemische Eigenschaften aufgeklärt und für weitere Untersuchungen Antiseren gewonnen werden. Es konnten mehrere PMEs identifiziert werden, von denen mindestens vier in Maispollen transkribiert werden, zwei Typ I PMEs, PME1 und PME4, und zwei Typ II PMEs, PME2 und PME3. In Abbildung 5.1 ist ein Alignment der vier putativen PMEs ohne Signalpeptid, die Typ I PMEs ohne Pro-Domäne, dargestellt. Die von den Autoren Markovic und Janecek beschriebenen fünf für PMEs charakterischen Regionen sind gelb unterlegt (Markovic & Janecek, 2004). Die zwei identifizierten Typ II PMEs aus Mais besitzen keine typische Region 1 und die PME3 keine typische Region 2. Welche Auswirkungen diese Abweichungen auf die biochemischen Eigenschaften der Proteine haben kann zu diesem Zeitpunkt nicht abgeschätzt werden. Die Funktionen der ersten drei Segmente sind noch nicht aufgeklärt. Das dritte Segment beinhaltet eine Asparaginsäure (Asp136), die am aktiven Zentrum beteiligt sein soll. Es gibt auch PMEs bei denen diese Asparaginsäure durch Asparagin oder Alanin ersetzt ist. Im Fall der Mais PME3 wurde Asp136 durch Histidin ersetzt. Das vierte Segment besitzt eine an der Substratbindung beteiligte aromatische Aminosäure, Phenylalanin Phe160, und eine stark konservierte Asparaginsäure Asp150, die im aktiven Zentrum liegt. Das fünfte Segment liefert zwei weitere am aktiven Zentrum beteiligte stark konservierte Aminosäuren, Arginin Arg225 und Tryptophan Trp224. Die Funktionen der ersten drei Regionen sind bis heute nicht identifiziert.

Aktin als interner Standard diente, durchgeführt. Im Samen lässt sich nur die Typ I PME1 und in der Wurzel die Typ II PME2 nachweisen. Im Vergleich zum Pollen sind die beschriebenen Pektin Methylesterasen Transkriptmengen in den anderen Pflanzengewebe geringer bzw. nicht vorhanden. Die hohen Transkriptmengen in Pollen lassen sich durch das schnelle direktionale Wachstum erklären. Eine der Hauptkomponenten der Pollenschlauchwand ist Pektin und die Spitze des Pollenschlauchscheitels besteht aus nur einer Pektinschicht (Ferguson *et al.*, 1998). Um eine schnelle und gerichtete Zellwandsynthese während des Pollenschlauchwachstums zu ermöglichen, werden an der Pollenschlauchspitze viel Pektin und pektinmodifizierende Enzyme, wie z.B. PMEs, die sich durch unterschiedliche Aktivitäten und Regulationsmechanismen auszeichnen können, benötigt. Da in den ESI und MALDI TOF MS Untersuchungen nur eine PME nachgewiesen werden konnte, liegt es nahe, dass es während der Translation zu einer Regulation der Proteinmenge kommt.

6.3 In Pollenproben kann nur eine PME Aktivitätsbande und nur eine Typ II PME nachgewiesen werden

Neben den durch die Datenbankrecherchen erhaltenen PMEs wurden zur weiteren Identifizierung von PMEs MALDI und ESI TOF MS Untersuchungen von Maispollenproben durchgeführt. Die Maispollenproben wurden mit Hilfe Isoelektrischer Fokussierung aufgetrennt (5.3.1ff). Mittels eines PME Aktivitätstests wurden die Bereiche im Gel markiert, die PME Aktivität aufweisen. Festzuhalten ist, dass nur eine PME Aktivitätsbande in den Pollenproben nachgewiesen werden konnte. Die Proteine banden bei einem pI von ~10. Die Proteine in dieser Bande sind durch den basischen pI vermutlich relativ stark an die Zellwand gebunden. In Maiskeimlingen lässt sich noch eine weitere Aktivitätsbande mit einem pH von ~9 nachweisen. Nach Auswertung der MALDI und ESI TOF MS Daten wurden zwei PME Fragmente identifiziert. Durch Datenbankabgleiche konnten diese zwei Fragmente einer PME zugeordnet werden. Bei der nachgewiesenen PME handelt es sich um die bereits durch Datenbankrecherchen identifizierten Typ II PME2. Die identifizierte PME2 wird im Pollen exprimiert und könnte die gemessene PME Aktivität verursachen. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass weitere Pektin Methylesterasen im Maispollen und in der untersuchten Probe vorliegen, diese aber aufgrund von unterschiedlichen Aktivitäten und Proteinmengen nicht durch ESI und MALDI TOF MS Untersuchungen nachgewiesen werden konnten. Andere PMEs könnten auf Proteinebene kaum vorhanden sein und daher mittels MS Untersuchungen schlecht nachweisbar sein. Ihre Aktivität könnte, trotz einer geringeren

Proteinmenge, über der von stärker exprimierten PME Proteinen liegen. Die Transkriptmengen der PMEs im Pollen erscheinen relativ gleich. Nur die PME2 konnte als Protein nachgewiesen werden. Es scheint sich, unter den gegebenen Versuchsbedingungen, bei der Typ II PME2 um die vorherrschende translatierte Isoform im Maispollen zu handeln.

6.4 Die klonierten PMEs lassen sich weder in den verwendeten bakteriellen Systemen noch im eukaryontischen *Pichia pastoris* System zur Expression bringen

Nach Identifizierung und Klonierung unterschiedlicher PMEs und PME Teilfragmenten in bakterielle und eukaryotische Expressionsvektoren wurden verschiedene Kulturbedingungen für die Expression ausgetestet. Die Vektoren wurden kontrollsequenziert und die Sequenz auf das Vorhandensein von seltenen Basentriplets untersucht. In einer Forschungsarbeiten wird darauf hingewiesen, dass es schwierig sein kann, PMEs in bakteriellen Expressionssystemen zu exprimieren und dass die Expression in eukaryontischen Systemen häufiger zum Erfolg führt (Peng *et al.*, 2005). Die Arbeitsgruppe von Turley, Rickie B. *et al.* (2006, Posterpräsentation) berichten von Schwierigkeiten PMEs aus Baumwollfasern im *Pichia pastoris* System zur Expression zu bringen und dass dies auch für eine von ihnen identifizierte PME1 gilt. Bisher konnte erst eine pflanzliche PME aus Feigen, *Ficus awkeotsang*, mit Hilfe des eukaryotischen *Pichia pastoris* Systems rekombinant und aktiv zur Expression gebracht werden (Peng *et al.*, 2005). Ansonsten wurden noch *Erwinia chrysanthemi* PMEs rekombinant in *Escherichia coli* und *Bacillus subtilis* zur Expression gebracht (Heikinheimo *et al.*, 1991; Shevchik *et al.*, 1996). Die Expression in *Pichia pastoris* hat den Vorteil, dass es zur Glykosylierung des Proteins kommt und dadurch die Stabilität und biochemischen Eigenschaften den nativen glykosylierten Pflanzenproteinen näher kommen als dies mit bakteriellen Systemen möglich ist. Sebastian Wolf beschreibt in seiner Diplomarbeit (2005), dass die Versuche PMEs aus *Arabidopsis thaliana* rekombinant in Bakterien zur Expression zu bringen scheiterten, die Expression in *Pichia* jedoch zu rekombinanten Protein, das enzymatisch inaktiv ist, führt.

Es ist anzunehmen, dass für die erfolgreiche Expression bestimmter PMEs spezifische Glykosylierungen oder zusätzliche Faktoren, die für eine korrekte Modifizierung bzw. Faltung benötigt werden, vorhanden sein müssen. Bisher wurden von zwei PMEs die Struktur aufgeklärt und miteinander verglichen. Die zwei beschriebenen PME Strukturen sind relativ ähnlich aufgebaut (Di Matteo *et al.*, 2005; Hothorn *et al.*, 2004b; Johansson *et al.*, 2002; Markovic *et al.*,

2002).

In Abbildung 6.2 sind die Aminosäuresequenzen von unterschiedlichen Typ I PME, ZmPME1 und ZmPME4 aus Mais, NtPPME1 aus Tabak, VANGUARD1 aus Arabidopsis und LePME aus Tomate gegenübergestellt. Wichtige Sequenzabschnitte sind farblich hervorgehoben. Die vier konservierten Cysteine der Pro-Domäne sind rot, das putative Prozessierungsmotiv R(R/K)L(L/M) blau und Aminosäuren, die im Reaktionszentrum liegen, sind grün unterlegt. Interessanterweise besitzen manche Typ I PME das vier Aminosäuren lange Prozessierungsmotiv mehrmals. Vermutlich soll dadurch die Prozessierung der Pro-Proteine sichergestellt werden. Trotz der Sequenzähnlichkeiten kann nicht ausgeschlossen werden, dass manche PME Besonderheiten in ihrer Struktur aufweisen. Diese könnten in anderen Systemen während der Expression zu Problemen führen. Die fünf PME Regionen sind über den Sequenzen markiert (Markovic & Janecek, 2004).

6. Diskussion

```

ZmPME1      MAKALGGLSAILVVAVVVGVVA--TVTRSGKKAGDNFTVPGEASLATS GKSVKSLAAPTLYKESCEKTL 68
ZmPME4      MANRVTVASVIAAVGIVAVIGTMAAVTSA-----DDNDGNMLSSVKVSTVAFTRYPEKCEQSL 59
NtPPME1     MANKKVVVIGGIASILVVACVVA-----ACVLTKNDETSSSGQVTTSTKSVKAMQOPTPYKQTCCKTL 63
VGD1        MIGKVVVSVASILLIVGVAIGVVA-----YINKGDANLS PQMKAVRGI EATS DKASCVKTL 58
LePME       MANPQQPLLIKTHKQNP IISFKILSFVITL FVALFLVAP-----YQVEIKHSNLKTAQDSQLCLS YV 63
                : * : * . :

ZmPME1      SQATN--GTENPKEVFHSHVAKVALESVQTAVEQSKSIGEAK--ASDSMTESAREDCCKLLEDAADDLRG- 134
ZmPME4      KHVVS--DTSSPEDVFRDALNVALDEVSTAFQSAHIGKD---AQDKLSRNAMDVCKKLDDATEDLRG- 124
NtPPME1     SSAKN--ASE-PKDFIKVAFEATVTDIRNAIMNTDLIMQA---ASDPKTKDALHACEELFDLAIEDLRTS 127
VGD1        EPVK---SDDPNKLIKAFMLATRDITQSSNFTGKTEGNLGSGISPNNAKAVLDYCKKVFMYALEDLST- 124
LePME       SDLISNEIVTTESDGHSILMKFLVNYVHQMNAIPVVRKMKNQINDIRQHGALTDCLLELLDQSVDFASDS 133
                . . . : * : : :

ZmPME1      MLEMAGGDIKVLFSRSDLETWLTGVMTFMDTGVDFGV-DEK--LKADMHSVLRNATELSSNALAITNSL 202
ZmPME4      MARLKPAD---LVRHVKDLRVVWVSGVMTYVYTQADGFE-KPE--LKEAMDKMLQNSTELSSNALAILTRL 189
NtPPME1     VSKLESFDLTKIKDIVDDLKTWLSAVVAYEETGLDAFE-KTDGDTGEKMKVLLNTTREL SINGLAMVNSF 196
VGD1        IVEEMGEDLNQIGSKIDQLKQWLTGVVNYQTDLDDIE-EDD--LRKTI GEG IASSKILTSNAIDIFHTV 192
LePME       IAAIDKRS---RSEHANAQSWLSGLVLTNHVTLDELDSFTKAMINGTNLEELISRKVALAMLASLTQ 199
                : . . : * : : * : . : . : : :

ZmPME1      GGILKMDLGMFS-----KDSRRRLLSSEQDE 227
ZmPME4      GELLPQEA KALNATLPGAGHGRRLLGWQMGEAEVTSGGRGLPAVNDKQLGEIADV ANANRKL L SDHAAL 257
NtPPME1     GEMITQTTG-----LSRKL LTTDE-- 215
VGD1        VSAMAKLNLKVEDFKNMTG-----GIFAPSDKGAAPVNKGT PVPADSPVADPDGPARRLLEDIDET 252
LePME       DEDVFM TVLG----- 209
                :

ZmPME1      KG-----WPVWMSPERKRL LASGNQ-----PKPNAIVAKD GSGQFK 263
ZmPME4      RGRGVLTTLVGT FDEIQYGRSGVPPSDFPKWMPASQRRLQLPGF-----QRPNKVVAQD GSGDFK 319
NtPPME1     -----SSFVEASNKRLQLISN-----AKPNAVVAQD GSGQYK 247
VGD1        G-----IPTWVSGADRKRLTKAGRGSNDGGARIRATFVVKADGSGQFK 243
LePME       -----KMP SVSSMDRKLMESSGKD-----IIANAVVAQDGTGDYQ 245
                . : . : * : : . . : * : * : : :

                Region 1
ZmPME1      SIQQAVDAVPKGHQGRYVIYVKAGLYDEIVMVPKDKVNI FMYGDGPKQSRVTGRKSFAD-GI-TTMKTAT 331
ZmPME4      TITEAITAVPNTFEGRFVIYVKAGTYKEYVTVPKNMANIFMYGDGPTQT VVTGDKSNAG-GF-ATFASAT 387
NtPPME1     TITDALKAVPKNTEPFVILIKAGIYKEYVEVEKGMTNVVFI GEGSTKTKITGNKSVKPGIGSTWHTCT 317
VGD1        TVQQAVNACPEKNPGRCI IHIKAGIYREQV IIPKKNNI FFMFGDGARKTVISYNRSVKLSPGT T TSLSGT 365
LePME       TLAEA VAAAPDKSKTRYVIYVKRGT YKENVEVASNKMNLMIVGDGM YATTITG--SLNVVDGSTTFRSAT 313
                : : * : * * . : * : * * * * * : . * : : * : * : : : * : * : * : * :

                Region 2
ZmPME1      FSVEASGFICKNMGFHNTAGAEERHCAVALRVQGD LAAFYNCRFDAFQDTLYVHARRQFFRNCVVS GTIDF 401
ZmPME4      FSAEGNGFICKSMGFVN TAGPEGHCAVAMHVQGDKSVFYNCRFEGYDTLYVHANRQFFRDCEVLGTVDF 457
NtPPME1     VGVSGEGFVARDIGFENTAGPAQCAVALRVNADKAVIYNCKIDGYDTLYAHSGRQFYRDCIISGTIDF 387
VGD1        VQVESEGFMAKWI GFKN TAGPMGHCAVAIRVNGDRAVIFNCRFDGYDTLYVNNGRQFYRNIVVSGTVDF 435
LePME       LAAVGQGFILQDICIQNTAGPAKCAVALRVGADMSVINRCRIDAYDTLYAH SQRQFYRDSYVTGTVDF 383
                . . . * : : : : * : . * : : * : : : * : : : * : : : * : : : * : : * : * : * :

                Region 3
ZmPME1      IFGNSAAVFQNC LIITRRPMDNQNSVTAHG-RTDPNMKSGLVIQNCRLVPDQKLFPPDRFKI PSYLGRPW 470
ZmPME4      IFGNSAALFQNC LM TVRKPGDSQSNM VTAQG-RTDPNMPTGIVLQGCRI VPEQALFPDRLQIATYLG R PW 526
NtPPME1     VFGDAAAVFQNC KLI VRRPGDQNCMVTAQG-RTTSASKGAFVIQNC EIKAEPEFLAAK PQMKAF LGRPW 456
VGD1        IFGKSATVIQNSLIVVRKGNKGQFNVTADGNEKGLAMKIGIVLQNCRI VPDKLAERLIVESYLG R PW 505
LePME       IFGNAAVVFQKQQLVARKPGKYQNMVTAQG-RTDPNQATGTSIQFCNI IASSDLEPVLKEFPYTLGRPW 452
                : * : * : * : : . : * : * * * * . . . : * : * : . . . : : * : * : * : * :

                Region 4
ZmPME1      KEFSRLVIMESTIAD FVKPEGYPWNG-DFALKTLYYAEYNNRGPAGT SKRVN-WPGFHV-IGRKEAEP 537
ZmPME4      KEYARTVVMESTIGDLIRPEGWA EWNG-DLGLKTL Y YAEYANTGPGAGT SKRVN-WPGYHV-IGQADATA 533
NtPPME1     KEYSRTIIMQSFIDGFIDPSGWAPWNITDFGIHTCWYAEYQNRGAGASLDKRVSHWRGYQRGISGDVANS 466
VGD1        KKFSTTVIINSEIGDVIRPEGWKIWDG-ESFHKSCRVEYNNRGPAGITNRRVN-WVKIAR--SAAEVND 511
LePME       KEYSRTVVMESYLGGLINPAGWA EWNG-DFALKTLYYGEFMNNGPGAGT SKRVK-WPGYHVITDPAKAMP 460
                * : : : : * : : . : * : * : * : : : * : * : * : * : * : * : * : * : * :

ZmPME1      FTAGPFIDG--AMWLKYTGAPHILGFKF- 563
ZmPME4      FTAGAFIDG--ASWLQSTGTPNVMGFTKG 620
NtPPME1     FTAGVFINPTDNSFLPKADIPYEAGMMKV 555
VGD1        FTVANWLG P--INWIQEANVPVTLGL--- 595
LePME       FTVAKLIQG--GSWLRSTGVAYVDGLYD- 546
                ** . . : : : . . * :

```

Abbildung 6.2**„ClustalW“ Vergleich unterschiedlicher Typ I Pektin Methylesterasen**

Die Signalpeptide sind in grün und die vier konservierten Cysteine sind in rot dargestellt. Die putativen Prozessierungsmotive sind blau und im aktiven Zentrum liegende Aminosäuren sind grün unterlegt. * identische AS; : konservierte Substitution; . semi-konservierte Substitution

6.5 Die Typ I PMEs besitzen eine Invertase- und PME-Inhibitoren homologe N-terminale Pro-Domäne

Ein Charakteristika der Typ I PMEs ist das Vorhandensein einer so genannten Pro-Domäne. Dieser Bereich weist starke Homologien mit den bisher beschriebenen Invertase- und Pektin Methylesterase Inhibitoren sowie den PMEI-verwandten Proteinen auf (Hothorn *et al.*, 2004b; Rausch & Greiner, 2004). Die Funktionen dieser Pro-Domänen sind noch nicht vollständig aufgeklärt. Es wurden mehrere biologische Aufgaben postuliert: Chaperon-, Inhibitor- und „Targeting“-Funktionen (Micheli, 2001). Sebastian Wolf konnte in seiner Diplomarbeit (2005) zeigen, dass die Pro-Domäne einer *Arabidopsis thaliana* PME in der Lage ist, PMEs unterschiedlicher Herkunft zu inhibieren. Bosch *et al.* (2005, 2006) konnten ebenfalls zeigen, dass die Pro-Domäne der Tabak NtPPME1 autoinhibitorisch auf die Kerndomäne wirkt. Zusätzlich konnten sie nachweisen, dass die Pro-Domäne der NtPPME1 auch als Adressat für die Lokalisation benötigt wird. Die Pro-Domäne kann also mehrere Funktionen ausüben. Eine Funktion als Chaperon konnte jedoch noch nicht nachgewiesen werden.

In *Arabidopsis thaliana* können 66 PME Gene nachgewiesen werden. Von diesen gehören 43 zu den Typ I PMEs und 23 zu den Typ II PMEs. Bisher wurde postuliert, dass Typ I PMEs im Vergleich zu Typ II PMEs nur zwei bis drei Introns und eine lange Pro-Domäne besitzen und dass die Typ II PMEs fünf bis sechs Introns und nur eine kurze bzw. keine Pro-Domäne aufweisen (Micheli, 2001). Im Zellwandraum lassen sich nur Typ I PMEs ohne Pro-Domäne nachweisen (Bordenave *et al.*, 1996; Bordenave & Goldberg, 1993; Markovic & Jornvall, 1986). Durch Vergleiche der AS-Sequenzen unterschiedlicher Zellwand extrahierter PMEs mit den AS-Sequenzen der offenen Leseraster wurde postuliert, dass die AS-Sequenz R(R/K)L(L/M) als Prozessierungsmotiv dient (Bordenave *et al.*, 1996). Dieses ist dem Prozessierungsmotiv RRKRR, das in manchen tierischen intramolekularen Chaperonen vorkommt, sehr ähnlich (Seidah & Chretien, 1994). Von den 43 Typ I PMEs besitzen 30 ein putatives Prozessierungsmotiv. Von

diesen weisen 8 zwei putative R(R/K)L(L/M) Motive auf. Bei den restlichen 13 Typ I PMEs lassen sich keine putativen Prozessierungsmotive nachweisen. Die Typ I PMEs ohne erkennbares Motiv besitzen desweiteren keine eindeutige PMEI-Domäne. Manche Typ I PMEs besitzen zwei, im Falle von At3g14300 sogar drei aufeinanderfolgende PMEI-Domänen. Von den identifizierten Mais PMEs besitzt die PME4 drei und die PME1 zwei putative Prozessierungsmotive. Warum manche *Arabidopsis* PMEs mehrere PMEI-Domänen und/bzw. Prozessierungsmotive aufweisen ist nicht bekannt. Möglicherweise sollen sie eine Prozessierung der betreffenden Proteine sicherstellen. Das Vorhandensein von mehreren PMEI-Domänen könnte man durch unterschiedliche Funktionen der einzelnen Regionen erklären. Sie könnten für das "Targeting", Komplexbildung während der Sekretion, zuverlässigen Inhibition der PME-Domäne oder als Chaperon in Frage kommen. Desweiteren ist nicht geklärt, welche Funktionen die PMEI-verwandten Domänen der als Typ I PME klassifizierten Proteine, die kein R(R/K)L(L/M) Motiv aufweisen, haben. In Abbildung 6.3 ist ein Alignment der vier Mais PMEI-RPs, den zwei Arabidopsis PMEIs, der Kiwi PMEI und dem Tabak Invertase Inhibitor NtCIF dargestellt. Hothorn *et al.* versuchten anhand von Sequenzcharakteristika der bekannten Inhibitoren Unterschiede in Invertase- und PME-Inhibitoren aufzuzeigen und damit eine Klassifizierung von Kandidatenproteinen zu ermöglichen (Hothorn *et al.*, 2004b). In Abbildung 6.3 sind den AS-Sequenzen Sekundärstrukturen, wie von den Autoren beschrieben, zugeordnet worden. In ihren Untersuchungen kommen sie zu dem Schluß, dass die N-terminale Extension, die α 1-Schleufe, für die Bindung und Interaktion von PMEs kritisch ist. Neuere Untersuchungen von Di Mateo *et al.* weisen jedoch darauf hin, dass bei AtPMEI1 die N-terminale Extension vom Proteinkomplex wegweist und scheinbar keinen Kontakt mit dem Zielenzym besitzt. Durch Proteinchimären zwischen dem NtCIF-Proteinkern und der N-terminalen Extension von AtPMEI1 konnte zusätzlich gezeigt werden, dass im Proteinkern ebenfalls wichtige Binde und Interaktionsmotive liegen müssen bzw. können (Di Matteo *et al.*, 2005).

| | | | | | |
|------------|------------------------------------|--|----------|-------------|--------------------|
| | | | α1 | α2 | |
| AtPMEI1 | MAANLRNNAFLSSLMFLLIGSSYA | ----- | ITSSSE | ST | CDKTLNPSFGLKF 47 |
| AtPMEI2 | MAAYLTNRVLMSSLMFFVMTGSLNA | ----- | QVADIK | ATCGKAKNQSF | CTSY 46 |
| AcPMEI | | ----- | ENHLL | SETCPKTRNPS | LQLQA 21 |
| ZmPMEI-RP1 | MAGARALLIVLAAAVAVLA | ----- | ARPASAGG | AAAVAE | TCOMKTPSPDLCTRT 48 |
| ZmPMEI-RP2 | MAGTRALYLLVAAVAALLATPAAVDA | ----- | ATLAE | ICRGTAFFPDI | CTST 45 |
| ZmPMEI-RP3 | MGQAS-RLVLLAVVALLSAGLLPQALG | -KGRGGRGHGGAVNPQVAG | IC | SRTPFPEV | CTST 58 |
| ZmPMEI-RP4 | MGQAYPRLVLLALVALLSAGLFPQALG | -NGKGKVHGGAVNPVAG | IC | SRAFFPEV | TAT 59 |
| NtCIF | MKNLIFLTMFLTILLQTNA | ----- | NNLVET | TC | KNTPNYQLLKT 39 |
| | | : : | ** : | : . . * | |
| | | (α3) | α4 | α5 | |
| AtPMEI1 | L---NTKFAS | PNLQALAKTTLDSTQARATQTLKKLQSIIDGGVDPRSKLAYRSCVDEYES 104 | | | |
| AtPMEI2 | MK-SN | PKTSGADLQTLANITFGSAQTSASEGFRKIQSLVKTATNPMTMKKAYTSCVQHYKS 105 | | | |
| AcPMEI | LE-SD | PRSASKDLKGLGQFSIDIAQASAKQTSKIIASLTNQATDPKLGKRYETCSENYAD 80 | | | |
| ZmPMEI-RP1 | AGKHANKYKVV | DAVTVLEMQVDFAFKRVKAARRLAKEEVKTAATPEARRALNLCKTYLID 108 | | | |
| ZmPMEI-RP2 | VGSEAQ | SAGVLDAMAVLRMQVDFAFNKRTAARAHVKEAAVTAS-PKARTVLDLNNLYLD 104 | | | |
| ZmPMEI-RP3 | AGRHASKYPVI | DNLAVLNMQVDAFAKRTAQARKHVARSARTIP-PQQTQALTFCDTMYMN 117 | | | |
| ZmPMEI-RP4 | AGRHASKYPVI | DNLAVLNMQVAFAKRTAQARKHVAARTIP-PPQAQALRTCDTMYMN 118 | | | |
| NtCIF | LL-SD | KRSATGDIITLALIMVDAIKAKANQAAVTISKLRHSNPPAAWKGPLKNCAFSYKV 98 | | | |
| | | : : | * : | * * | |
| | | α6 | α7 | | |
| AtPMEI1 | AIGNLEEAFEHLASGDGMGMNMKVSAAALDGADT | GLDDVKRLRSVDSSVVNNSKTIKNI | CG 164 | | |
| AtPMEI2 | AISSLNDAKQSLASGDGKGLNIKVSAAMEGPST | EQDMADFK-VDPSAVKNSGDFQNI | CG 164 | | |
| AcPMEI | AIDSLGQAKQFLTSGDYNSLNIYASAAF | DGAGTCEDSFEGPPNIPTQLHQADLKLE | DCD 140 | | |
| ZmPMEI-RP1 | AADNLGACKRAIGFRDAVTIRATMSMVAQDTQN | CDEEFRKAV-SKNPMEHDHNRSLIEM | SE 167 | | |
| ZmPMEI-RP2 | VEDNLGACRRAIGFKDAVTIRATMGMAAQDMQN | CDEQFRQIG-EKNPMEQFDASLVEM | SE 163 | | |
| ZmPMEI-RP3 | TQDTIGAAQRAITFKDTGTAKIMLQAVQDFDS | CDRPFQTAG-VPNPMGKFDKELNQ | MAN 176 | | |
| ZmPMEI-RP4 | TQDAIGAAQRAIAFKDTGTAKIMLQAVQDFDS | CDRPFTHAG-VPNPMGKFDKELSQ | MAN 177 | | |
| NtCIF | ILTASLPEAIEALTKGDPKFAEDGMVSSGDAQ | CEEFYFKGSK---SPFSALNIAVHLS | 155 | | |
| | | : . . * | : . * | . . . : : . | |
| AtPMEI1 | I | ALVLSNMLPRN--- | 176 | | |
| AtPMEI2 | I | VLVLSNMM----- | 173 | | |
| AcPMEI | I | VLVLSNLLPGS--- | 152 | | |
| ZmPMEI-RP1 | I | CRVLSNMIPYEHVH | 182 | | |
| ZmPMEI-RP2 | N | CRVLSNMI----- | 172 | | |
| ZmPMEI-RP3 | N | CMALANMI----- | 185 | | |
| ZmPMEI-RP4 | N | CMVLANMI----- | 186 | | |
| NtCIF | D | VGRAIVRNLL----- | 166 | | |
| | | : : * | : : : | | |

Abbildung 6.3

Sequenzvergleich unterschiedlicher PMEI-RPs

Dargestellt sind *Arabidopsis thaliana* AtPMEI1 und AtPMEI2, *Actinidia chinensis* AcPMEI, *Nicotiana tabaccum* NtCIF und die vier *Zea mays* PMEI-RPs. Die vier konservierten Cysteine sind rot unterlegt. Der Bereich, der die N-terminale Domäne mit dem Proteinkern verbindet ist grau unterlegt. Weitere an der Bindung zwischen Proteinkern und N-terminaler Extension beteiligte Bereiche sind grün unterlegt (nach Hothorn *et al.*, 2004 und Di Matteo *et al.*, 2005). Signalpeptide sind in grün dargestellt. Über den Sequenzen sind nach Hothorn *et al.* die entsprechenden Untereinheiten dargestellt ($\alpha 1$ bis $\alpha 7$; $\alpha 3$ vermutlich nur bei Invertase Inhibitoren)

6.6 Mit Mais PMEI-RPs lassen sich weder Invertase- noch Pektin Methylesterase-Aktivitäten inhibieren

Die vier putativen Mais PMEIs, PMEI-verwandte Proteine im folgenden genannt, weisen ähnliche Sequenzmotive wie Invertaseinhibitoren auf. Eine Einteilung in Invertase- bzw. PME- Inhibitoren anhand von Sequenzmerkmalen ist somit bis zum heutigen Zeitpunkt nicht möglich (s.o.). Die biologische Funktion muss folglich durch biochemische Charakterisierungen der putativen PME- bzw. Invertase Inhibitoren nachgewiesen werden. Ein besonderes Merkmal von beiden Inhibitorengruppen ist das Vorhandensein von vier Cysteinen, die an der Ausbildung von zwei essentiellen Disulfidbindungen beteiligt sind (Rausch & Greiner, 2004). Die rekombinanten Proteine wurden nach ihrer Aufreinigung auf das Vorhandensein von Disulfidbindungen und ihre inhibitorischen Eigenschaften getestet. Es wurden verschiedene Invertase- und PME-, sowie β 1,3-Glucanase- und Inulase Proben auf eine inhibitorische Wirkung der vier putativen Inhibitoren untersucht. Um einen möglichen Interaktionspartner nachzuweisen wurden Proben aus Pollen, gekeimten Pollen, Narbengewebe und Samenanlagen gewonnen. In keinem der durchgeführten Experimenten ließ sich mit den rekombinanten PMEI-RPs eine Inhibition bzw. Aktivierung der Enzymproben nachweisen. In *Arabidopsis thaliana* konnte Sebastian Wolf (persönliche Mitteilung) ebenfalls PMEI-RPs nachweisen, die anscheinend weder PMEs noch Invertasen zu hemmen scheinen. Möglicherweise fehlen den rekombinant exprimierten Proteinen wichtige Modifikationen, die für ihre Funktion wichtig sind. *In silico* Untersuchungen auf Glykosilierungs- und andere modifizierbaren Stellen zeigen, dass es vermutlich keine Modifizierungen gibt. Mittels einer Lektin Chromatographie wird das Fehlen von Glykosilierungen der nativen PMEI-RPs bestätigt. Mit Hilfe einer Sephadex G100 Fine LC und einer Superdex 200 FPLC Auftrennung konnten Fraktionen mit den nativen PMEI-RPs, sowie den Zielenzymen erhalten werden. In keiner der Durchführungen konnte eine Bindung der PMEI-RPs an andere Proteine beobachtet werden. Auch mit den nativen PMEI-RPs ließ sich die biologische Funktion nicht identifizieren. Festzuhalten ist, dass die verwendeten Enzymproben mehrere PMEs, Invertasen, PMEI-RPs und weitere Proteine enthalten; eine Inhibition könnte aufgrund enzymatisch aktiverer bzw. stärker exprimierter PMEs im Hintergrund untergehen. Gestützt wird dies durch die dosisabhängige Inhibition bzw. Aktivierung von FPLC Proben. In einer einzigen Versuchsdurchführung konnte mit den nativen PMEI-RP Fraktionen eine dosisabhängige Inhibition der PME Aktivität nachgewiesen werden. Das Experiment wurde am gleichen und am folgenden Tag mit den Fraktionen insgesamt dreimal reproduziert. Drei Tage später konnte jedoch unter identischen Versuchsbedingungen eine

dosisabhängige Aktivierung der PME-Aktivität nachgewiesen werden. Da dieses Phänomen nur mit Proben einer einzelnen chromatographischen Auftrennung reproduziert werden konnte, wurde es als Kuriosum akzeptiert.

Durch die semiquantitative RT-PCR sowie die MALDI und ESI TOF MS Untersuchungen wird angenommen, dass im Maispollen die Typ II PME2 eine stark transkribierte und translatierte Pektin Methylesterase Isoform ist. Eine *in vivo*-Inhibition der PME2 durch die vier putativen PMEI-RPs erscheint aufgrund der fehlenden *in vitro* Hemmung als unwahrscheinlich.

6.7 Es konnten keine Interaktions/Bindepartner der vier PMEI-RPs nachgewiesen werden

Die bisher in der Literatur am Zuckerstoffwechsel beteiligten beschriebenen Inhibitoren, bilden unter physiologischen Bedingungen meist einen stabilen 1:1 Komplex, der sich durch unterschiedliche Methoden nachweisen lässt (Di Matteo *et al.*, 2005; Hothorn *et al.*, 2004b; York *et al.*, 2004). Es wurden mehrere Verfahren zum Nachweis von PMEI-RP-Protein-Komplexen herangezogen und versucht einen Interaktionspartner zu identifizieren. Zu den verwendeten Methoden gehören Co-Immunopräzipitation mit Anti-PMEI-RP1 und Anti-PMEI-RP3 Antikörpern, „Far-Western Blot“ (PMEI-RP „Overlay“), Quervernetzungen mit unterschiedlichen „Crosslinkern“, Lektin Chromatographie und verschiedene Gelfiltrationssäulen (s.o.). Durch Gelfiltrationen konnte für Invertasen, Pektin Methylesterasen und Glucanasen gezeigt werden, dass die Inhibitoren zusammen mit den Zielproteinen eluieren. Zusätzlich konnten je nach Protein auch Dimere und Monomere nachgewiesen werden. Um sicherzustellen, dass alle möglichen Interaktionspartner identifiziert werden können, wurden Proben aus Pollensäcken, Pollen, Narbengewebe und den Samenanlagen verwendet. In keinem der durchgeführten Experimenten konnte eine Interaktion mit anderen Proteinen nachgewiesen werden. Möglicherweise werden für die spezifischen Proteininteraktionen bestimmte Voraussetzungen benötigt, die nur *in Vivo* anzutreffen sind. Diese Theorie wird jedoch durch die Quervernetzungen mit „Crosslinkern“ geschwächt. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass durch das Quervernetzen die Antikörperbindungsstellen maskiert wurden und sich deshalb nicht nachweisen lassen. Obwohl vier unterschiedliche PMEI-RPs untersucht wurden, konnte für keinen der vier putativen Inhibitoren ein Bindepartner nachgewiesen werden.

6.8 *PMEI-RP1 und PMEI-RP3 werden in die Zellwand sekretiert und lokalisieren an der Pollenschlauchspitze*

Die Versuche, Mais PMEI-RPs biochemisch zu charakterisieren und ihnen so eine spezifische Funktion zuzuweisen, verliefen ergebnislos. Aus diesem Grund wurden die kodierenden PMEI-RP Sequenzen vollständig mit Signalpeptid in den Vektor pHD32::YFP kloniert. Dieser Vektor besitzt den Promotor pLAT52, der im Vergleich zum CaMV35 Promotor, in Pollen aktiv ist und für die C-terminale Fusion ein gelb fluoreszierendes Reporterprotein. Mit Hilfe der so erhaltenen Vektoren sollten die Kandidatengene und deren Proteinfunktionen im Mais- bzw. Tabakpollen zellbiologisch charakterisiert werden. Die Ergebnisse wurden aufgrund zahlreicher Probleme mit dem Maispollensystem ausschließlich durch das heterologe Tabakpollensystem erhalten. Für die PMEI-RP1 und PMEI-RP3 YFP Fusionsproteine konnte die Sekretion in den Zellwandraum dokumentiert werden. Dies bestätigt die *in Silica* Vorhersage, dass es sich bei den Kandidatenproteinen um zellwandlokalisierte Proteine handelt. Die Lokalisationen von PMEI-RP1 und PMEI-RP3 sind sehr ähnlich. PMEI-RP1 bildet im Vergleich zu PMEI-RP3 weniger $\sim 0,5\mu\text{m}$ große Partikel im Pollenschlauchlumen. PMEI-RP1::YFP lässt sich in der Zellwand des Pollenschlauches und an der Membraninnenseite der Pollenschlauchspitze nachweisen (Abb. 5.22). Teilweise lässt sich auch eine Querbänderung in der Zellwand nachweisen (Abb. 5.21). Ein Phänotyp konnte nicht beobachtet werden. Die Pollen sind in ihrer Morphologie und im Längenwachstum mit wildtyp Pollen vergleichbar. Auch mit den PMEI-RP3::YFP Fusionsprotein lässt sich im Tabakpollen kein Phänotyp nachweisen. Bei transient transformierten Tabakpollen lassen sich jedoch ungefähr $0,5\mu\text{m}$ große Partikel nachweisen. Entweder handelt es sich um unspezifische PMEI-RP3::YFP Aggregate oder aber um Kompartimente in denen das Fusionsprotein mit möglicherweise anderen Proteinen zwischengelagert ist. Für Vesikel (50-100nm) sind diese $\sim 500\text{nm}$ Partikel zu groß. Da PMEI-RP3 und PMEI-RP4 in ihrer AS-Sequenz sehr ähnlich sind (76% Homologie) und PMEI-RP4 aufgrund der abgelaufenen Promotionszeit nicht mehr zellbiologisch untersucht werden konnte, werden die Ergebnisse für PMEI-RP3 auf PMEI-RP4 übertragen.

6.9 PMEI-RP2 lokalisiert im heterologen Tabakpollensystem im sekretorischen Weg, lässt sich aber nicht in der Zellwand bzw. an der Pollenschlauchspitze nachweisen

Im Vergleich zu den transient transformierten PMEI-RP1 und PMEI-RP2 Reporterfusionsproteinen lässt sich bei den PMEI-RP2::YFP Transformanten ein phänotyp beobachten. Transient transformierter Tabakpollen ist in seiner Fähigkeit auszukeimen bzw. zu wachsen stark eingeschränkt. Die meisten der Pollentransformanten sind nicht in der Lage auszukeimen oder hören kurz nach dem Auskeimen auf zu wachsen. Trotz dieses Phänotyps können ~ 20% der transient transformierten Pollen relativ normal auskeimen und wachsen. Möglicherweise hängt dies mit der eingebrachten DNS-Menge in den transformierten Pollen zusammen. Die Lokalisation erscheint auf den ersten Blick wie die der PMEI-RP1 und PMEI-RP3 Reporterfusionsproteine. Jedoch ist bei den PMEI-RP2::YFP Transformanten die Pollenschlauchspitze ausgespart und es lässt sich kein Signal in der Zellwand bzw. an der Membraninnenseite nachweisen. Möglicherweise fehlen im Tabakpollen Interaktionspartner, die eine Sekretion unmöglich machen.

Die bis zum heutigen Zeitpunkt beschriebenen PMEIs, sowie die Pro-Domäne von NtPPME1 und von *Arabidopsis thaliana* inhibieren Pektin Methylesterasen. Wenn man annimmt, dass es sich bei den untersuchten PMEI-RPs wirklich um PME Inhibitoren handelt, würde man erwarten, dass die Zellwand und die Pollenschlauchspitze durch die Überexpression der Kandidatenproteine aufgeweicht werden und eine breitere Form aufweisen bzw. platzen. PMEs wären möglicherweise nicht in der Lage die Pollenzellwand zu festigen und es käme durch den Turgor zum Platzen der Spitze. Die PMEI-RP2 Transformanten weisen Ähnlichkeiten mit den NtPPME1 minus Pro-Domäne Transformanten auf. Eine Möglichkeit dies zu erklären ist: PMEI-RP2 könnte in der Lage sein bestimmte Typ II PMEs zu aktivieren oder bestimmte PMEIs bzw. Pro-Domänen von Typ I PMEs zu binden. Durch die Bindung an vorhandene PMEIs bzw. Pro-Domänen könnten diese inaktiviert werden und so zu einer Steigerung der PME Aktivität führen. Würde das bereits im Golgi und den sekretorischen Vesikeln passieren, käme es zum Arretieren des Pollens. Für PGIPs, Polygalacturonase-inhibierende Proteine konnte 2004 erstmals von Kemp et al. gezeigt werden, dass je nach pH Wert und möglicherweise noch weiteren Faktoren PGIPs aktivierend wirken können. Vorangegangene Studien hatten bis zum damaligen Zeitpunkt gezeigt, dass PGIPs entweder inhibierend oder aber keinen Effekt auf Endo-Polygalacturonasen von Pilzen haben. Ähnlich zu den Erfahrungen, die in unserem Labor (AG Rausch) mit PMEI-RPs aus Mais und *Arabidopsis* gemacht wurden. Mit dieser Betrachtung ließe sich auch das oben erwähnte Kuriosum

der dosisabhängigen Aktivierung bzw. Inhibition von Gelfiltrationsfraktionen erklären.

6.10 Das Typ II PME Fusionsprotein PME2::RFP lässt sich in der Zellwand und im Pollenschlauch als diffuses Signal nachweisen

Die proteinkodierende Sequenz der Typ II PME2 wurde für zellbiologische Untersuchungen in den Vektor pHD223::RFP kloniert. Dieser Vektor besitzt wie der pHD32::YFP Vektor den pLAT52 Promotor und für die C-terminale Fusion ein rot fluoreszierendes Reporterprotein. Das Fusionsprotein lässt sich im Pollenschlauch, die Vakuole ist ausgespart, und in der Zellwand nachweisen. Ein Phänotyp lässt sich, im Vergleich zur Publizierten NtPPME1 ohne Pro-Domäne und VANGUARD1 PME, nicht nachweisen. Entweder ist das Fusionsprotein inaktiv, oder es wird durch Tabak PME1-RPs inaktiviert. Erwärmt würde man einen Phänotyp wie ihn die VANGUARD1::GFP oder die „NtPPME1 ohne Pro-Domäne“ Transformanten aufweisen. Möglicherweise werden aber auch Modifikationen benötigt, die nur im Maissystem vorhanden sind.

6.11 Ausblicke

Neben den vier beschriebenen PME1-RPs konnten noch drei weitere Mais PME1-RPs identifiziert werden (AX214333, AX214336, AX214357). Für AX214333 konnte Bate *et al.* (2004) zeigen, dass es sich um einen Invertase Inhibitor, ZM-INVINH1, handelt. Dieser kann während der frühen Samenentwicklung in Bereichen um den Embryo nachgewiesen werden. Als Zielproteine wurden mehrere Invertasen genannt. ZM-INVINH1 ist der erste in Monokotyledonen beschriebene Invertaseinhibitor. Ausser diesen sieben PME1-RP Sequenzen konnten in Mais keine weiteren Kandidaten identifiziert werden.

Erst in den letzten Jahren konnten unterschiedliche Aspekte des Pollenschlauchwachstums und der Führung aufgeklärt werden. In den letzten zwei Jahren erschienen mehrere Publikationen, in denen die Bedeutung von PMEs während dieses Prozesses untersucht wurden (Bosch *et al.*, 2005; Bosch & Hepler, 2005; Jiang *et al.*, 2005). Die herabgesetzte Expression von VANGUARD1 PME in Arabidopsis und der NtPPME1 in Tabak führt zu einem verkümmerten bzw. gestörten Pollenschlauchwachstum bei dem der Durchmesser etwas breiter wird oder aber die Spitze platzt. Durch das Fehlen dieser PMEs könnten die Zellwände länger brauchen um sich zu verfestigen. Während sich die Zellwand verfestigt würde der Turgor den Pollenschlauch ausdehnen. Die gesamte PME-Aktivität ist während dieser Prozesse ähnlich. Vermutlich besitzen die unterschiedlichen PMEs spezifische Reaktionsbedingungen, die nur in bestimmten Bereichen der

Pollenschlauchzellwand vorliegen. Dieser Sachverhalt würde auch die Schwierigkeiten beim charakterisieren dieser Proteingruppen erklären. Solange es nicht möglich ist einzelne Zielproteine bzw. Inhibitoren zu erhalten, sind Enzymassays nicht optimal durchzuführen. Andere Isoformen bzw. andere Proteine könnten die spezifischen Interaktionen stören, unterbinden oder zu falschen Interaktionen führen. Auch die unterschiedlichen Verteilungen von Pektinen in der Pollenschlauchzellwand legen nahe, dass neue Pektinkomponenten und modifizierende Enzyme in zyklischen Rhythmen in die Pollenschlauchspitze sekretiert werden (Lenartowska *et al.*, 2001; Stepka *et al.*, 2000). Eine Bänderung konnte auch für PME1-RP1::YFP nachgewiesen werden. Desweiteren ist AtPME11 in der Lage, PME-Proben aus Maiskeimlingen, nicht aber aus Maispollen zu inhibieren. Der PME Inhibitor aus Kiwi ist im Vergleich dazu in der Lage Proben aus Maispollen und Maiskeimlingen zu inhibieren.

Die genauen Vorgänge aller an diesem Prozess beteiligten Proteine während der Pollenentwicklung zu verstehen, könnte helfen, daraus abgeleitete biotechnologische Anwendungen für die Agrarwirtschaft zu entwickeln. So ließen sich Maispflanzen erzeugen, bei denen der Pollen nur auf den gewünschten gentechnisch manipulierten Pflanzen auskeimen bzw. wachsen und Samen bilden kann. Auf diese Weise könnte eine Verunreinigung anderer wt Maissorten mit gentechnisch veränderten Arten verhindert und eine Koexistenz beider Anbauformen verbessert werden.

7 Literaturverzeichnis

- Aarts, M. G., Keijzer, C. J., Stiekema, W. J. & Pereira, A. (1995).** Molecular characterization of the CER1 gene of Arabidopsis involved in epicuticular wax biosynthesis and pollen fertility. *Plant Cell*, 7, pp. 2115-2127.
- Albani, D., Altosaar, I., Arnison, P. G. & Fabijanski, S.F. (1991).** A gene showing sequence similarity to pectin esterase is specifically expressed in developing pollen of Brassica napus. Sequences in its 5' flanking region are conserved in other pollen-specific promoters. *Plant Mol Biol*, 16, pp. 501-513.
- Altamura MM, Zaghi D, Salvi G, Lorenzo GD, Bellincampi D (1998).** Oligogalacturonides stimulate pericycle cell wall thickening and cell divisions leading to stoma formation in tobacco leaf explants. *Planta*, 204, pp. 429-436.
- Arazi, T., Kaplan, B. & Fromm, H. (2000).** A high-affinity calmodulin-binding site in a tobacco plasma-membrane channel protein coincides with a characteristic element of cyclic nucleotide-binding domains. *Plant Mol Biol*, 42, pp. 591-601.
- Assmann, S. (1995).** Cyclic AMP as a Second Messenger in Higher Plants (Status and Future Prospects). *Plant Physiol*, 108, pp. 885-889.
- Baldwin EA, B. R. (1988).** Cell-wall lysing enzymes and products of cell-wall digestion limit ethylene in citrus. *Plant Physiol*, 73, pp. 58-64.
- Balestrieri, C., Castaldo, D., Giovane, A., Quagliuolo, L. & Servillo, L. (1990).** A glycoprotein inhibitor of pectin methylesterase in kiwi fruit (*Actinidia chinensis*). *Eur J Biochem*, 193, pp. 183-187.
- Barnabas B., F. L. (1984).** Adhesion and germination of differently treated maize pollen grains on the stigma. *Acta Bot Hung*, 30, pp. 329-332.
- Baron-Epel O, Gharyal PK, Schindler M (1988).** Pectins as mediators of wall porosity in soybean cells. *Planta*, 175, pp. 389-395.
- Bate, N. J., Niu, X., Wang, Y., Reimann, K. S. & Helentjaris, T.G. (2004).** An invertase inhibitor from maize localizes to the embryo surrounding region during early kernel development. *Plant Physiol*, 134, pp. 246-254.
- Batley, N., James, N., Greenland, A. & Brownlee, C. (1999).** Exocytosis and endocytosis. *Plant Cell*, 11, pp. 643-660.
- Becker, J. D., Boavida, L. C., Carneiro, J., Haury, M. & Feijo, J.A. (2003).** Transcriptional profiling of Arabidopsis tissues reveals the unique characteristics of the pollen transcriptome. *Plant Physiol*, 133, pp. 713-725.
- Bedinger, P. (1992).** The remarkable biology of pollen. *Plant Cell*, 4, pp. 879-887.

- Bedinger, P. A., Hardeman, K. J. & Loukides, C.A. (1994).** Travelling in style: the cell biology of pollen. *Trends Cell Biol*, 4, pp. 132-138.
- Bellincampi, D., Cardarelli, M., Zaghi, D., Serino, G., Salvi, G., Gatz, C., Cervone, F., Altamura, M., Costantino, P. & Lorenzo, G. (1996).** Oligogalacturonides Prevent Rhizogenesis in rolB-Transformed Tobacco Explants by Inhibiting Auxin-Induced Expression of the rolB Gene. *Plant Cell*, 8, pp. 477-487.
- Biermann, B., Johnson, E. M. & Feldman, L.J. (1990).** Characterization and distribution of a maize cDNA encoding a peptide similar to the catalytic region of second messenger dependent protein kinases. *Plant Physiol*, 94, pp. 1609-1615.
- Birnboim, H. C. & Doly, J. (1979).** A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res*, 7, pp. 1513-1523.
- Blackbourn, H. & Battey, N. (1993).** Annexin-mediated secretory vesicle aggregation in plants. *Plant Physiol*, 89, pp. 27-32.
- Bolwell, G. (1999).** Role of active oxygen species and NO in plant defence responses. *Curr Opin Plant Biol*, 2, pp. 287-294.
- Bolwell, P. P., Page, A., Pislewska, M. & Wojtaszek, P. (2001).** Pathogenic infection and the oxidative defences in plant apoplast. *Protoplasma*, 217, pp. 20-32.
- Bordenave, M. & Goldberg, R. (1993).** Purification and characterization of pectin methylesterases from mung bean hypocotyl cell walls.. *Phytochemistry*, 33, pp. 999-1003.
- Bordenave, M. & Goldberg, R. (1994).** Immobilized and Free Apoplastic Pectinmethylesterases in Mung Bean Hypocotyl. *Plant Physiol*, 106, pp. 1151-1156.
- Bordenave, M., Breton, C., Goldberg, R., Huet, J. C., Perez, S. & Pernollet, J.C. (1996).** Pectinmethylesterase isoforms from *Vigna radiata* hypocotyl cell walls: kinetic properties and molecular cloning of a cDNA encoding the most alkaline isoform. *Plant Mol Biol*, 31, pp. 1039-1049.
- Bosch, M. & Hepler, P. (2005).** Silencing of the tobacco pollen pectin methylesterase NtPPME1 results in retarded in vivo pollen tube growth. *Planta*, , pp. 1-10.
- Bosch, M. & Hepler, P.K. (2006).** Silencing of the tobacco pollen pectin methylesterase NtPPME1 results in retarded in vivo pollen tube growth. *Planta*, 223, pp. 736-745.
- Bosch, M., Cheung, A. Y. & Hepler, P.K. (2005).** Pectin methylesterase, a regulator of pollen tube growth. *Plant Physiol*, 138, pp. 1334-1346.
- Bouton, S., Leboeuf, E., Mouille, G., Leydecker, M., Talbotec, J., Granier, F., Lahaye, M., Hofte, H. & Truong, H. (2002).** QUASIMODO1 encodes a putative membrane-bound glycosyltransferase required for normal pectin synthesis and cell adhesion in Arabidopsis. *Plant Cell*, 14, pp. 2577-2590.

- Bradford, M. M. (1976).** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72, pp. 248-254.
- Branca C, DeLorenzo G, Cervone F (1988).** Competitive inhibition of the auxin-induced elongation by alpha-D-oligogalacturonides in pea stem segments. *Plant Physiol*, 72, pp. 499-504.
- Brecht JK, H. D. (1988).** Products released from enzymically active cell wall stimulate ethylene production and ripening in preclimacteric tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) fruit. *Plant Physiol*, 88, pp. 499-504.
- Brian, W. & Newcomb, E. (1954).** Stimulation of pectin methylesterase activity of cultured tobacco pith by indole acetic acid. *Physiol Plant*, 7, pp. 290-297.
- Burbulis, I. E., Iacobucci, M. & Shirley, B.W. (1996).** A null mutation in the first enzyme of flavonoid biosynthesis does not affect male fertility in Arabidopsis. *Plant Cell*, 8, pp. 1013-1025.
- Burton, R. A., Gibeaut, D. M., Bacic, A., Findlay, K., Roberts, K., Hamilton, A., Baulcombe, D. C. & Fincher, G.B. (2000).** Virus-induced silencing of a plant cellulose synthase gene. *Plant Cell*, 12, pp. 691-706.
- Camacho, L. & Malho, R. (2003).** Endo/exocytosis in the pollen tube apex is differentially regulated by Ca²⁺ and GTPases. *J Exp Bot*, 54, pp. 83-92.
- Camardella, L., Carratore, V., Ciardiello, M. A., Servillo, L., Balestrieri, C. & Giovane, A. (2000).** Kiwi protein inhibitor of pectin methylesterase amino-acid sequence and structural importance of two disulfide bridges. *Eur J Biochem*, 267, pp. 4561-4565.
- Carpita, N. C. & Gibeaut, D.M. (1993).** Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *Plant J*, 3, pp. 1-30.
- Catoire, L., Pierron, M., Morvan, C., du Penhoat, C. H. & Goldberg, R. (1998).** Investigation of the action patterns of pectinmethylesterase isoforms through kinetic analyses and NMR spectroscopy. Implications In cell wall expansion. *J Biol Chem*, 273, pp. 33150-33156.
- Chen, F., Ma, L., Parrini, M. C., Mao, X., Lopez, M., Wu, C., Marks, P. W., Davidson, L., Kwiatkowski, D. J., Kirchhausen, T., Orkin, S. H., Rosen, F. S., Mayer, B. J., Kirschner, M. W. & Alt, F.W. (2000).** Cdc42 is required for PIP(2)-induced actin polymerization and early development but not for cell viability. *Curr Biol*, 10, pp. 758-765.
- Cosgrove, D. J. (2000).** Expansive growth of plant cell walls. *Plant Physiol Biochem*, 38, pp. 109-124.
- Cote, F. & Hahn, M.G. (1994).** Oligosaccharins: structures and signal transduction. *Plant Mol Biol*, 26, pp. 1379-1411.
- Cote, F., Ham, K. S., Hahn, M. G. & Bergmann, C.W. (1998).** Oligosaccharide elicitors in host-pathogen interactions. Generation, perception, and signal transduction. *Subcell Biochem*, 29, pp.

385-432.

D'Avino, R., Camardella, L., Christensen, T. M. I. E., Giovane, A. & Servillo, L. (2003). Tomato pectin methylesterase: modeling, fluorescence, and inhibitor interaction studies-comparison with the bacterial (*Erwinia chrysanthemi*) enzyme. *Proteins*, 53, pp. 830-839.

Denes, J. M., Baron, A., Renard, C. M., Pean, C. & Drilleau, J.F. (2000). Different action patterns for apple pectin methylesterase at pH 7.0 and 4.5. *Carbohydr Res*, 327, pp. 385-393.

Di Matteo, A., Giovane, A., Raiola, A., Camardella, L., Bonivento, D., De Lorenzo, G., Cervone, F., Bellincampi, D. & Tsernoglou, D. (2005). Structural basis for the interaction between pectin methylesterase and a specific inhibitor protein. *Plant Cell*, 17, pp. 849-858.

Downie, B., Dirk, L. M., Hadfield, K. A., Wilkins, T. A., Bennett, A. B. & Bradford, K.J. (1998). A gel diffusion assay for quantification of pectin methylesterase activity. *Anal Biochem*, 264, pp. 149-157.

Elleman, C., Franklin-Tong, V. & Dickinson, H. (1992). Pollination in species with dry stigmas: the nature of early stigmatic response and the pathway taken by pollen tubes. *New Phytol.*, 121, pp. 413-424.

Feijo, J. A., Sainhas, J., Hackett, G. R., Kunkel, J. G. & Hepler, P.K. (1999). Growing pollen tubes possess a constitutive alkaline band in the clear zone and a growth-dependent acidic tip. *J Cell Biol*, 144, pp. 483-496.

Ferguson C, Teeri TT, Siika-aho M, Read SM, Bacic A (1998). Location of cellulose and callose in pollen tubes and grains of *Nicotiana tabacum*. *Planta*, 206, pp. 452-460.

Fleischer, A., O'Neill, M. & Ehwald, R. (1999). The Pore Size of Non-Graminaceous Plant Cell Walls Is Rapidly Decreased by Borate Ester Cross-Linking of the Pectic Polysaccharide Rhamnogalacturonan II. *Plant Physiol*, 121, pp. 829-838.

Franklin-Tong, V., Drobak, B., Allan, A., Watkins, P. & Trewavas, A. (1996). Growth of Pollen Tubes of *Papaver rhoeas* Is Regulated by a Slow-Moving Calcium Wave Propagated by Inositol 1,4,5-Trisphosphate. *Plant Cell*, 8, pp. 1305-1321.

Franklin-Tong, V., Ride, J., Read, N., Trewavas, A. & Franklin, F. (1993). The self-incompatibility response in *Papaver rhoeas* is mediated by cytosolic free calcium. *Plant Journal*, 4, pp. 163-177.

Fu, Y., Wu, G. & Yang, Z. (2001). Rop GTPase-dependent dynamics of tip-localized F-actin controls tip growth in pollen tubes. *J Cell Biol*, 152, pp. 1019-1032.

Gai, X., Lal, S., Xing, L., Brendel, V. & Walbot, V. (2000). Gene discovery using the maize genome database ZmDB. *Nucleic Acids Res*, 28, pp. 94-96.

- Geitmann A, Hudák J, Vennigerholz F, Walles B. (1995).** Immunogold localization of pectin and callose in pollen grains and pollen tubes of *Brugmansia suaveolens* - implications for the self-incompatibility reaction. *Journal of Plant Physiology*, 147, pp. 225-234.
- Gibbon, B. C., Zonia, L. E., Kovar, D. R., Hussey, P. J. & Staiger, C.J. (1998).** Pollen profilin function depends on interaction with proline-rich motifs. *Plant Cell*, 10, pp. 981-993.
- Gilroy, S. (1996).** Signal Transduction in Barley Aleurone Protoplasts Is Calcium Dependent and Independent. *Plant Cell*, 8, pp. 2193-2209.
- Giovane, A., Servillo, L., Balestrieri, C., Raiola, A., D'Avino, R., Tamburrini, M., Ciardiello, M. A. & Camardella, L. (2004).** Pectin methylesterase inhibitor. *Biochim Biophys Acta*, 1696, pp. 245-252.
- Goldberg, R., Pierron, M., Bordenave, M., Breton, C., Morvan, C. & du Penhoat, C.H. (2001).** Control of Mung bean pectinmethylesterase isoform activities. Influence of pH and carboxyl group distribution along the pectic chains. *J Biol Chem*, 276, pp. 8841-8847.
- Gough, A. H. & Taylor, D.L. (1993).** Fluorescence anisotropy imaging microscopy maps calmodulin binding during cellular contraction and locomotion. *J Cell Biol*, 121, pp. 1095-1107.
- Greiner, S., Krausgrill, S. & Rausch, T. (1998).** Cloning of a tobacco apoplasmic invertase inhibitor. Proof of function of the recombinant protein and expression analysis during plant development. *Plant Physiol*, 116, pp. 733-742.
- Gu, X. & Bar-Peled, M. (2004).** The biosynthesis of UDP-galacturonic acid in plants. Functional cloning and characterization of Arabidopsis UDP-D-glucuronic acid 4-epimerase. *Plant Physiol*, 136, pp. 4256-4264.
- Hahn, M., Darvill, A. & Albersheim, P. (1981).** Host-Pathogen Interactions : XIX. THE ENDOGENOUS ELICITOR, A FRAGMENT OF A PLANT CELL WALL POLYSACCHARIDE THAT ELICITS PHYTOALEXIN ACCUMULATION IN SOYBEANS. *Plant Physiol*, 68, pp. 1161-1169.
- Harriman, R., Tieman, D. & Handa, A. (1991).** Molecular Cloning of Tomato Pectin Methylesterase Gene and its Expression in Rutgers, Ripening Inhibitor, Nonripening, and Never Ripe Tomato Fruits. *Plant Physiol*, 97, pp. 80-87.
- Heikinheimo, R., Hemila, H., Pakkanen, R. & Palva, I. (1991).** Production of pectin methylesterase from *Erwinia chrysanthemi* B374 in *Bacillus subtilis*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 35, pp. 51-55.
- Hepler, P. K., Vidali, L. & Cheung, A.Y. (2001).** Polarized cell growth in higher plants. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 17, pp. 159-187.
- Hoeflich, K. P. & Ikura, M. (2002).** Calmodulin in action: diversity in target recognition and activation mechanisms. *Cell*, 108, pp. 739-742.

- Holdaway-Clarke, T., Feijo, J., Hackett, G., Kunkel, J. & Hepler, P. (1997).** Pollen Tube Growth and the Intracellular Cytosolic Calcium Gradient Oscillate in Phase while Extracellular Calcium Influx Is Delayed. *Plant Cell*, 9, pp. 1999-2010.
- Honys, D. & Twell, D. (2003).** Comparative analysis of the Arabidopsis pollen transcriptome. *Plant Physiol*, 132, pp. 640-652.
- Hothorn, M., D'Angelo, I., Marquez, J. A., Greiner, S. & Scheffzek, K. (2004a).** The invertase inhibitor Nt-CIF from tobacco: a highly thermostable four-helix bundle with an unusual N-terminal extension. *J Mol Biol*, 335, pp. 987-995.
- Hothorn, M., Wolf, S., Aloy, P., Greiner, S. & Scheffzek, K. (2004b).** Structural insights into the target specificity of plant invertase and pectin methylesterase inhibitory proteins. *Plant Cell*, 16, pp. 3437-3447.
- Hou, W. C. & Lin, Y.H. (1998).** Activity staining of pectinesterase on polyacrylamide gels after acidic or sodium dodecyl sulfate electrophoresis. *Electrophoresis*, 19, pp. 692-694.
- Hulskamp, M., Kopczak, S. D., Horejsi, T. F., Kihl, B. K. & Pruitt, R.E. (1995).** Identification of genes required for pollen-stigma recognition in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, 8, pp. 703-714.
- Jarvis, M. (1984).** Structure and properties of pectin gels in plant cell walls. *Plant Cell Envir*, 7, pp. 153-164.
- Jarvis, M. (1992).** Control of thickness of collenchyma cell walls by pectins. *Planta*, 187, pp. 218-220.
- Jarvis, M., GOLDBERG, R., MORVAN C. & JAUNEAU, A. (1996).** Methyl-esterification, de-esterification and gelation of pectins in the primary cell wall. *J. Visser & A.F.G. Voragen (eds) Pectins and Pectinases, Elsevier, Amsterdam*, , pp. 151-172.
- Jauh G. Y. & Lord E. M. (1996).** Localization of pectins, arabinogalactan proteins in lily (*Lilium longiflorum* L.) pollen tube, style, their possible roles in pollination. *Planta*, 199, pp. 251-261.
- Jenkins, J. & Pickersgill, R. (2001).** The architecture of parallel beta-helices and related folds. *Prog Biophys Mol Biol*, 77, pp. 111-175.
- Jenkins, J., Mayans, O., Smith, D., Worboys, K. & Pickersgill, R.W. (2001).** Three-dimensional structure of *Erwinia chrysanthemi* pectin methylesterase reveals a novel esterase active site. *J Mol Biol*, 305, pp. 951-960.
- Jiang, L., Yang, S., Xie, L., Puah, C. S., Zhang, X., Yang, W., Sundaresan, V. & Ye, D. (2005).** VANGUARD1 encodes a pectin methylesterase that enhances pollen tube growth in the Arabidopsis style and transmitting tract. *Plant Cell*, 17, pp. 584-596.
- Johansson, K., El-Ahmad, M., Friemann, R., Jornvall, H., Markovic, O. & Eklund, H. (2002).** Crystal structure of plant pectin methylesterase. *FEBS Lett*, 514, pp. 243-249.

- Katagiri, F., Lam, E. & Chua, N.H. (1989).** Two tobacco DNA-binding proteins with homology to the nuclear factor CREB. *Nature*, 340, pp. 727-730.
- Knox, J. (1990).** Emerging patterns of organization at the plant cell surface. *J Cell Sci*, 96, pp. 557-561.
- Kost, B., Lemichez, E., Spielhofer, P., Hong, Y., Tolias, K., Carpenter, C. & Chua, N.H. (1999).** Rac homologues and compartmentalized phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate act in a common pathway to regulate polar pollen tube growth. *J Cell Biol*, 145, pp. 317-330.
- Kovar, D. R., Drobak, B. K. & Staiger, C.J. (2000).** Maize profilin isoforms are functionally distinct. *Plant Cell*, 12, pp. 583-598.
- Kovar, D.R. and Staiger, C.J. (2000).** Actin depolymerizing factor. In *Actin: A Dynamic Framework for Multiple Plant Cell Functions*, , pp. 67-86.
- Laemmli, U. K. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, pp. 680-685.
- Leboeuf, E., Guillon, F., Thoiron, S. & Lahaye, M. (2005).** Biochemical and immunohistochemical analysis of pectic polysaccharides in the cell walls of Arabidopsis mutant QUASIMODO 1 suspension-cultured cells: implications for cell adhesion. *J Exp Bot*, 56, pp. 3171-3182.
- Lee, J. & Lee, D. (2003).** Use of serial analysis of gene expression technology to reveal changes in gene expression in Arabidopsis pollen undergoing cold stress. *Plant Physiol*, 132, pp. 517-529.
- Lenartowska, M., Rodriguez-Garcia, M. I. & Bednarska, E. (2001).** Immunocytochemical localization of esterified and unesterified pectins in unpollinated and pollinated styles of *Petunia hybrida* Hort. *Planta*, 213, pp. 182-191.
- Leng, Q., Mercier, R. W., Yao, W. & Berkowitz, G.A. (1999).** Cloning and first functional characterization of a plant cyclic nucleotide-gated cation channel. *Plant Physiol*, 121, pp. 753-761.
- Li YQ, Chen F, Linskens JF, Cresti M (1994).** Distribution of unesterified and esterified pectins in cell walls of pollen tubes of flowering plants. *Sex Plant Reprod*, 7, pp. 145-152.
- Li, H., Lin, Y., Heath, R. M., Zhu, M. X. & Yang, Z. (1999).** Control of pollen tube tip growth by a Rop GTPase-dependent pathway that leads to tip-localized calcium influx. *Plant Cell*, 11, pp. 1731-1742.
- Li, Y. Q., Moscatelli, A., Cai, G. & Cresti, M. (1997).** Functional interactions among cytoskeleton, membranes, and cell wall in the pollen tube of flowering plants. *Int Rev Cytol*, 176, pp. 133-199.

- Limberg, G., Korner, R., Buchholt, H. C., Christensen, T. M., Roepstorff, P. & Mikkelsen, J.D. (2000).** Quantification of the amount of galacturonic acid residues in blocksequences in pectin homogalacturonan by enzymatic fingerprinting with exo- and endo-polygalacturonase II from *Aspergillus niger*. *Carbohydr Res*, 327, pp. 321-332.
- Lin, Y., Wang, Y., Zhu, J. & Yang, Z. (1996).** Localization of a Rho GTPase Implies a Role in Tip Growth and Movement of the Generative Cell in Pollen Tubes. *Plant Cell*, 8, pp. 293-303.
- Liners F, Gaspar T, Van Cutsem P. (1994).** Acetyl- and methyl-esterification of pectins of friable and compact sugar-beet calli: consequences for intercellular adhesion. *Planta*, 192, pp. 545-556.
- Liners, F., and Van Cutsem, P. (1992).** Distribution of pectic polysaccharides throughout wall of suspension-cultured carrot cells. *Protoplasma*, 170, pp. 10-21.
- Lord, E. (2000).** Adhesion and cell movement during pollination: cherchez la femme. *Trends Plant Sci*, 5, pp. 368-373.
- Love, J., Brownlee, C. & Trewavas, A. (1997).** Ca²⁺ and Calmodulin Dynamics during Photopolarization in *Fucus serratus* Zygotes. *Plant Physiol*, 115, pp. 249-261.
- Lynch, M. A. & Staehelin, L.A. (1992).** Domain-specific and cell type-specific localization of two types of cell wall matrix polysaccharides in the clover root tip. *J Cell Biol*, 118, pp. 467-479.
- Manfield, I. W., Orfila, C., McCartney, L., Harholt, J., Bernal, A. J., Scheller, H. V., Gilmartin, P. M., Mikkelsen, J. D., Paul Knox, J. & Willats, W.G.T. (2004).** Novel cell wall architecture of isoxaben-habituated *Arabidopsis* suspension-cultured cells: global transcript profiling and cellular analysis. *Plant J*, 40, pp. 260-275.
- Markovic, O. & Janecek, S. (2004).** Pectin methylesterases: sequence-structural features and phylogenetic relationships. *Carbohydr Res*, 339, pp. 2281-2295.
- Markovic, O. & Jornvall, H. (1986).** Pectinesterase. The primary structure of the tomato enzyme. *Eur J Biochem*, 158, pp. 455-462.
- Markovic, O., Cederlund, E., Griffiths, W. J., Lipka, T. & Jornvall, H. (2002).** Characterization of carrot pectin methylesterase. *Cell Mol Life Sci*, 59, pp. 513-518.
- Martin, T. F. (1998).** Phosphoinositide lipids as signaling molecules: common themes for signal transduction, cytoskeletal regulation, and membrane trafficking. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 14, pp. 231-264.
- Mascarenhas, J. (1993).** Molecular Mechanisms of Pollen Tube Growth and Differentiation. *Plant Cell*, 5, pp. 1303-1314.
- Matar, D. & Catesson, A. (1988).** Cell plate development and delayed formation of the pectic middle lamella in root meristems. *Protoplasma*, 146, pp. 10-17.
- McCormick, S. (1993).** Male Gametophyte Development. *Plant Cell*, 5, pp. 1265-1275.

- McMillan, G. & Perombelon, M. (1995).** Purification and characterization of a high pI pectin methyl esterase isoenzyme and its inhibitor from tubers of *Solanum tuberosum* subsp. *tuberosum* cv. Katahdin. *Physiol Mol Plant Pathol*, 46, pp. 413-427.
- Melotto E, Greve LC, Labavitch JM (1994).** Cell Wall Metabolism in Ripening Fruit (VII. Biologically Active Pectin Oligomers in Ripening Tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) Fruits). *Plant Physiol*, 106, pp. 575-581.
- Messerli, M. & Robinson, K.R. (1997).** Tip localized Ca²⁺ pulses are coincident with peak pulsatile growth rates in pollen tubes of *Lilium longiflorum*. *J Cell Sci*, 110 (Pt 11), pp. 1269-1278.
- Messerli, M. A. & Robinson, K.R. (2003).** Ionic and osmotic disruptions of the lily pollen tube oscillator: testing proposed models. *Planta*, 217, pp. 147-157.
- Messerli, M. A., Creton, R., Jaffe, L. F. & Robinson, K.R. (2000).** Periodic increases in elongation rate precede increases in cytosolic Ca²⁺ during pollen tube growth. *Dev Biol*, 222, pp. 84-98.
- Messerli, M. A., Danuser, G. & Robinson, K.R. (1999).** Pulsatile influxes of H⁺, K⁺ and Ca²⁺ lag growth pulses of *Lilium longiflorum* pollen tubes. *J Cell Sci*, 112 (Pt 10), pp. 1497-1509.
- Messerli, M. A., Smith, P. J. S., Lewis, R. C. & Robinson, K.R. (2004).** Chloride fluxes in lily pollen tubes: a critical reevaluation. *Plant J*, 40, pp. 799-812.
- Micheli, F. (2001).** Pectin methylesterases: cell wall enzymes with important roles in plant physiology. *Trends Plant Sci*, 6, pp. 414-419.
- Micheli, F., Sundberg, B., Goldberg, R. & Richard, L. (2000).** Radial distribution pattern of pectin methylesterases across the cambial region of hybrid aspen at activity and dormancy. *Plant Physiol*, 124, pp. 191-199.
- Mohnen, D. (1999).** Biosynthesis of pectins and galactomannans. In: Pinto BM (ed) *Comprehensive Natural Products Chemistry*; Elsevier, Oxford, , pp. 497-527.
- Moreau, V. & Way, M. (1998).** Cdc42 is required for membrane dependent actin polymerization *in vitro*. *FEBS Lett*, 427, pp. 353-356.
- Moustacas, A. M., Nari, J., Borel, M., Noat, G. & Ricard, J. (1991).** Pectin methylesterase, metal ions and plant cell-wall extension. The role of metal ions in plant cell-wall extension. *Biochem J*, 279 (Pt 2), pp. 351-354.
- Moutinho, A., Hussey, P. J., Trewavas, A. J. & Malho, R. (2001).** cAMP acts as a second messenger in pollen tube growth and reorientation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, pp. 10481-10486.
- Mu, J. H., Stains, J. P. & Kao, T. (1994).** Characterization of a pollen-expressed gene encoding a putative pectin esterase of *Petunia inflata*. *Plant Mol Biol*, 25, pp. 539-544.

Nature2000 (2000). Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature*, 408, pp. 796-815.

O'Neill, M. A., Eberhard, S., Albersheim, P. & Darvill, A.G. (2001). Requirement of borate cross-linking of cell wall rhamnogalacturonan II for *Arabidopsis* growth. *Science*, 294, pp. 846-849.

Orfila, C., Huisman, M. M. H., Willats, W. G. T., van Alebeek, G. W. M., Schols, H. A., Seymour, G. B. & Knox, J.P. (2002). Altered cell wall disassembly during ripening of Cnr tomato fruit: implications for cell adhesion and fruit softening. *Planta*, 215, pp. 440-447.

Overvoorde, P. J., Okushima, Y., Alonso, J. M., Chan, A., Chang, C., Ecker, J. R., Hughes, B., Liu, A., Onodera, C., Quach, H., Smith, A., Yu, G. & Theologis, A. (2005). Functional genomic analysis of the AUXIN/INDOLE-3-ACETIC ACID gene family members in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*, 17, pp. 3282-3300.

Palanivelu, R. & Preuss, D. (2000). Pollen tube targeting and axon guidance: parallels in tip growth mechanisms. *Trends Cell Biol*, 10, pp. 517-524.

Parre, E. & Geitmann, A. (2005a). Pectin and the role of the physical properties of the cell wall in pollen tube growth of *Solanum chacoense*. *Planta*, 220, pp. 582-592.

Parre, E. & Geitmann, A. (2005b). More than a leak sealant. The mechanical properties of callose in pollen tubes. *Plant Physiol*, 137, pp. 274-286.

Peng, C., Hsiao, E. S. L., Ding, J. L. C. & Tzen, J.T.C. (2005). Functional expression in *Pichia pastoris* of an acidic pectin methyl esterase from jelly fig (*Ficus awkeotsang*). *J Agric Food Chem*, 53, pp. 5612-5616.

Pilling, J., Willmitzer, L., Bucking, H. & Fisahn, J. (2004). Inhibition of a ubiquitously expressed pectin methyl esterase in *Solanum tuberosum* L. affects plant growth, leaf growth polarity, and ion partitioning. *Planta*, 219, pp. 32-40.

Pina, C., Pinto, F., Feijo, J. A. & Becker, J.D. (2005). Gene family analysis of the *Arabidopsis* pollen transcriptome reveals biological implications for cell growth, division control, and gene expression regulation. *Plant Physiol*, 138, pp. 744-756.

Pressey, R. (1967). Invertase Inhibitor from Potatoes: Purification, Characterization, and Reactivity with Plant Invertases. *Plant Physiol*, 42, pp. 1780-1786.

Preuss, D., Lemieux, B., Yen, G. & Davis, R.W. (1993). A conditional sterile mutation eliminates surface components from *Arabidopsis* pollen and disrupts cell signaling during fertilization. *Genes Dev*, 7, pp. 974-985.

Raiola, A., Camardella, L., Giovane, A., Mattei, B., De Lorenzo, G., Cervone, F. & Bellincampi, D. (2004). Two *Arabidopsis thaliana* genes encode functional pectin methyl esterase inhibitors. *FEBS Lett*, 557, pp. 199-203.

- Rato, C., Monteiro, D., Hepler, P. K. & Malho, R. (2004).** Calmodulin activity and cAMP signalling modulate growth and apical secretion in pollen tubes. *Plant J*, 38, pp. 887-897.
- Rausch, T. & Greiner, S. (2004).** Plant protein inhibitors of invertases. *Biochim Biophys Acta*, 1696, pp. 253-261.
- Ren, C. & Kermodé, A.R. (2000).** An increase in pectin methyl esterase activity accompanies dormancy breakage and germination of yellow cedar seeds. *Plant Physiol*, 124, pp. 231-242.
- Rhee, S. Y. & Somerville, C.R. (1998).** Tetrad pollen formation in quartet mutants of *Arabidopsis thaliana* is associated with persistence of pectic polysaccharides of the pollen mother cell wall. *Plant J*, 15, pp. 79-88.
- Rhee, S.Y., Osborne, E., Poindexter, P.D., and Somerville, C.R. (2003).** Microspore separation in the quartet 3 mutants of *Arabidopsis* is impaired by a defect in a developmentally regulated oligogalacturonase required for pollen mother cell wall degradation. *Plant Physiol*, 133, pp. 1170-1180.
- Richard, L., Qin, L. X. & Goldberg, R. (1996).** Clustered genes within the genome of *Arabidopsis thaliana* encoding pectin methylesterase-like enzymes. *Gene*, 170, pp. 207-211.
- Ridley, B. L., O'Neill, M. A. & Mohnen, D. (2001).** Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. *Phytochemistry*, 57, pp. 929-967.
- Roberts, K. & McCann, M.C. (2000).** Xylogenes: the birth of a corpse. *Curr Opin Plant Biol*, 3, pp. 517-522.
- Rojo, E., Leon, J. & Sanchez-Serrano, J. (1999).** Cross-talk between wound signalling pathways determines local versus systemic gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, 20, pp. 135-142.
- Salanoubat, M., Lemcke, K., Rieger, M., Ansorge, W., Unseld, M., Fartmann, B., Valle, G., Blocker, H., Perez-Alonso, M., Obermaier, B., Delsený, M., Boutry, M., Grivell, L. A., Mache, R., Puigdomenech, P., De Simone, V., Choisine, N., Artiguenave, F., Robert, C., Brottier, P., Wincker, P., Cattolico, L., Weissenbach, J., Saurin, W., Quétier, F., Schafer, M., Müller-Auer, S., Gabel, C., Fuchs, M., Benes, V., Wurmbach, E., Drzonek, H., Erfle, H., Jordan, N., Bangert, S., Wiedelmann, R., Kranz, H., Voss, H., Holland, R., Brandt, P., Nyakatura, G., Vezzi, A., D'Angelo, M., Pallavicini, A., Toppo, S., Simionati, B., Conrad, A., Hornischer, K., Kauer, G., Lohnert, T. H., Nordsiek, G., Reichelt, J., Scharfe, M., Schon, O., Barges, M., Terol, J., Climent, J., Navarro, P., Collado, C., Perez-Perez, A., Ottenwalder, B., Duchemin, D., Cooke, R., Laudie, M., Berger-Llauro, C., Purnelle, B., Masuy, D., de Haan, M., Maarse, A. C., Alcaraz, J. P., Cottet, A., Casacuberta, E., Monfort, A., Argiriou, A., Flores, M., Liguori, R., Vitale, D., Mannhaupt, G., Haase, D., Schoof, H., Rudd, S., Zaccaria, P., Mewes, H. W., Mayer, K. F., Kaul, S., Town, C. D., Koo, H. L., Tallon, L. J., Jenkins, J., Rooney, T., Rizzo, M., Walts, A., Utterback, T., Fujii, C. Y., Shea, T. P., Creasy, T. H., Haas, B., Maiti, R., Wu, D., Peterson, J., Van Aken, S., Pai, G., Militscher, J., Sellers, P., Gill, J. E., Feldblyum, T. V., Preuss, D., Lin, X., Nierman, W. C., Salzberg, S. L., White, O., Venter, J. C., Fraser, C. M., Kaneko, T., Nakamura, Y., Sato, S., Kato, T., Asamizu, E., Sasamoto, S., Kimura, T., Idesawa, K., Kawashima, K., Kishida, Y., Kiyokawa, C., Kohara, M., Matsumoto, M.,**

- Matsuno, A., Muraki, A., Nakayama, S., Nakazaki, N., Shinpo, S., Takeuchi, C., Wada, T., Watanabe, A., Yamada, M., Yasuda, M. & Tabata, S. (2000).** Sequence and analysis of chromosome 3 of the plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature*, 408, pp. 820-822.
- Schaefer, B. C. (1995).** Revolutions in rapid amplification of cDNA ends: new strategies for polymerase chain reaction cloning of full-length cDNA ends. *Anal Biochem*, 227, pp. 255-273.
- Schuurink, R., Chan, P. & Jones, R. (1996).** Modulation of Calmodulin mRNA and Protein Levels in Barley Aleurone. *Plant Physiol*, 111, pp. 371-380.
- Seidah, N. G. & Chretien, M. (1994).** Pro-protein convertases of subtilisin/kexin family. *Methods Enzymol*, 244, pp. 175-188.
- Shang, Z., Ma, L., Zhang, H., He, R., Wang, X., Cui, S. & Sun, D. (2005).** Ca²⁺ influx into lily pollen grains through a hyperpolarization-activated Ca²⁺-permeable channel which can be regulated by extracellular CaM. *Plant Cell Physiol*, 46, pp. 598-608.
- Shea, E.M., Gibeaut, D.M., and Carpita, N.C. (1989).** Structural analysis of the cell walls regenerated by carrot protoplasts. *Planta*, 179, pp. 293-308.
- Shevchik, V. E., Condemine, G., Hugouvieux-Cotte-Pattat, N. & Robert-Baudouy, J. (1996).** Characterization of pectin methylesterase B, an outer membrane lipoprotein of *Erwinia chrysanthemi* 3937. *Mol Microbiol*, 19, pp. 455-466.
- Simpson, S. D., Ashford, D. A., Harvey, D. J. & Bowles, D.J. (1998).** Short chain oligogalacturonides induce ethylene production and expression of the gene encoding aminocyclopropane 1-carboxylic acid oxidase in tomato plants. *Glycobiology*, 8, pp. 579-583.
- Smertenko, A. P., Jiang, C. J., Simmons, N. J., Weeds, A. G., Davies, D. R. & Hussey, P.J. (1998).** Ser6 in the maize actin-depolymerizing factor, ZmADF3, is phosphorylated by a calcium-stimulated protein kinase and is essential for the control of functional activity. *Plant J*, 14, pp. 187-193.
- Snowman, B. N., Kovar, D. R., Shevchenko, G., Franklin-Tong, V. E. & Staiger, C.J. (2002).** Signal-mediated depolymerization of actin in pollen during the self-incompatibility response. *Plant Cell*, 14, pp. 2613-2626.
- Staelin, L. & Moore, I. (1995).** The plant golgi apparatus: structure, functional organization and trafficking mechanisms. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 46, pp. 261-288.
- Stepka, M., Ciampolini, F., Charzynska, M. & Cresti, M. (2000).** Localization of pectins in the pollen tube wall of *Ornithogalum virens* L. Does the pattern of pectin distribution depend on the growth rate of the pollen tube?. *Planta*, 210, pp. 630-635.
- Sterling, J. D., Quigley, H. F., Orellana, A. & Mohnen, D. (2001).** The catalytic site of the pectin biosynthetic enzyme alpha-1,4-galacturonosyltransferase is located in the lumen of the Golgi. *Plant Physiol*, 127, pp. 360-371.

- Symons, M. & Settleman, J. (2000).** Rho family GTPases: more than simple switches. *Trends Cell Biol*, 10, pp. 415-419.
- Taylor, L. & Hepler, P. (1997).** POLLEN GERMINATION AND TUBE GROWTH. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 48, pp. 461-491.
- Trewavas, A. J., Rodrigues, C., Rato, C. & Malho, R. (2002).** Cyclic nucleotides: the current dilemma!. *Curr Opin Plant Biol*, 5, pp. 425-429.
- Vian, B. and Roland, J.C (1991).** Affinodetection of the sites of formation and further distribution of polygalacturonans and native cellulose in growing plant cells. *Biol. Cell*, 71, pp. 43-55.
- Vidali, L. & Hepler, P.K. (2001).** Actin and pollen tube growth. *Protoplasma*, 215, pp. 64-76.
- Vincken, J., Schols, H. A., Oomen, R. J. F. J., McCann, M. C., Ulvskov, P., Voragen, A. G. J. & Visser, R.G.F. (2003).** If homogalacturonan were a side chain of rhamnogalacturonan I. Implications for cell wall architecture. *Plant Physiol*, 132, pp. 1781-1789.
- Vogt, T. & Taylor, L.P. (1995).** Flavonol 3-O-glycosyltransferases associated with petunia pollen produce gametophyte-specific flavonol diglycosides. *Plant Physiol*, 108, pp. 903-911.
- Wakabayashi, K., Hoson, T. & Huber, D.J. (2003).** Methyl de-esterification as a major factor regulating the extent of pectin depolymerization during fruit ripening: a comparison of the action of avocado (*Persea americana*) and tomato (*Lycopersicon esculentum*) polygalacturonases. *J Plant Physiol*, 160, pp. 667-673.
- Wakeley, P. R., Rogers, H. J., Rozycka, M., Greenland, A. J. & Hussey, P.J. (1998).** A maize pectin methylesterase-like gene, ZmC5, specifically expressed in pollen. *Plant Mol Biol*, 37, pp. 187-192.
- Wen, F., Zhu, Y. & Hawes, M.C. (1999).** Effect of pectin methylesterase gene expression on pea root development. *Plant Cell*, 11, pp. 1129-1140.
- Willats, W. G., McCartney, L., Mackie, W. & Knox, J.P. (2001a).** Pectin: cell biology and prospects for functional analysis. *Plant Mol Biol*, 47, pp. 9-27.
- Willats, W. G., Orfila, C., Limberg, G., Buchholt, H. C., van Alebeek, G. J., Voragen, A. G., Marcus, S. E., Christensen, T. M., Mikkelsen, J. D., Murray, B. S. & Knox, J.P. (2001b).** Modulation of the degree and pattern of methyl-esterification of pectic homogalacturonan in plant cell walls. Implications for pectin methyl esterase action, matrix properties, and cell adhesion. *J Biol Chem*, 276, pp. 19404-19413.
- Wolf, S., Grsic-Rausch, S., Rausch, T. & Greiner, S. (2003).** Identification of pollen-expressed pectin methylesterase inhibitors in Arabidopsis. *FEBS Lett*, 555, pp. 551-555.
- Wolters-Arts, M., Lush, W. M. & Mariani, C. (1998).** Lipids are required for directional pollen-tube growth. *Nature*, 392, pp. 818-821.

Xu, P., Vogt, T. & Taylor, L. (1997). Uptake and metabolism of flavonols during *in vitro* germination and tube growth of *Petunia hybrida* pollen. *Planta*, 202, pp. 257-265.

Ying Zeng & Tao Yang (2002). RNA Isolation From Highly Viscous Samples Rich in Polyphenols and Polysaccharides. *Plant Molecular Biology Reporter*, 20, p. 417a-417e.

Ylstra, B., Busscher, J., Franken, J., Hollman, P., Mol, J. & van Tunen, A. (1994). Flavonols and fertilization in *Petunia hybrida*: localization and mode of action during pollen tube growth. *Plant Journal*, 6, pp. 201-212.

Yoon, G. M., Dowd, P. E., Gilroy, S. & McCubbin, A.G. (2006). Calcium-dependent protein kinase isoforms in *Petunia* have distinct functions in pollen tube growth, including regulating polarity. *Plant Cell*, 18, pp. 867-878.

York, W. S., Qin, Q. & Rose, J.K.C. (2004). Proteinaceous inhibitors of endo-beta-glucanases. *Biochim Biophys Acta*, 1696, pp. 223-233.

Zerback, R., Bokel, M., Geiger, H. & Hess, D. (1989). A kaempferol 3-glucosylgalactoside and further flavonoids from pollen of *Petunia hybrida*. *Phytochemistry*, 28, p. 897-899.

Zhang, G. & Staehelin, L. (1992). Functional Compartmentation of the Golgi Apparatus of Plant Cells : Immunocytochemical Analysis of High-Pressure Frozen- and Freeze-Substituted Sycamore Maple Suspension Culture Cells. *Plant Physiol*, 99, pp. 1070-1083.

Zheng, Z. L. & Yang, Z. (2000). The Rrop GTPase switch turns on polar growth in pollen. *Trends Plant Sci*, 5, pp. 298-303.

Zonia, L., Cordeiro, S., Tupy, J. & Feijo, J.A. (2002). Oscillatory chloride efflux at the pollen tube apex has a role in growth and cell volume regulation and is targeted by inositol 3,4,5,6-tetrakisphosphate. *Plant Cell*, 14, pp. 2233-2249.

8 Danksagung

Mein Dank gilt insbesondere Herrn Prof. Dr. Thomas Rausch für die Überlassung dieses interessanten Themas.

Herrn Prof. Dr. Rüdiger Hell danke ich für die Übernahme des Korreferats.

Bedanken möchte ich mich bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe für ihre Hilfe und Unterstützung, durch die das Gelingen dieser Arbeit erst ermöglicht wurde.

Ich danke allen, die mich bei der Anfertigung dieser Arbeit unterstützt haben und mir mit Rat und Tat zur Seite standen.

Besonders danke ich meinen Eltern für die langjährige Unterstützung in allen Lebenslagen.