

Metabole Regulation von Pollenentwicklung und Pollenkeimung durch Zucker

Dissertation zur Erlangung des
naturwissenschaftlichen Doktorgrades der
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Dipl.-Ing. agr. Jörg Hirsche

aus Selb



Würzburg 2008

Eingereicht am:

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. Martin J. Müller

1. Gutachter: Prof. Dr. Thomas Roitsch

2. Gutachter: Prof. Dr. Werner Kaiser

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	7
Zusammenfassung	11
Summary.....	12
1 Einleitung.....	13
1.1 Kohlenhydratverteilung zwischen Source- und Sink-Geweben.....	13
1.2 Invertasen in höheren Pflanzen.....	14
1.2.1 Invertasen mit pH-Optimum im neutralen Bereich.....	14
1.2.2 Invertasen mit pH-Optimum im sauren Bereich.....	15
1.2.2.1 Vakuoläre Invertasen.....	17
1.2.2.2 Extrazelluläre Invertasen.....	18
1.2.2.2.1 Die Bedeutung extrazellulärer Invertasen für die Reproduktion der Pflanzen.....	18
1.2.2.2.2 Regulation extrazellulärer Invertasen durch biotische und abiotische Faktoren.....	19
1.2.2.3 Regulation der Invertaseaktivität durch proteinogene Inhibitoren	24
1.3 Mechanismen des Zucker-Signaling in Pflanzen	25
1.4 Pollenentwicklung und Pollenschlauchwachstum.....	29
1.5 Zielsetzung dieser Arbeit	30
2 Ergebnisse.....	32
2.1 Einfluss der extrazellulären Invertase auf Pollenentwicklung und Pollenschlauchwachstum in <i>Arabidopsis thaliana</i>	32
2.1.1 Herstellung der Konstrukte und Erzeugung der transgenen Pflanzen.....	32
2.1.2 Aktivitätsvergleich der antheren- und pollenspezifischen Promotoren <i>AtcwINV2</i> und <i>Nin88</i> in <i>Arabidopsis</i> und <i>N. tabacum</i> durch <i>GUS</i> -Reporterlinien	32
2.1.2.1 Analyse der transgenen Reporterlinien	34
2.1.3 Beeinflussung der Invertaseaktivität unter Verwendung des Promotors <i>Nin88</i> (aus <i>N. tabacum</i>) in <i>Arabidopsis</i>	40
2.1.3.1 Analyse der <i>Nin88::Nin88-Antisense</i> -exprimierenden <i>Arabidopsis</i> -Pflanzen.....	41
2.1.3.2 Analyse der <i>Nin88::NtCIF</i> -exprimierenden <i>Arabidopsis</i> -Pflanzen.....	43
2.1.4 Beeinflussung der Invertaseaktivität unter Verwendung des endogenen Promotors <i>AtcwINV2</i> in <i>A. thaliana</i>	46
2.1.4.1 Analyse der transgenen <i>AtcwINV2</i> -Pflanzenlinien	47
2.1.4.1.1 Analyse der <i>AtcwINV2::AtcwINV2-Antisense</i> -exprimierenden <i>Arabidopsis</i> -Pflanzen.....	47
2.1.4.1.2 Analyse der <i>AtcwINV2::Invertase-Inhibitor</i> -exprimierenden <i>Arabidopsis</i> -Pflanzen.....	52

2.2	Vorarbeiten zur Übertragung der erzielten Ergebnisse auf die Nutzpflanze <i>Brassica napus</i>	60
2.2.1	Klonierung der Invertasen-Familie aus <i>B. napus</i>	60
2.2.2	Expressionsanalyse der verschiedenen <i>B. napus</i> -Invertasen.....	63
2.3	Einfluss der extrazellulären Invertasen während der Pollenkeimung und dem Pollenschlauchwachstum in <i>Nicotiana tabacum</i>	64
2.3.1	Klonierung der Invertasen-Familie aus Tabak	64
2.3.2	Expressionsanalyse der verschiedenen Tabak-Invertasen	66
2.3.2.1	Northern-Analysen.....	66
2.3.2.2	<i>In-situ</i> -Hybridisierung.....	68
2.3.3	Hemmung der Invertaseaktivität im Stempel von <i>N. tabacum</i>	71
2.3.3.1	Herstellung der Konstrukte und Erzeugung der transgenen <i>N. tabacum</i> -Pflanzen.....	71
2.3.3.2	Spezifische Reduzierung der Invertaseaktivität im Narbengewebe	71
2.3.3.2.1	Analyse der transgenen <i>STIG1</i> -Tabakpflanzenlinien	73
2.3.3.2.1.1	Analyse der Promotoraktivität mittels <i>GUS</i> -Reporterpflanzen.....	73
2.3.3.2.1.2	Analyse der <i>STIG1::NtCIF</i> -exprimierenden Tabakpflanzen	74
2.3.3.3	Spezifische Reduzierung der Invertaseaktivität im Durchlassgewebe.....	75
2.3.3.3.1	Analyse der transgenen <i>SK2</i> -Tabakpflanzenlinien	76
2.3.3.3.1.1	Analyse der Promotoraktivität mittels <i>GUS</i> -Reporterpflanzen.....	76
2.3.3.3.1.2	Analyse der <i>NtCIF</i> -exprimierenden Tabakpflanzen.....	78
2.4	Die Pollenkeimung als Modell zum Verständnis des Zucker-Signaling in Pflanzen	84
2.4.1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	84
2.4.1.1	Glucose und Mannose inhibieren die Pollenkeimung über Hexokinase-vermitteltes Zucker-Signaling.....	87
2.4.1.2	Beteiligung Hexokinase-unabhängiger Signalwege während der Pollenkeimung	91
2.4.1.3	Zucker-abhängige Induktion blasenartiger Strukturen.....	93
2.4.2	<i>Nicotiana tabacum</i>	97
3	Diskussion	100
3.1	Die Aktivität der Promotoren <i>Nin88</i> und <i>AtcwINV2</i> ist im heterologen System eingeschränkt	100
3.2	RNA _i - und Invertase-Inhibitor-vermittelte Hemmung der extrazellulären Invertaseaktivität in Antheren und Pollen von <i>Arabidopsis</i> führt zu männlicher Sterilität.....	103
3.3	Analyse der Invertasen-Familien aus <i>Brassica napus</i> und <i>Nicotiana tabacum</i>	106
3.4	Die griffelspezifische Expression des Invertase-Inhibitors <i>NtCIF</i> ist ohne Relevanz für Pollenkeimung und Pollen-schlauchwachstum.....	110
3.5	Pollenkeimung und Pollenschlauchwachstum von <i>A. thaliana</i> und <i>N. tabacum</i> als Instrumente zum Verständnis des Zucker-Signaling in Pflanzen	114
3.5.1	Beteiligung Hexokinase-abhängiger und -unabhängiger Signalwege am Zucker-Signaling während der Pollenkeimung von <i>Arabidopsis</i>	115

3.5.2	Einfluss der Kohlenhydratquelle auf das Pollenschlauchwachstum von <i>Nicotiana tabacum</i>	122
3.6	Ausblick.....	125
4	Materialien und Methoden.....	128
4.1	Materialien	128
4.1.1	Chemikalien und Enzyme.....	128
4.1.2	Nährmedien und Phytohormone	128
4.1.3	Puffer und Lösungen	130
4.1.4	Verwendete Organismen.....	132
4.1.4.1	Bakterien	132
4.1.4.2	Pflanzen	132
4.1.5	Computerprogramme, Webseiten	133
4.2	Methoden	133
4.2.1	Pflanzenanzucht	133
4.2.1.1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	133
4.2.1.2	<i>Brassica napus</i>	134
4.2.1.3	<i>Nicotiana tabacum</i>	134
4.2.2	Herstellung transgener Pflanzen	134
4.2.2.1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	134
4.2.2.2	<i>Nicotiana tabacum</i>	135
4.3	Molekularbiologische Methoden	136
4.3.1	Isolierung von Nukleinsäuren	136
4.3.1.1	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	136
4.3.1.2	Gewinnung genomischer DNA aus Pflanzenmaterial.....	137
4.3.1.3	Präparation von Gesamt-RNA aus Pflanzenmaterial	138
4.3.2	Herstellung von cDNA aus isolierter RNA.....	139
4.3.3	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	139
4.3.4	Restriktion von DNA	142
4.3.5	Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten	142
4.3.6	Auftrennung von Nukleinsäuren im Agarosegel.....	143
4.3.6.1	DNA-Gelelektrophorese	143
4.3.6.2	RNA-Gelelektrophorese	143
4.3.7	Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	143
4.3.8	Ligation von DNA-Fragmenten	144
4.3.9	Herstellung kompetenter Bakterien	144
4.3.9.1	<i>Escherichia coli</i>	144
4.3.9.2	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	145
4.3.10	Transformation von Bakterien	145
4.3.10.1	<i>Escherichia coli</i>	145
4.3.10.2	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	145
4.3.11	Identifizierung transformierter Bakterien	146
4.3.11.1	Colony-Screening von <i>E. coli</i>	146
4.3.11.2	Colony-Screening von <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	146
4.3.12	Southern-Blotting	147

4.3.13	Northern-Blotting.....	148
4.3.14	Markierung von DNA-Fragmenten mit ³² P	149
4.3.15	Hybridisierung mit ³² P-markierten Sonden.....	149
4.3.16	<i>In vitro</i> -Transkription und Markierung von RNA-Fragmenten mit Digoxigenin	149
4.4	Histologische Methoden	150
4.4.1	Whole-Mount <i>in situ</i> -Hybridisierung	150
4.4.2	Pollenkeimung	151
4.4.3	Detektion der β -Glucuronidaseaktivität mittels X-Gluc	152
4.4.3.1	Histologischer Nachweis	152
4.4.3.2	Fluorometrischer Nachweis.....	153
4.4.4	Anilinblaufärbung von Pollenschläuchen <i>in vivo</i>	153
4.4.5	Elektronenmikroskopische Aufnahmen.....	153
5	Literaturverzeichnis.....	154
6	Anhang.....	182
	Publikationen.....	198
	Lebenslauf.....	199
	Danksagung.....	200
	Ehrenwörtliche Erklärung.....	201

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
1F-Fru	1-Fluoro-1-deoxy-D-fructose
2,4-D	2,4-Dichlorphenoxyessigsäure
2-DOG	2-Deoxyglucose
3-OMG	3-O-Methylglucose
4-MU	4-Methylumbelliferon
4-MUG	4-Methylumbelliferyl- β -D-glucuronid
6-DOG	6-Deoxyglucose
ABA	Abscisinsäure
Abb.	Abbildung
AGPs	Arabinogalactan-Proteine
Anz.	Anzahl
AS	Antisense
ATP	Adenosintriphosphat
BAP	6-Benzylaminopurin
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat
bp	Basenpaare
BR	Brassinosteroid
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
cDNA	komplementäre DNA
CDS	<i>coding sequence</i>
Cello	Cellobiose
CIAP	<i>Calf-Intestine-Alkaline-Phosphatase</i>
Ck	Cytokinin
cm	Zentimeter
cw-INV	extrazelluläre Invertase
cyt-INV	cytoplasmatische (neutrale) Invertase
DAF III	α -D-Fructofuranose- β -D-fructofuranose 1,2':2,3'-dianhydrid
DCS	6,6'-Dichloro-6,6'-dideoxysaccharose
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Etylenglycoltetraacetat

EtOH	Ethanol
FEHs	Fructanexohydrolasen
Fru	Fructose
GA	Gibberellin
GABA	γ -Aminobuttersäure
Gal	Galactose
<i>gin</i>	<i>glucose insensitive</i>
Glu	Glucose
GPM	1-O- α -D-Glucopyranosyl-D-Mannitol
GPS	6-O- α -D-Glucopyranosyl-D-Sorbitol
GUS	β -Glucuronidase
h	Stunde
HXK1	Hexokinase1
JA	Jasmonsäure
K	Kontrollmedium
kDa	Kilo-Dalton
kg	Kilogramm
ko	<i>knock out</i>
l	Liter
L-Glu	L-Glucose
Lac	Lactose
Lactul	Lactulose
Leu	Leucrose
M	Molarität
Mal	Maltose
Malol	Maltitol
Man	Mannose
Manol	Mannitol
Melez	Melezitose
Meli	Melibiose
MeOH	Methanol
Mhl	Mannoheptulose
min	Minute
MOPS	3-N-(Morpholino)propansulfonsäure
MS	Murashige & Skoog
MU	Methylumbelliferon
N	Normalität
NAA	Naphtylessigsäure

NaAc	Natriumacetat
nB	nach Bestäubung
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
nd	nicht detektierbar
OD	Optische Dichte
Pal	Palatinose
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEV	<i>position effect variegation</i>
pl	Isoelektrischer Punkt
PIPES	Piperazin-N-N'-bis(2-ethansulfonsäure)
PK	Pollenkeimung
PMEI	Pectinmethylesteraseinhibitor
PR	<i>pathogenesis related</i>
PS	Pollenschlauch
PVP	Polyvinylpyrrolidon
Q _{PK}	Quotient Pollenkeimung
QTL	<i>quantitative trait locus</i>
Raff	Raffinose
RNA	Ribonucleinsäure
RNA _i	RNA-Interferenz
RNAse A	Ribonuclease A
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	<i>reverse transcription</i> PCR
s	Sekunde
s. o.	siehe oben
SDS	Natriumdodecylsulfat
SNF1	<i>sucrose non-fermenting 1</i>
SnRK1	<i>SNF1-related protein kinase 1</i>
Sorb	Sorbose
Sorbol	Sorbitol
Stachy	Stachyose
STP	Monosaccharidtransporter (<i>sugar transport protein</i>)
Suc	Saccharose
Sucra	Sucralose
SUS	Saccharose-Synthase
SUT2	<i>sucrose transporter 2</i>
T6P	Trehalose-6-Phosphat

Tab.	Tabelle
TPS1	<i>trehalose phosphate synthase 1</i>
Tre	Trehalose
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-propan-1,3-diol
tRNA	transfer-RNA
Tur	Turanose
U	<i>unit</i>
ub	unbestäubt
üN	über Nacht
UV	Ultraviolett
V	Volt
vac-INV	vakuoläre Invertase
Vol	Volumen
w/v	<i>weight per volume</i>
WT	Wildtyp
x g	x Erdbeschleunigung
X-Gluc	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- β -D-Glucuronid

Zusammenfassung

Invertasen spielen eine zentrale Rolle im Metabolismus der Pflanzen und werden über eine Vielzahl von Faktoren in ihrer Regulation beeinflusst. Invertasen mit pH-Optimum im sauren Bereich liegen dabei als vakuoläre und zellwandgebundene Isoformen einer Genfamilie in den Pflanzen vor. Im Rahmen dieser Arbeit wurden zum ersten Mal 9 putative Invertasen aus der Nutzpflanze *Brassica napus*, sowie 4 weitere putative Mitglieder der bereits bekannten Tabakinvertasenfamilie isoliert und Expressionsprofile für die neu klonierten Invertasen erstellt.

Symplastisch isolierte Zellen, wie z. B. Pollen und Pollenschläuche, sind auf die Expression zellwandgebundener Invertasen besonders angewiesen, da sie Kohlenhydrate primär in Form von Fructose und Glucose aufnehmen, die über die Invertasenvermittelte Spaltung aus Saccharose gebildet werden. An Tabak hatten Goetz *et al.* (2001) gezeigt, dass eine Inhibierung dieser pollenspezifischen Invertaseaktivität zu männlich sterilen Pflanzen führt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde nachgewiesen, dass durch Inhibierung der Zellwandinvertaseaktivität mittels Antisense-Technik oder Expression des proteinogenen Invertase-Inhibitors *AtC/VIF2* auch männlich sterile *Arabidopsis*-Pflanzen generiert werden können. Ein Aktivitätsvergleich der Invertasepromotoren von *Nin88* aus Tabak und *AtcwINV2* aus *Arabidopsis* im jeweiligen homo- und heterologen System zeigte jedoch, dass der Einsatz dieser pollenspezifischen Promotoren zur Erzeugung männlich steriler Pflanzen über Familiengrenzen hinweg nicht möglich ist.

Neben ihrer Funktion als Energieträger stellen Kohlenhydrate auch Signalmoleküle dar, die in die Regulation zentraler Prozesse der Pflanzen eingreifen. Anhand von Keimungsanalysen mit *Arabidopsis*-Pollen wurde festgestellt, dass Hexokinase-unabhängige Signalingwege involviert sein müssen, um ein Auskeimen der Pollen zu ermöglichen. Dabei kann die Hexokinase-vermittelte Inhibition der Pollenkeimung vermutlich durch die Beteiligung anderer Signaling-Wege aufgehoben werden. Es wurde außerdem die zuckerabhängige Ausbildung blasenartiger Strukturen an *Arabidopsis*-Pollen nachgewiesen, die vermutlich durch einen Zucker-spezifischen Abbruch des Pollenschlauchwachstums gebildet werden.

Summary

Invertases with acid pH-optimum play a central role in plant metabolism and are regulated by numerous biotic and abiotic factors. They consist of vacuolar and extracellular isoforms of a gene family in plants. For the first time 9 putative members of the invertase family of *Brassica napus*, as well as 4 additional putative tobacco acid invertases were cloned in this work and expression profiles were analysed.

Symplastically isolated cells, like pollen and pollen tubes, in particular depend on the expression of extracellular invertases, since they prefer the uptake of glucose and fructose. These hexoses are generated by the invertase-mediated cleavage of sucrose. Goetz *et al.* (2001) have shown on tobacco that inhibition of the pollen specific invertase activity lead to male sterile plants. In this work it was shown that inhibition of cell wall invertase activity via antisense technology or expression of the proteinaceous invertase inhibitor *AtC/VIF2* also causes male sterility in *Arabidopsis thaliana*. Comparison of the promoter activities of the invertases *Nin88* (tobacco) and *AtcwINV2* (*Arabidopsis*) in the corresponding homo- and heterologous systems revealed that the use of these pollen specific promoters for generating male sterile plants is not possible in diverse plant families.

Besides their function as energy source, carbohydrates are signaling molecules that influence regulation of central processes in the plants. On the basis of germination assays with *Arabidopsis* pollen, it was shown that hexokinase-independent signaling pathways must be involved to permit normal pollen germination. In this context, hexokinase-mediated inhibition of pollen germination might be overrode by the involvement of other signaling pathways. In addition, the sugar-dependent generation of bubble-like structures at *Arabidopsis* pollen was demonstrated, which might be caused by the sugar-specific interruption of pollen tube growth.

1 Einleitung

1.1 Kohlenhydratverteilung zwischen Source- und Sink-Geweben

Höhere Pflanzen assimilieren als autotrophe Organismen durch den Prozess der Photosynthese Kohlenstoff, der zum Aufbau verschiedenster chemischer Verbindungen oder als Energiequelle genutzt wird. Die CO₂-Fixierung findet dabei in den Chloroplasten der Mesophyllzellen grüner Blätter statt. Da sie genug Kohlenstoff fixieren, um auch andere Gewebe versorgen zu können, werden sie als Source-Gewebe bezeichnet. Es gibt aber auch Gewebeformen, die sich nicht selbst mit Kohlenstoff versorgen können (Sink-Gewebe). Dazu gehören, neben noch jungen Blättern, vor allem Wurzeln, Blüten und Früchte. Der assimilierte Kohlenstoff wird aus den Source-Organen über das Phloem zu den Sink-Organen transportiert. Als Haupttransportform des Kohlenstoffs nutzen viele Pflanzen den Zweifachzucker Saccharose. Auch in der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* wird, neben geringen Mengen des Trisaccharids Raffinose, vor allem Saccharose transportiert (Haritatos *et al.*, 2000). Im Gegensatz dazu werden von verschiedenen Arten anderer Pflanzenfamilien weitere Kohlenhydrate im Phloem befördert. So verwenden einige Cucurbitaceen (Pharr *et al.*, 1984) und Lamiaceen (Sprenger und Keller, 2000) vor allem Raffinose und Stachyose bzw. Verbascose zum Langstreckentransport, während eine weitere Gruppe von Pflanzen neben Saccharose auch Zuckeralkohole transportieren (Gao *et al.*, 2003; Noiraud *et al.*, 2000).

Die transportierte Saccharose kann die Sink-Zelle auf zwei verschiedenen Wegen erreichen (Abbildung 1-1): 1. Das Disaccharid wird aus dem Phloem entladen und über symplastische Verbindungen (Plasmodesmata) der einzelnen Zellen zur Zielzelle transportiert und dort von cytosolischen Invertasen (cyt-INV) bzw. Saccharose-Synthasen (SUS) gespalten oder zur Speicherung in die Vakuole transportiert bzw. dort von vakuolären (vac-INV) Invertasen gespalten. 2. Die Saccharose wird in den Apoplasten entladen und von dort intakt über Saccharosetransporter bzw. nach deren Spaltung durch extrazelluläre Invertasen (cw-INV) in Form von Glucose und Fructose mittels Hexosetransporter in die Zelle transportiert. Bei symplastisch isolierten Geweben, wie sich entwickelnde Pollenkörner oder Pollenschläuche, ist die Aufnahme von Kohlenhydraten nur über den Apoplasten aus dem umliegenden Gewebe möglich.

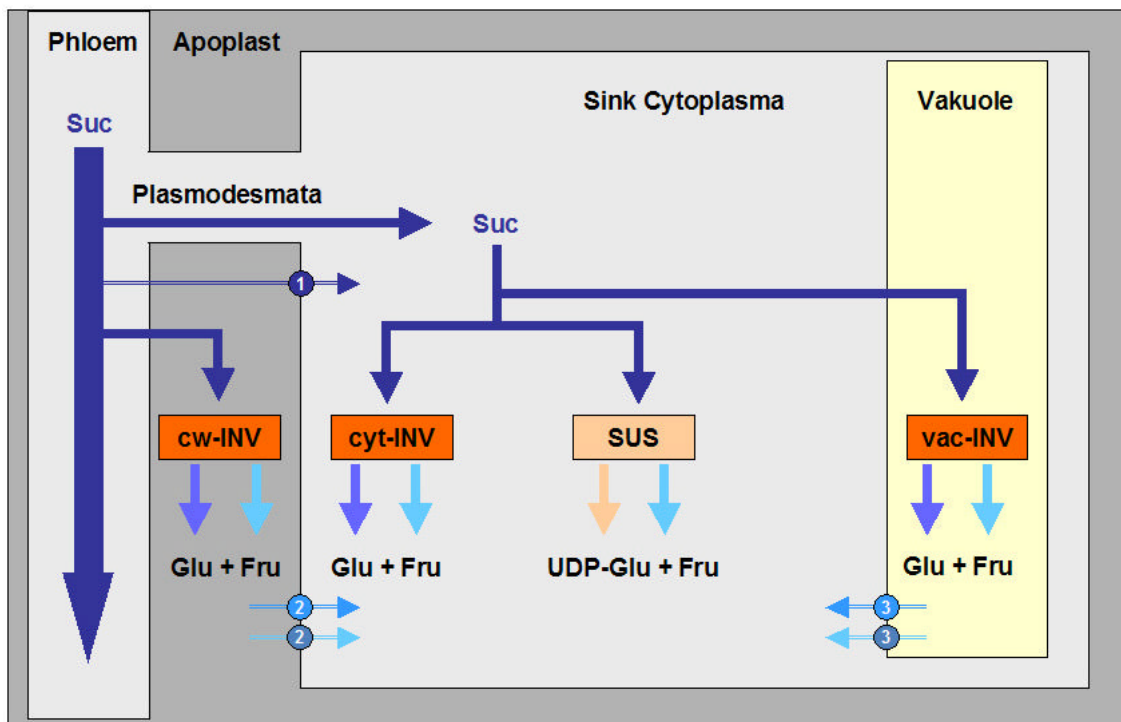


Abbildung 1-1: Modell des Kohlenstofftransports in Form von Saccharose (Suc) aus dem Phloem in eine Sink-Zelle. Saccharose kann über Plasmodesmata in die Ziel-Zelle transportiert und dort von cytosolischen Invertasen (cyt-INV), Saccharose-Synthase (SUS) oder vakuolären Invertasen (vac-INV) in die korrespondierenden Hexosen gespalten werden. Über den Apoplasten kann Saccharose direkt über Saccharose-Transporter (SUT) oder nach Spaltung durch extrazelluläre Invertasen (cw-INV) in Form von Glucose (Glu) und Fructose (Fru) über Hexose-Transporter (STP, TMT, VGT) aufgenommen werden. 1: SUT, 2: STP, 3: TMT/VGT. Verändert nach Koch (2004).

1.2 Invertasen in höheren Pflanzen

In allen höheren Pflanzen können Invertasen nach ihrem pH-Optimum in neutrale (pH 7) und saure Invertasen (pH 3,5 – 5,5) eingeteilt werden.

1.2.1 Invertasen mit pH-Optimum im neutralen Bereich

Die neutralen Invertasen besitzen einen isoelektrischen Punkt (pI) von 8 – 9 und sind im Cytoplasma zu finden, weshalb sie auch als cytosolische Invertasen bezeichnet werden. Die cyt-INVn wurden bislang erst wenig untersucht. Vargas *et al.* (2003) vermuten aufgrund phylogenetischer Untersuchungen, dass der Ursprung dieser Invertasen in Cyanobakterien liegt, die sich im Rahmen der Endosymbiose zu pflanzlichen Chloroplasten entwickelten. Nach den bisherigen Untersuchungen handelt es sich dabei um größere Genfamilien mit 16 Genen in Pappel (Bocock *et al.*, 2008), 9 Genen in *Arabidopsis* (Rhee *et al.*, 2003) und 8 Genen in Reis (Ji *et al.*, 2005b).

Neben dem Cytosol als aktivem Wirkort identifizierten Murayama und Handa (2007) 2 cyt-INV's aus Reis, die in Mitochondrien bzw. Plastiden lokalisiert sind (OsNIN1 und OsNIN3). In Sequenzanalysen konnten die beiden, neben Ji *et al.* (2005b), auch Invertasen aus *Arabidopsis* identifizieren, die vermutlich in Organellen transportiert werden. Außer einer Beteiligung cyt-INV's an der Antwort auf osmotischen Stress und Kälte (Qi *et al.*, 2007; Vargas *et al.*, 2007) wurde auch ein Einfluss der cyt-INV *LjInv1* auf die Entwicklung stickstoffbindender Wurzelknöllchen von *Lotus japonicus* beschrieben (Flemetakis *et al.*, 2006). Aber auch in Möhren und Zuckerrohr wurde die Expression cyt-INV's nachgewiesen (Sturm *et al.*, 1999; Bosch *et al.*, 2004). Dabei zeigte sich eine höhere Expressionsrate in jungen, sich entwickelnden Organen, was eine Beteiligung der cyt-INV's an der Kohlenhydratversorgung dieser Gewebestrukturen vermuten lässt.

1.2.2 Invertasen mit pH-Optimum im sauren Bereich

Die Gruppe der sauren Invertasen besteht aus den vac-INV's mit einem pI von 5 – 6, während die cw-INV's einen pI von etwa 9 aufweisen und ionisch an die Pflanzenzellwand gebunden sind. Im Sequenzvergleich zeigt sich, dass cw- und vac-INV's einen gemeinsamen Ursprung besitzen und zueinander sehr stark homolog sind (Abbildung 1-2), während sich die cyt-INV's von den sauren Invertasen deutlich unterscheiden. Sowohl cw-INV's als auch vac-INV's verschiedenster Pflanzenfamilien besitzen dabei mehrere stark konservierte Bereiche in ihrer Aminosäuresequenz (Abbildung 1-3). Ein besonderes Charakteristikum stellt das Motiv N-DPN-G/A dar. Dieser hochkonservierte Bereich erstreckt sich über 3 Exons, wobei die 3 Aminosäuren DPN von einem, nur 9 Nukleotide großen Mini-Exon kodiert werden. Dieses Exon ist Bestandteil aller sauren Invertasen (Roitsch und González, 2004). In Kartoffeln wurde jedoch eine Invertase gefunden, bei der das Mini-Exon durch *splicing* entfernt wurde (Simpson *et al.*, 2000). Ein weiteres charakteristisches Merkmal ist das WEC-P/V-DF-Motiv. Bei allen cw-INV's ist an dieser Stelle ein Prolin vorhanden, während alle vac-INV's an dieser Position ein Valin aufweisen. Dabei ist der Austausch dieser Aminosäure verantwortlich für das stärker saure pH-Optimum der cw-INV's (pH 3,5 – 5,0) im Vergleich zu den vac-INV's (pH 5,0 – 5,5), sowie für deren Substratspezifität (Goetz und Roitsch, 1999).

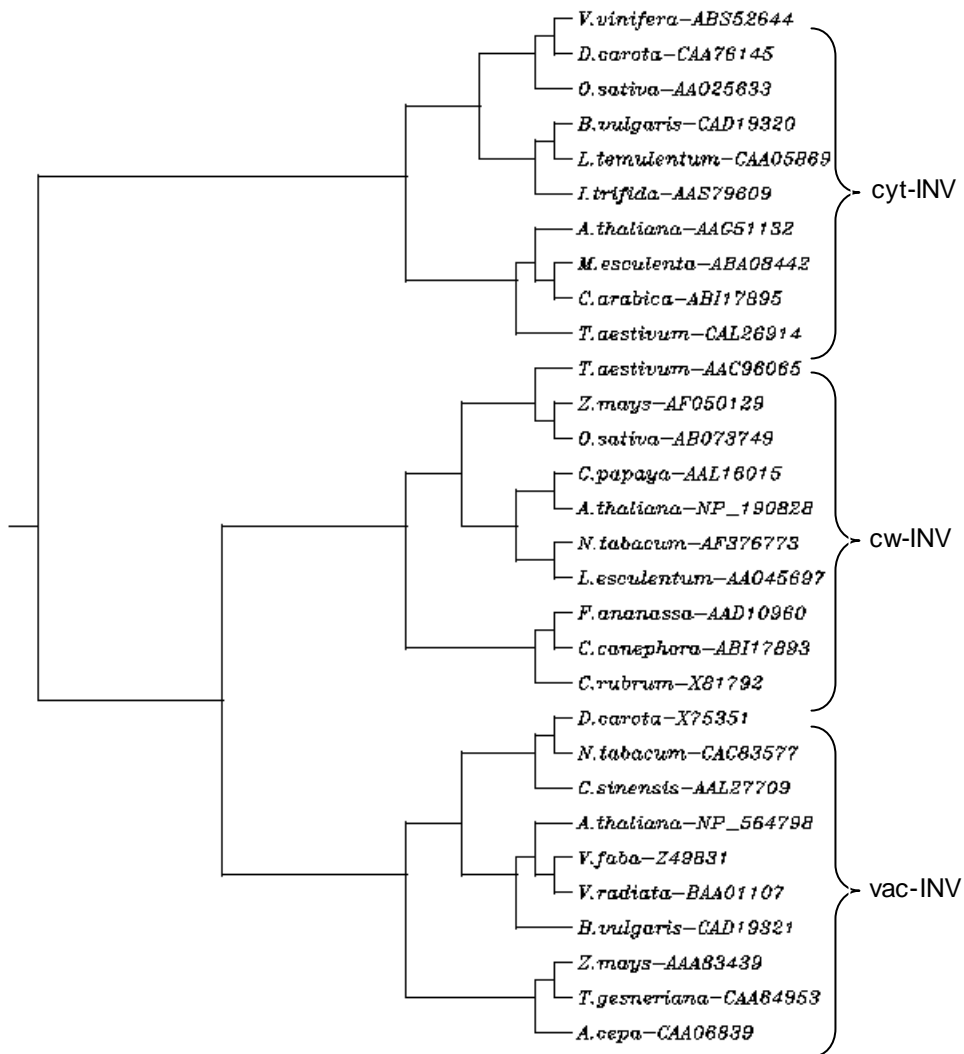


Abbildung 1-2: Dendrogramm verschiedener cyt-, cw- und vac-INV's höherer Pflanzen. Aus dem Sequenzvergleich ist ersichtlich, dass sich die cyt-INV's von den beiden anderen Invertasen-Untergruppen deutlich unterscheiden.

..WM	NDPN	GP..GW	YHFFYQYNP	NA..KD	FRDPTTAW	KT..GM	WECVDF	YP..KY	YASKTFYD	QN..	<i>A. thaliana</i> [1]
..WM	NDPN	GP..GW	YHFFYQYNP	NG..KD	FRDPTTAW	LT..GM	WECVDF	FP..IF	YASKTFYD	QK..	<i>V. faba</i> [2]
..WM	NDPN	GP..GW	YHLFYQYNP	DS..TD	FRDPTTAW	IG..GM	WECVDF	YP..KY	YASKTFYD	QD..	<i>D. carota</i> [3]
..WM	NDPN	GP..GW	YHLFYQYNP	DS..KD	FRDPTTAW	TG..GM	WECVDF	YP..KY	YASKTFYD	PK..	<i>N. tabacum</i> [4]
..WM	NDPN	GP..GW	YHLFYQYNP	DS..KD	FRDPTTAW	AG..GM	WECVDF	YP..RY	YASKSFYD	PY..	<i>C. sinensis</i> [5]
..CM	NDPN	AP..GV	YHLFYQYNP	KG..TQ	FRDPTTAW	MG..GN	WECDF	FP..IF	YASKSFYD	PS..	<i>N. tabacum</i> [6]
..WI	NDPN	AP..GV	YHLFYQYNP	KG..TE	FRDPTTAW	MG..GN	WECDF	FP..NF	YASKTFYD	PS..	<i>L. esculentum</i> [7]
..WI	NDPN	AP..GV	YHLFYQYNP	KG..SA	FRDPTTAW	FN..GM	WECDF	FP..NY	YASKTFYD	DK..	<i>A. thaliana</i> [8]
..WI	NDPN	AP..GV	YHLFYQYNP	KG..TQ	FRDPTTAW	RH..GM	WECDF	FP..NY	YASKTFYD	PV..	<i>Z. mays</i> [9]
..WI	NDPN	GP..GW	YHLFYQYNP	KG..TQ	FRDPTTAW	YA..GM	WECDF	FP..NF	YASKTFYD	PV..	<i>O. sativa</i> [10]

Abbildung 1-3: Homologievergleich verschiedener vakuolärer (Sequenzen 1–5) und extrazellulärer Invertasen (Sequenzen 6–10). Die stark konservierten Bereiche der Aminosäuresequenz sind hervorgehoben. Der P/V-Unterschied der extrazellulären bzw. vakuolären Invertasen ist mit einem Pfeil markiert. [1] *At3fruct3* (At1g62660), NP_564798; [2] *VFVCINV*, Z49831; [3] X75351; [4] CAC83577; [5] AAL27709; [6] *Nin88*, AF376773; [7] *Lin5*, AAO45697; [8] *AtcwINV2* (At3g52600), NP_190828; [9] *Incw1*, AF050129; [10] *OsCIN1*, AB073749.

1.2.2.1 Vakuoläre Invertasen

Die Gruppe der vac-INV's besteht in vielen untersuchten Pflanzenarten aus 2 Genen. Neben *Arabidopsis* (Haouazine-Takvorian *et al.*, 1997; Tymowska-Lalanne und Kreis, 1998) und Reis (Ji *et al.*, 2005b) konnten auch in Broccoli (Coupe *et al.*, 2003) und Süßkartoffel (Wang *et al.*, 2005) jeweils 2 Mitglieder der vac-INV's identifiziert werden. In Pappel wurden 3 Gene nachgewiesen, wobei es sich bei *PtVIN1* um eine intronloses Gen handelt, das vermutlich durch Reinsertion des Transkripts von *PtVIN2* entstand (Bocock *et al.*, 2008). Neben einer generellen Beteiligung an der Mobilisierung gespeicherter Saccharose in der Vakuole (Roitsch und Ehneß, 2000) wurde auch eine Beteiligung vac-INV's an der Akkumulation von Hexosen während der späten Fruchtreife von Tomaten nachgewiesen (Elliott *et al.*, 1993). Diese Anreicherung osmotisch wirksamer Einfachzucker in der Vakuole durch vac-INV's findet zudem während des Wachstums in verschiedenartigen Sink-Geweben statt. Auf diese Weise wird zum einen durch den Abbau der Saccharose dessen Import in die Zelle gefördert und zum anderen führt die höhere osmotische Kapazität der Spaltprodukte zu einer Vergrößerung der Zelle durch den wachsenden Turgor (Koch, 2004). So wiesen Lowell *et al.* (1989) eine hohe vac-INV-Aktivität in jungen, sich entwickelnden Früchten der Grapefruit nach, die 10 Wochen nach der Blüte stark abnahm. Aber auch in jungen Maiskörnern zeigt die Aktivität der vac-INV's 15 Tage nach der Bestäubung ihr Maximum (Thévenot *et al.*, 2005). QTL- und Mutanten-Analysen in *Arabidopsis* wiesen zudem eine Beteiligung der vac-INV *Atβfruct4* am Längenwachstum der Wurzeln nach (Sergeeva *et al.*, 2006) und auch in den Wurzelspitzen von Mais wurde vac-INV-Aktivität nachgewiesen (Duke *et al.*, 1991). Die Expression der vac-INV's im Gewebe wird dabei von einer Vielzahl biotischer und abiotischer Faktoren beeinflusst, wie der Schwerkraft, Kältereizen, Zuckern und verschiedenen Phytohormonen (Koch, 2004). So zeigte sich, dass Abscisinsäure zu einer starken Induktion der *Ivr2*-Expression in Blättern und Wurzeln von Mais führt (Trouverie *et al.*, 2003 und 2004). Aber auch Trockenstress bewirkt eine Erhöhung der *Ivr2*-Transkription in Maisblättern, während die Expression in den Ovarien sinkt (Kim *et al.*, 2000 und Andersen *et al.*, 2002). Somit zeigt sich eine deutlich unterschiedliche Regulation des gleichen Gens, abhängig vom Gewebetyp. Bonfig *et al.* (2006) wiesen zudem eine spezifische Erhöhung der Aktivität beider vac-INV's aus *Arabidopsis* nach der Infektion mit virulenten *Pseudomonas syringae* nach, während die Behandlung mit avirulenten Bakterien keine Veränderung der Genexpression bewirkte.

1.2.2.2 Extrazelluläre Invertasen

Bei den cw-INVs handelt es sich, im Vergleich zu den vac-INVs, um eine Genfamilie mit mehr als 2 Mitgliedern. So wurden in Reis 9 putative cw-INVs identifiziert, in Tomate und *Arabidopsis* jeweils 4 verschiedene Gene (Ji *et al.*, 2005b; Godt und Roitsch, 1997; Rhee *et al.*, 2003). Neben cw-INVs mit hohem pI von 9 existieren auch putative cw-INVs, die mit 5 – 6 einen deutlich niedrigeren pI aufweisen. In weitergehenden Untersuchungen derartiger Invertasen in *Arabidopsis* konnten AtcwINV3 und AtcwINV6 als Fructanexohydrolasen (FEHs) mit unterschiedlicher Substratspezifität identifiziert werden (de Connick *et al.*, 2005), obwohl bei *Arabidopsis* keine Fructan-Synthesewege bekannt sind. Auch in Zuckerrübe, einer weiteren Pflanze ohne bekannte Fructan-Biosynthese, wurde eine FEH identifiziert (van den Ende *et al.*, 2003b). Die FEHs unterscheiden sich von den cw-INVs lediglich durch einen niedrigen pI und eine andere Substratspezifität. Die für die sauren Invertasen charakteristischen konservierten Bereiche (Abbildung 1-3) sind in den FEHs nahezu vollständig erhalten. Dies gilt auch für die FEHs aus Pflanzen, bei denen eine Fructan-Speicherung bekannt ist, wie z. B. *Cichorium* (van den Ende, 2000).

Untersuchungen haben gezeigt, dass die einzelnen Mitglieder der cw-INV-Familie einer Pflanze gewebespezifisch exprimiert werden. Dabei nehmen die cw-INVs eine zentrale Rolle in der Versorgung der Gewebe mit Kohlenhydraten ein. Durch die Spaltung des Transportzuckers Saccharose wird das Konzentrationsgefälle in der Pflanze zwischen Source (Phloembeladung) und Sink (Phloementladung) erhöht, was zu einer verbesserten Versorgung des Gewebes mit Kohlenstoff führt. So wurde eine besonders hohe cw-INV-Expression in sich entwickelnden Organen mit einem hohen Energiebedarf nachgewiesen, wie z. B. in wachsenden Bambussprossen (Hsieh *et al.*, 2006) oder in Pflanzentumoren, verursacht durch Agrobakterien (Godt und Roitsch, 1997).

1.2.2.2.1 Die Bedeutung extrazellulärer Invertasen für die Reproduktion der Pflanzen

Die Reproduktion gehört zur wichtigsten Phase im Leben einer Pflanze. Die Entwicklung der entsprechenden Strukturen erfordert eine präzise Feinabstimmung in der Versorgung mit Signalmolekülen und Energie. Während der verschiedenen Stadien der Fortpflanzung treten zudem symplastisch isolierte Gewebe auf (Pollen, Pollenschläuche, Embryonen). Daher kommt den cw-INVs eine zentrale Stellung für die Kohlenhydratversorgung dieser Strukturen zu. Während in anderen Organen der Saccharose-Transport auch über Plasmodesmata erfolgen kann, sind die Zellen in

diesen Geweben auf die Aufnahme von Kohlenstoff über den Apoplasten angewiesen, wie z. B. in sich entwickelnden Apfel- (Zhang *et al.*, 2001) und Beerenfrüchten (Zhang *et al.*, 2006) sowie während der Samenentwicklung in *Vicia faba* (Weber *et al.*, 1995). Eine Trockenstress-vermittelte Verringerung der cw-INV-Aktivität in Ovarien von Mais führt zum Absterben dieser Organe (Boyer und McLaughlin, 2007). Auch während der Bildung der männlichen Gameten sind cw-INV's von entscheidender Bedeutung. So wurde in den Antheren von Kartoffeln sowie in den Pollen von Lilien die gewebespezifische Expression bestimmter cw-INV's nachgewiesen (Maddison *et al.*, 1999; Singh und Knox, 1984). Auch in den Antheren und Pollen von Tomate, *Arabidopsis* und Tabak wurde die Präsenz von cw-INV's bestätigt (Godt und Roitsch, 1997; Fridman und Zamir, 2003; Goetz *et al.*, 2001). Die Bedeutung der cw-INV's in diesem Gewebe zeigten Experimente, in denen mittels Antisense eine Reduzierung der cw-INV-Aktivität in den Antheren von Tabak (Nin88) und Tomate (Lin7) zum Abbruch der Pollenentwicklung in einer frühen Entwicklungsphase führte. Die Keimungsfähigkeit dieser Pollen war so stark beeinträchtigt, dass die Pflanzen männlich steril wurden (Goetz *et al.*, 2001; Proels *et al.*, 2006). Diese Erkenntnisse stehen in deutlichem Zusammenhang mit der Identifikation antheren- und pollenspezifischer Monosaccharidtransporter (STPs). In *Arabidopsis* konnten 4 STPs charakterisiert werden, die erst ab einer späten Pollenentwicklungsphase exprimiert werden, wenn die männlichen Gameten vom umliegenden Gewebe symplastisch isoliert sind (Büttner, 2007). Auch in *Petunia* (Ylstra *et al.*, 1998; Garrido *et al.*, 2006), Reis (Ngampanya *et al.*, 2003) und Tabak (Goetz, 2001) wurden STPs mit ähnlichen Expressionsmustern nachgewiesen. Es ist daher anzunehmen, dass die koordinierte Expression von cw-INV's und STPs essentiell für die Kohlenhydratversorgung der männlichen Gameten ist.

1.2.2.2 Regulation extrazellulärer Invertasen durch biotische und abiotische Faktoren

Die Regulation der cw-INV-Expression wird durch eine Vielzahl biotischer und abiotischer Faktoren beeinflusst (Abbildung 1-4). In zahlreichen Studien wurde eine Induktion der cw-INV-Expression durch verschiedene Kohlenhydrate nachgewiesen. So zeigte jeweils ein Gen der cw-INV-Familie aus Tabak (Krausgrill *et al.*, 1996), *Arabidopsis* (Tymowska-Lalanne und Kreis, 1998) und Tomate (Godt und Roitsch, 1997) eine Induktion durch Glucose. *CIN1* aus *Chenopodium rubrum* wies einen Anstieg der Transkriptmenge durch Glucose, Fructose und Saccharose (Roitsch *et al.*, 1995) auf, während *LIN6* aus Tomate auch durch die Disaccharide Turanose und

Palatinose induziert wurde (Sinha *et al.*, 2002). Die Zucker-induzierte cw-INV-Expression durch die Reaktionsprodukte der Invertase selbst ist in diesem Zusammenhang von besonderer Bedeutung. Dieser Mechanismus ermöglicht es der Zelle, die Induktion der Invertase durch die generierten Hexosen aufrecht zu erhalten oder zu verstärken, um eine gesteigerte Versorgung mit Assimilaten zu bewirken.

Neben den Zuckern werden cw-INV's durch eine Vielzahl an Phytohormonen in ihrer Expression beeinflusst. So berichteten Weil und Rausch 1990 von einer Auxin-induzierten cw-INV-Aktivität in Pflanzentumoren, hervorgerufen durch eine Agrobakterieninfektion. In Mais scheint eine durch Gravistimulation hervorgerufene Auxin-Umverteilung für eine asymmetrische cw-INV-Induktion verantwortlich zu sein (Long *et al.*, 2002). In Tomate konnte eine Hormonbox in der Promotorregion von *Lin5* identifiziert werden. Eine Steigerung der Promotoraktivität wurde durch Applikation von 2,4-D nachgewiesen (Proels *et al.*, 2003).

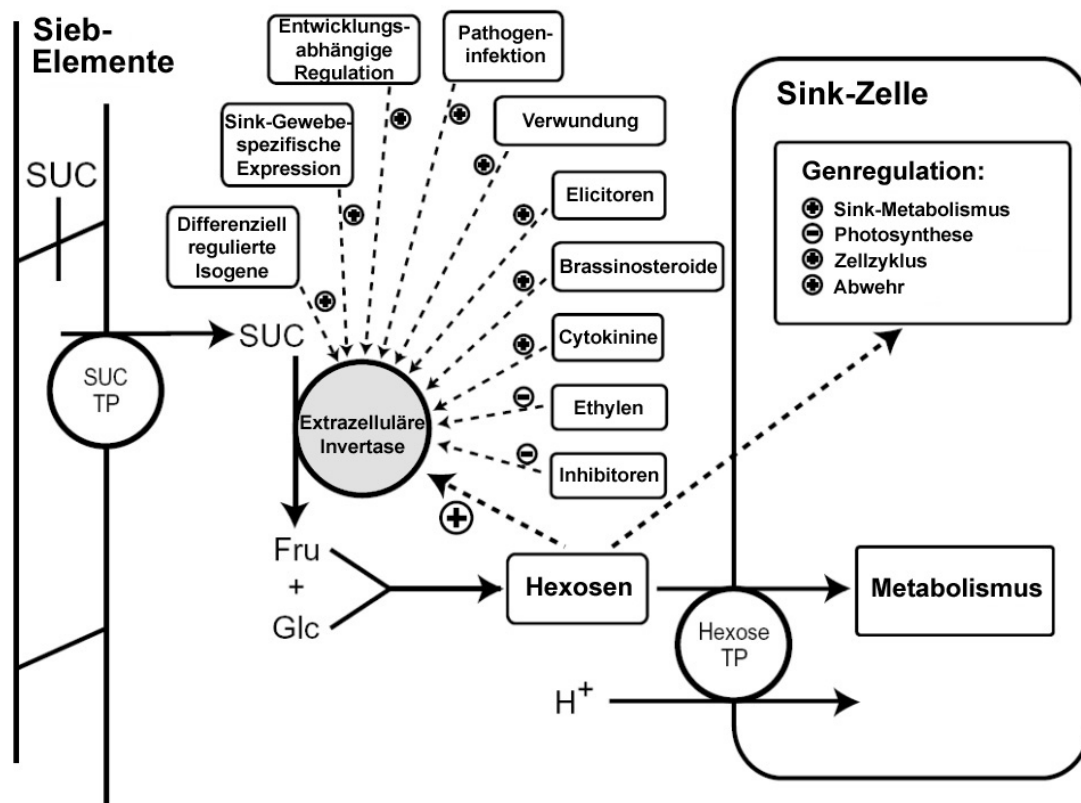


Abbildung 1-4: Schematische Darstellung der Regulation extrazellulärer Invertasen. Eine Vielzahl exogener und endogener Faktoren führen zu einer Induktion der Invertaseaktivität. Neben Ethylen beeinflussen proteinogene Inhibitoren die Aktivität der extrazellulären Invertasen negativ. Verändert nach Roitsch *et al.* (2000).

Cytokine (CKs) fördern die Zellteilung und spielen eine wichtige Rolle in der Regulation verschiedener Wachstumsprozesse. Da diese Vorgänge mit einem erhöhten Bedarf an Kohlenhydraten einhergehen, wurde eine Querverbindung zur

Regulation der Assimilatverteilung vermutet (Kuiper, 1993; Roitsch und Ehneß, 2000). Diese Annahme wurde durch den Nachweis bestätigt, dass in Geweben mit einer erhöhten CK-Konzentration, wie z. B. Tumoren, auch eine erhöhte cw-INV-Aktivität zu finden ist (Godt und Roitsch, 1997). Neben einer Steigerung der cw-INV-Aktivität in *R. sativus* durch Kinetin-Behandlung (Howard und Witham, 1983) wurde in weiteren Untersuchungen festgestellt, dass die cw-INV *CIN1* aus *C. rubrum* (Ehneß und Roitsch, 1997) und *Lin6* aus Tomate (Godt und Roitsch, 1997) durch physiologische Konzentrationen verschiedener CKs stark induziert werden. CKs spielen zudem eine zentrale Rolle während der Seneszenz (Singh *et al.*, 1992; Buchanan-Wollaston, 1997). So wurde durch die Erhöhung der CK-Konzentration in transgenen Pflanzen eine Verzögerung der Seneszenz bewirkt (Smat *et al.*, 1991; Robson *et al.*, 2004; Swartzberg *et al.*, 2006), basierend auf der Modifikation der Source-Sink-Beziehungen innerhalb der Pflanze (Jordi *et al.*, 2000). Guivarc'h *et al.* (2002) und Balibrea *et al.* (2004) wiesen einen Zusammenhang zwischen CK-basierter Ausbildung von Sink-Strukturen und cw-INV-Aktivität nach. So zeigten Tabak-Pflanzen, die eine bakterielle Isopentenyltransferase exprimierten, neben einem höheren CK-Gehalt auch eine höhere cw-INV-Aktivität. Eine lokale Induktion der cw-INV *CIN1* aus *C. rubrum* unter der Kontrolle eines chemisch induzierbaren Promotors führte in Tabak zu einer räumlich begrenzten Verzögerung der Seneszenz, ähnlich dem Phänomen der "Grünen Inseln" auf Herbstlaub (Balibrea *et al.*, 2004).

Brassinosteroide (BRs) besitzen eine große strukturelle Ähnlichkeit zur Gruppe der tierischen Steroidhormone (Grove *et al.*, 1979) und regulieren verschiedene Wachstumsprozesse in den Pflanzen (Li und Chory, 1999; Müssig und Altmann, 1999). Goetz *et al.* (2000) wiesen eine BR-spezifische Induktion der cw-INV *Lin6* in Hypokotylen von Tomatenkeimlingen nach und auch Yu *et al.* (2004) zeigten einen Anstieg der cw-INV-Aktivität in *C. sativus*-Blättern nach BR-Behandlung. Mutantenanalysen und Untersuchungen an transgenen Antisense-Pflanzen in *Arabidopsis* wiesen ebenfalls einen Zusammenhang zwischen BR-Konzentration und cw-INV-Expression nach (Schlüter *et al.*, 2002).

Gibberelline (GAs) fördern das Zellstreckungswachstum und sind, neben ihrem Einfluss auf Blütenbildung und Samenkeimung, an vielen Prozessen in der Pflanze beteiligt (Thomas *et al.*, 2005). Eine Induktion der cw-INV wurde beobachtet nach GA-Applikation bei Erbsen, sowohl auf Ebene der Invertase-Aktivität (Estruch und Beltrán, 1991) als auch hinsichtlich der Transkriptmenge (Wu *et al.*, 1993). Proels *et al.* (2003 und 2006) stellten eine GA-Regulation von *Lin5* und *Lin7* aus Tomate fest. Bei Reis zeigte *OsCIN2* eine starke Expression nach GA₃-Applikation (Ji *et al.*, 2005a) und

auch in *Arabidopsis*-Samen führte die *de novo* Synthese von GA nach der Bestrahlung mit Rotlicht zu einer Induktion von *AtcwINV1* (Mitsuhashi *et al.*, 2004).

Das Ruhe- und Stresshormon Abscisinsäure (ABA) führte bei exogener Applikation und bei einer endogen erhöhten Konzentration in Avocado zu einer gesteigerten cw-INV-Aktivität (Richings *et al.*, 2000). Proels *et al.* (2003) wiesen einen Anstieg der *Lin5*-Expression in Tomate nach ABA-Behandlung nach und konnten zudem Promotorelemente identifizieren, die im Zusammenhang mit der ABA-Antwort verschiedener Gene stehen. Auch in *P. sativum* wurde der mRNA-Anstieg einer cw-INV nach ABA-Anwendung beobachtet (Zhang *et al.*, 1996). Ji *et al.* (2005a) zeigten jedoch, dass der GA₃-vermittelte Anstieg der *OsCIN2*-Expression durch gleichzeitige Gabe von ABA leicht abgeschwächt wurde. Zudem konnte ABA allein keine Induktion dieser cw-INV bewirken.

Jasmonsäure (JA) ist, neben ABA, an der Genregulation als Antwort auf biotischen und abiotischen Stress beteiligt. Sowohl in *P. sativum* (Zhang *et al.*, 1996), als auch in Gerste (Walia *et al.*, 2007) und Zellkulturen von Tomate (Thoma *et al.*, 2003) konnte ein Anstieg der mRNA-Menge von cw-INV nachgewiesen werden. Die Untersuchungen von Park *et al.* (2002) sind für die JA-vermittelte Induktion von cw-INV von besonderer Bedeutung, da sie einen Zusammenhang zwischen JA-Produktion und Pollenentwicklung fanden und Goetz *et al.* (2001) sowie Proels *et al.* (2006) zeigten, dass cw-INV bei der Pollenentwicklung eine zentrale Rolle spielen.

Das Seneszenz- und Reifehormon Ethylen zeigt einen negativen Einfluss auf die Expression von cw-INV. Ethylen-behandelte, autotrophe Zellkulturen von *C. rubrum* reagieren mit einer Repression der Invertase *CIN1* auf Protein- und auf mRNA-Ebene (Linden *et al.*, 1996). Ethylen ist somit bislang der einzige bekannte hormonelle Stimulus, der zu einer Repression der cw-INV führt.

Verwundung und Angriff durch Pathogene stellen eine große Herausforderung im Leben der Pflanzen dar. Die Abwendung dieser negativen Einflüsse erfordert einen erhöhten Energiebedarf – das betroffene Gewebe erhält "Sink-Status" und importiert Kohlenhydrate. Fotopoulos *et al.* (2003) zeigten, dass eine Infektion von *Arabidopsis*-Gewebe mit dem Pilz *E. cichoracearum* zu einer koordinierten Expression der cw-INV *AtcwINV1* und dem Monosaccharidtransporter *AtSTP4* führt. Berger *et al.* (2004) wiesen eine Induktion von *Lin6* durch verschiedene Erreger in infiziertem Blattmaterial von Tomate nach, während Voegelé *et al.* (2006) sogar die systemische Induktion einer cw-INV in Wurzeln von *V. faba* nachwiesen, deren Blätter mit Pathogenen infiziert waren. Neben Infektionsexperimenten wiesen auch zahlreiche Elicitorversuche auf eine Pathogen-vermittelte Induktion von cw-INV hin (Ehneß *et al.*, 1997; Link *et al.*,

2002; Sinha *et al.*, 2002). Da die Induktion von cw-INV's zusammen mit anderen Genen der Pathogenabwehr (*PAL*, *Pr1*) erfolgt, können cw-INV's als wichtige PR-Proteine ("pathogenesis related") betrachtet werden (Roitsch *et al.*, 2003). Da es jedoch bei der Pathogeninfektion zu einer Erhöhung der CK-Konzentration im Gewebe kommt, ist die Induktion der cw-INV's vermutlich auf einen CK-Effekt zurückzuführen (Walters und McRoberts, 2006).

Zu den wichtigsten abiotischen Stressfaktoren, die den Ertrag negativ beeinflussen, zählen Trocken- und Salzstress. Bei Mais führt Trockenheit kurz nach der Bestäubung zu einem deutlichen Rückgang der cw-INV-Aktivität in den Ovarien (Zinselmeier *et al.*, 1995). Bei Weizen und Reis führt Wassermangel zur Ausbildung von sterilen Pollen (Koonjul *et al.*, 2005; Ji *et al.*, 2005a). Dabei geht der Rückgang der cw-INV-Aktivität der fehlerhaften Pollenentwicklung voraus. Da in trockengestresstem Reis stark erhöhte ABA-Werte gemessen wurden ist es wahrscheinlich, dass diese Effekte auf eine ABA-vermittelte Invertase-Regulation zurückzuführen sind (Ji *et al.*, 2005a). Bei Salzstress führt eine Abschwächung der Sink-Stärke zu einem daraus resultierenden Rückgang der Photosyntheseleistung und einer geringeren Produktivität (Roitsch *et al.*, 2003). So wurde nachgewiesen, dass in Salzstress-anfälligen Tomatensorten die cw-INV-Aktivität während der Stressphase stark abnimmt, während in resistenten Pflanzen diese Enzymaktivität auf ihrem normalen Niveau verbleibt (Balibrea *et al.*, 2003). Die Expression einer Invertase aus Hefe im Apoplasten von Tabak führte zu einer Salztoleranz von Tabak-Pflanzen (Fukushima *et al.*, 2001). Bei Gerste wurde zudem eine Salzstress-vermittelte Induktion der JA-Biosynthese festgestellt (Walia *et al.*, 2007). Kältestress scheint einen gewebespezifischen Effekt auf cw-INV's auszuüben. So führen niedrige Temperaturen in *L. perenne* zu einer Erhöhung der cw-INV-Aktivität (Bhowmik *et al.*, 2006), während die Aktivität in den Antheren von Reis aufgrund einer Erhöhung der ABA-Konzentration abnimmt (Oliver *et al.*, 2007). In Kartoffeln wurden posttranskriptionelle Veränderungen beobachtet. Das Mini-Exon, welches die Aminosäuren DPN kodiert, wurde bei Kältestress aus der mRNA eliminiert. Dieser Vorgang konnte bei einer Erhöhung der Temperatur nicht mehr beobachtet werden (Bournay *et al.*, 1996). In vielen Untersuchungen wurde jedoch festgestellt, dass vor allem vac-INV's bei Kältestress induziert werden (Zrenner *et al.*, 1996; Holland *et al.*, 1999; Matsuura-Endo *et al.*, 2004).

Neben den bereits erwähnten Regulationsmechanismen wurde von Cheng *et al.* (1999) eine kohlenhydratabhängige transkriptionelle Regulation einer cw-INV in Mais beschrieben. Weiterhin ist eine Repression der (vakuolären) Invertasen bei Sauerstoffmangel in Mais bekannt (Zeng *et al.*, 1999).

1.2.2.3 Regulation der Invertaseaktivität durch proteinogene Inhibitoren

Neben Saccharose übernehmen auch die Reaktionsprodukte der Invertasen, abgesehen von ihrer Eigenschaft als Kohlenstoffquelle, Funktionen im Bereich des Zucker-Signaling (1.3). Aus diesem Grund muss die Invertaseaktivität, gemäß den Erfordernissen in der Pflanze, streng reguliert werden.

Untersuchungen wiesen eine Induktion der Invertasen durch eine Vielzahl an Faktoren nach, wie bereits beschrieben. Da cw- und vac-INV's aufgrund ihrer Glycosylierung sehr stabil sind, kommen für eine schnelle Reduktion der Invertaseaktivität vor allem posttranslationale Mechanismen in Frage. So bieten, neben einer Erhöhung des pH-Werts im Apoplasten und einem proteolytischen Abbau, proteinogene Invertase-Inhibitoren eine Möglichkeit der Invertase-Regulation (Rausch und Greiner, 2004). Seit der ersten Entdeckung eines endogenen Inhibitors in Kartoffelknollen (Schwimmer *et al.*, 1961) wurden auch in Roter Beete, Zuckerrübe, Süßkartoffel (Pressey, 1968), sowie in Tabak (Weil *et al.*, 1994), Tomate (Pressey, 1994), *C. betacea* (Ordóñez *et al.*, 2000), *P. deflexa* (Sayago *et al.*, 2001), Mais (Bate *et al.*, 2004) und *Arabidopsis* (Link *et al.*, 2004) Invertase-Inhibitoren nachgewiesen. Deshalb ist davon auszugehen, dass diese Proteine im Pflanzenreich weit verbreitet sind. Es handelt sich dabei um Proteine von etwa 18 kDa Größe. Sie sind sehr stabil in Hitze und in einem weiten pH-Bereich. Die Inhibition der Invertasen erfolgt dabei nicht-kompetitiv. Die Inhibitoren besitzen große strukturelle Ähnlichkeit zu Inhibitorproteinen der Pectinmethylesterasen (PMEs) und sind auf Sequenzebene nicht von diesen zu unterscheiden (Rausch und Greiner, 2004; Scognamiglio *et al.*, 2003). Wahrscheinlich wird deren jeweilige Funktion über die N-terminalen Bereiche der Proteine determiniert (Hothorn *et al.*, 2004a und 2004b).

Die verschiedenen Inhibitor-Gene innerhalb einer Pflanze unterscheiden sich hinsichtlich Gewebe- und Substratspezifität. In Tabak wird *NtCIF* vor allem in seneszenten Blättern und in Blüten exprimiert und inhibiert cw- und vac-INV's *in vivo*, während *NtVIF* hauptsächlich in Wurzeln nachweisbar ist und spezifisch vac-INV's inhibiert (Greiner *et al.*, 1998; Rausch und Greiner, 2004; Lauer, 2006). Es wurde beobachtet, dass vac-INV's *in vitro* sehr schnell inhibiert werden, während die Hemmung der cw-INV's über einen längeren Zeitraum erfolgt. Zudem wurde eine Saccharose-vermittelte Protektion von cw-INV's aus Tabak gegenüber *NtCIF* nachgewiesen, während vac-INV's nicht durch Saccharose vor der Inhibition geschützt werden konnten (Sander *et al.*, 1996). Die Protektion der cw-INV's scheint jedoch nur im homologen System zu funktionieren (Greiner *et al.*, 1998). Eine Überexpression von *NtCIF* in Kartoffeln konnte die kälteinduzierte Hexoseakkumulation verhindern (Greiner *et al.*, 1999). Zudem wurde eine Induktion der *NtCIF*-Expression durch ABA gezeigt, was auf eine Stressregulation hinweist (Rausch und Greiner, 2004). Die Invertase-

Inhibitoren aus *Arabidopsis* zeigen ein ähnliches Inhibitionspotential wie die Orthologen aus Tabak. *AtC/VIF1* (At1g47960) wird stark in Wurzeln, seneszenten Blättern und Blüten exprimiert und inhibiert spezifisch vac-INV's. *AtC/VIF2* (At5g64620) kommt in den meisten Organen vor und inhibiert cw- und vac-INV's (Link *et al.*, 2004). Sowohl in Kartoffeln, als auch in Süßkartoffeln wurde ein konträrer Verlauf von Invertase- und Inhibitor-Aktivität gefunden. Verwundung führte zu einem Anstieg der Invertase-Aktivität bei gleichzeitigem Rückgang der Inhibitor-Konzentration. Wenige Stunden später wurde ein starker Abbau der Invertase-Aktivität beobachtet, verbunden mit einem Anstieg der Inhibitor-Konzentration. Zudem führte Ethylen in Süßkartoffeln zu einer Erhöhung der Inhibitor-Menge (Ewing *et al.*, 1977; Matsushita und Uritani, 1977). Diese Beobachtungen deuten auf eine wichtige regulatorische Funktion der Invertase-Inhibitoren auf die Invertase-Aktivität im Gewebe hin.

1.3 Mechanismen des Zucker-Signaling in Pflanzen

Neben ihrer primären Funktion als Energieträger und Ausgangsstoff für die Synthese vielfältiger Verbindungen steuern Kohlenhydrate, in ihrer Eigenschaft als Signalmoleküle, auch zentrale Prozesse im Leben der Pflanzen. Auf Grund ihrer Funktion, Saccharose in Hexosen zu spalten, sind Invertasen sowohl regulativer als auch selbst regulierter Teil eines komplexen Netzwerks. Im Gegensatz zu Saccharose-Synthasen produzieren Invertasen die doppelte Menge an freien Monosacchariden und zudem auch freie Glucose, die als Signalmolekül eine zentrale Rolle im Zucker-Signaling spielt. So ist eine hohe Hexose-Konzentration, hervorgerufen durch eine hohe cw-INV-Aktivität, wichtig für die mitotischen Vorgänge in den jungen Samen von Leguminosen und Gerste. Während der Zellstreckung und der Einlagerung der Reservestoffe wird die cw-INV zugunsten der intrazellulären Saccharose-Spaltung durch Saccharose-Synthasen reprimiert (Wobus und Weber, 1999; Wesche *et al.*, 2003). Auch die Photosynthese der Pflanzen unterliegt einer Regulation durch Kohlenhydrate. So konnte an Mais-Protoplasten und autotrophen Zellkulturen von *C. rubrum* eine Repression photosynthetisch relevanter Gene durch Saccharose sowie verschiedene Hexosen nachgewiesen werden (Sheen, 1990; Krapp *et al.*, 1993; Ehneß *et al.*, 1997). Dabei ist zu bemerken, dass auch 6-Deoxyglucose (6-DOG) zu einer Verringerung der RbcS-Transkriptmenge führte, obwohl es in der Zelle nicht phosphoryliert wird (Ehneß *et al.*, 1997). Auch eine *in situ*-Erhöhung der Hexosekonzentration durch konstitutive Überexpression einer Hefe-Invertase führte zu einem deutlichen Rückgang der Photosyntheseleistung in den transgenen Pflanzen (Sonnewald *et al.*, 1991). Neben

der Repression der Photosynthese werden PR-Gene durch erhöhte Zuckerkonzentrationen induziert (Jang und Sheen, 1994). Dies steht in direktem Zusammenhang mit einer erhöhten Invertaseexpression im infizierten Gewebe (Berger *et al.*, 2004; Bonfig *et al.*, 2006). Bereits 1996 zeigten Herbers *et al.*, dass die konstitutive Expression einer Hefeinvertase in Tabak zur Vermittlung einer systemischen Resistenz gegenüber Pathogenen führt.

Ein Einfluss von Zuckern wurde auch auf die Samenkeimung und das Keimlingswachstum nachgewiesen. So wurde gezeigt, dass sich neben Glucose auch Mannose negativ auf die Samenkeimung von *Arabidopsis* auswirkte, während Fructose und verschiedene Hexose-Analoga keinen Einfluss hatten (Pego *et al.*, 1999; Price *et al.*, 2003). Zur genauen Analyse des Zucker-Signaling in Pflanzen wurden zahlreiche Mutanten in *Arabidopsis* isoliert, die unterschiedliche phänotypische Veränderungen und eine Hyper- bzw. Hyposensitivität bezüglich verschiedener Kohlenhydrate aufwiesen (Gibson 2005). Die Identifikation zahlreicher Mutanten, die neben einem Defekt im Zucker-Signaling auch einer Veränderung in der Hormonantwort unterliegen, macht dabei die starke Verwobenheit der Signaling-Prozesse von Kohlenhydraten und Hormonen deutlich (Rolland *et al.*, 2006).

In Untersuchungen der Mutante *glucose insensitive 2 (gin2)* konnte eine zentrale Stellung des Enzyms Hexokinase 1 (HXK1) im Zucker-Signaling verifiziert werden (Abbildung 1-5a). Mit Hilfe gerichteter Mutagenese konnte dabei eine Trennung der katalytischen von der Signaling-Funktion des Enzyms nachgewiesen werden (Moore *et al.*, 2003). Bereits in vorangegangenen Untersuchungen war ein Einfluss der Hexokinase vermutet worden, da sowohl Hexosen, die kein Substrat der Hexokinase darstellen (3-O-Methylglucose (3-OMG) und 6-DOG) als auch der Einsatz des Hexokinase-Inhibitors Mannoheptulose die Glucose- bzw. Mannose-Wirkung aufhob (Jang und Sheen 1994; Pego *et al.*, 1999). Cho *et al.* (2006) identifizierten Partnerproteine, die mit HXK1 im Zellkern einen Signaling-Komplex bilden. Balasubramanian *et al.* (2007) wiesen erst kürzlich nach, dass HXK1 zudem an Mitochondrien gebunden ist und mit Actin interagiert.

Neben dem Hexokinase-vermittelten Zucker-Signaling existieren auch Hexokinase-unabhängige Regulationswege. So vermag 6-DOG die Expression von *CIN1* zu induzieren (Roitsch *et al.*, 1995). Kato-Noguchi *et al.* (2005) wiesen eine Hexokinase-unabhängige Hemmung des Wurzelwachstums von *L. sativa* durch Psicose nach. Neben einem Hexose-spezifischen Signaling beschreiben Loreti *et al.* (2000) ein Disaccharid-spezifisches Zucker-Signaling in Embryonen von Gerste. Dabei scheint eine Fructose-Einheit im Molekül für eine Repression der α -Amylase erforderlich zu

sein, während die Fructan-Akkumulation in den Blättern auch durch Trehalose induzierbar ist (Müller *et al.*, 2000).

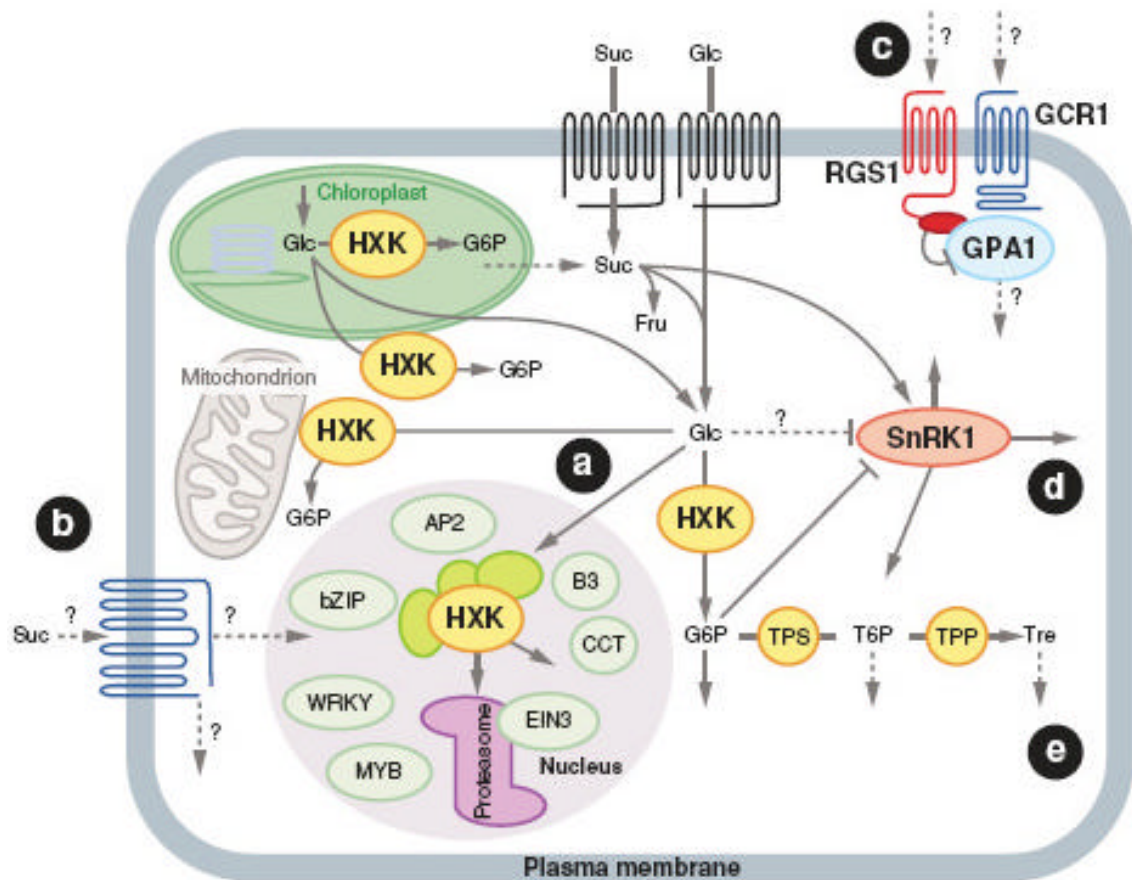


Abbildung 1-5: Modell des Zucker-Signaling in Pflanzen. Der Hexose-Sensor Hexokinase (HXK) liegt gebunden an Mitochondrien vor. Er wurde zudem im Zellkern als Teil eines Komplexes identifiziert, der die Regulation von Transkriptionsfaktoren beeinflusst (a). Disaccharide (und möglicherweise auch Monosaccharide) werden wahrscheinlich an der Plasmamembran durch Transporter-Homologe erkannt (b). Ein G-Protein-vermitteltes Signaling durch RGS1 und GPA1 ist an der Glucose-Erkennung beteiligt (c). Proteine der SnRK1-Familie spielen eine wichtige Rolle beim Zucker-Signaling durch die Regulation von Transkriptionsfaktoren (d). Trehalose dient vermutlich als wichtiger Marker für die intrazelluläre Saccharose-Konzentration (e). Verändert nach Rolland *et al.* (2006). Details siehe Text.

Für dieses Disaccharid-spezifische Signaling kommt eine neu entdeckte Klasse von Saccharosetransportern (SUT2) in Betracht (Abbildung 1-5b). So wurden in *Arabidopsis* und Tomate SUT2-Proteine entdeckt, die eine geringe Expression aufweisen und keinerlei detektierbare Transportaktivität besitzen. Als gemeinsames Merkmal weisen sie eine große cytoplasmatische Domäne auf, die eine strukturelle Ähnlichkeit mit Zucker-Sensoren aus Hefe hat (Barker *et al.*, 2000). Bei der Untersuchung dieser Proteine stellte sich heraus, dass diese Domäne nicht für eine eventuelle Transportaktivität notwendig ist (Reinders *et al.*, 2002).

In *Arabidopsis* wurde ein Protein identifiziert, das an der Zellproliferation beteiligt ist und mit dem heterotrimeren G-Protein (GPA1) interagiert (Abbildung 1-5c). Durch

Überexpressionsanalysen und *ko*-Mutanten, sowie zielgerichtete Mutagenese wurde eine Beteiligung von AtRGS1 ("*regulator of G-protein signaling*") am Hexokinase-unabhängigen Zucker-Signaling nachgewiesen (Chen *et al.*, 2003; Johnston *et al.*, 2007).

Inzwischen wurde auch eine Beteiligung von SnRK1 (*SNF1-Related Protein Kinase-1*) am Zucker-Signaling in Pflanzen dokumentiert (Abbildung 1-5d). Diese Kinasen besitzen strukturelle Ähnlichkeit zur SNF1-Familie (*Sucrose Non-Fermenting-1*) aus Hefe. Dort sind sie verantwortlich für die Derepression Glucose-reprimierter Gene. Unter anderem dient das Enzym Saccharose-Phosphat-Synthase als Substrat für SnRK1, welches durch die Phosphorylierung inaktiviert wird (Halford *et al.*, 2003). Ein Einfluss von SnRK1 auf die Regulation verschiedener Gene und eine Einflussnahme auf die pflanzliche Entwicklung wurden nachgewiesen. So führt deren antherenspezifische Inaktivierung in Gerste zu einer veränderten Pollenentwicklung und männlicher Sterilität (Zhang *et al.*, 2001). In Reis-Embryonen tritt SnRK1 zudem als Regulator des Transkriptionsfaktors *MYBS1* auf (Lu *et al.*, 2007). In dem Moos *P. patens* wurde eine Kernlokalisation verschiedener SnRK1-Proteine nachgewiesen, welches einen weiteren Hinweis auf eine Beteiligung dieser Kinasen an der direkten Genregulation darstellt (Thelander *et al.*, 2007). Neben einer zuckerabhängigen-Regulation von *MYB*-Transkriptionsfaktoren ist auch eine Beteiligung von *bZIP*-Transkriptionsfaktoren am Signaling bekannt. So fanden Rook *et al.* (1998) eine Saccharose-spezifische Repression des Transkriptionsfaktors *ATB2* in *Arabidopsis*, die durch Glucose noch verstärkt wurde. Wiese *et al.* (2005) konnten hoch konservierte Bereiche in der 5'-UTR für die Saccharose-vermittelte Repression in einer Gruppe von *bZIPs* verantwortlich machen.

Trehalose kommt in großen Mengen in Bakterien, Pilzen und Wirbellosen vor. In den meisten Pflanzen ist dieses Disaccharid jedoch nur in Spuren nachweisbar. Dennoch besitzt allein *Arabidopsis* 21 Gene des Trehalose-Metabolismus, die alle eine entwicklungs- und gewebespezifische Regulation zeigen (Grennan, 2007). Die exogene Applikation von Trehalose führt zu einer Wachstumshemmung und einer Induktion der Stärke-Synthese in Keimlingen von *Arabidopsis*, die von Saccharose aufgehoben werden kann (Wingler *et al.*, 2000). Dabei beeinflusst Trehalose die Expression des Transkriptionsfaktors *ABI4* (Ramon *et al.*, 2007). Eine Mutation der *Trehalose-Phosphat-Synthase1 (TPS1)* in *Arabidopsis* führt zu starken morphologischen Veränderungen, vor allem in meristematischen Geweben (van Dijken *et al.*, 2004) während die Überexpression von *TPS1* zu einem Glucose-insensitiven Phänotyp führt (Avonce *et al.*, 2005). Sowohl Saccharose als auch Trehalose führen zu einer Erhöhung der endogenen Trehalose-6-Phosphat (T6P)-Konzentration, welche direkt zu

einer Induktion der Stärkesynthese in Chloroplasten führt. Damit dient T6P vermutlich als Signal des Saccharose-Status im Cytosol (Paul, 2007; Abbildung 1-5e).

1.4 Pollenentwicklung und Pollenschlauchwachstum

Die Entwicklung der Pollen findet in allen blühenden Pflanzen in den Antheren statt. Neben den reproduktiven Geweben enthalten diese Pflanzenorgane zahlreiche verschiedenartige Strukturen, die primär nicht der Fortpflanzung dienen jedoch für die Entwicklung und Freisetzung der Pollenkörner verantwortlich sind (Goldberg *et al.*, 1993). Eine besondere Bedeutung kommt dabei dem Tapetum zu. Diese Zellschicht umgibt die Pollensäcke mit den darin befindlichen Mikrosporen und ist maßgeblich an der Pollenentwicklung beteiligt. Durch die Abgabe von Nährstoffen versorgt das Tapetum die sich entwickelnden, symplastisch isolierten Pollen. Für die Versorgung mit Kohlenhydraten spielt dabei Saccharose eine besondere Rolle (Clément und Audran, 1995). Die Freisetzung junger, haploider Mikrosporen aus den Tetraden erfolgt durch Sekretion einer β -1,3-Glucanase aus den Zellen des Tapetum. Dabei wird die Kallosewand abgebaut, welche die Tetraden umgibt (Steiglitz, 1977). Die dritte wichtige Funktion des Tapetum besteht in der Synthese von Bausteinen der äußeren Pollenwand, der Exine. Neben der Produktion von Sporopollenin werden, während der Degeneration des Tapetum, verschiedene Substanzen als Pollenkitt an die Exine angelagert (Mascarenhas, 1990; Blackmore *et al.*, 2007).

Die Pollenentwicklung selbst läuft in den Pollensäcken ab. Dabei bilden sich aus einer Pollenmutterzelle durch mitotische Teilungen 4 haploide Mikrosporen, die in Tetraden vorliegen und von einer Kallosewand umgeben sind. Nach Auflösung der Kallose wachsen die Mikrosporen heran und teilen sich asymmetrisch. Dabei entsteht eine große vegetative Zelle, die später den Pollenschlauch bildet, und eine kleinere generative Zelle. In vielen Pflanzenarten, wie auch in *N. tabacum*, findet eine weitere Teilung der generativen Zelle erst nach der Pollenkeimung statt, während z. B. in *A. thaliana* noch vor Abschluß der Pollenentwicklung beide generative Zellen entstehen. Die Pollenkörner bilden die aus Zellulose und Pektin bestehende innere Pollenwand (Intine). Nach der Einlagerung von Reservestoffen, wie Stärke oder Lipiden, dehydrieren die Pollenkörner (Bedinger 1992; McCormick 1993). Durch koordinierte Apoptose verschiedener Zelltypen platzen die Antheren auf und die Pollen werden freigesetzt (Wu und Cheung, 2000).

Bei der Bestäubung folgt dem Kontakt eines Pollenkorns mit der Narbe eine schnelle Rehydrierung der Pollen. Bei dieser kurzfristigen Wasserversorgung spielen

Aquaporine eine wichtige Rolle (Dixit *et al.*, 2001). Der Polarisierung der vegetativen Zelle folgt der Austritt des Pollenschlauchs aus einer Apertur, einer Öffnung innerhalb der Exine (Edlund *et al.*, 2004). Während des streng polaren Wachstums werden Wachstumsraten von bis zu 1 cm/h erreicht (Barnabas und Fridvalszky, 1984) und bereits 7 h nach der Bestäubung sind die Eizellen von *A. thaliana* befruchtet (Faure *et al.*, 2002). Der Pollenschlauch wächst dabei ausschließlich an seiner Spitze über die Neusynthese einer Pektin-Zellwand. Cellulosen und Hemicellulosen werden erst später gebildet (Krichevsky *et al.*, 2007). Die beiden generativen und der vegetative Kern, sowie das Cytoplasma, werden dabei stets an der Spitze des Pollenschlauchs mitgeführt. In regelmäßigen Abständen werden die entleerten Bereiche durch Kallosepfropfen verschlossen. Entlang interzellulärer Bereiche wachsen die Pollenschläuche unter Zuhilfenahme verschiedener sekretierter Enzyme in die Narbe und durch das Durchlassgewebe zu den Ovarien (Edlund *et al.*, 2004). Dabei durchdringen sie die Micropyle und wachsen in eine degenerierende Synergide. Durch eine Interaktion mit der FERONIA-Kinase endet das Wachstum. Die Pollenschläuche platzen und geben die beiden Spermazellen frei. Gleichzeitig werden Hemmstoffe freigesetzt, die das Eindringen weiterer Pollenschläuche verhindern (Escobar-Restrepo *et al.*, 2007). Die freigesetzten Spermazellen werden zur Eizelle und zur Zentralzelle transportiert, die nach der Fusion die Zygote und das Endosperm bilden (Weterings und Russell, 2004).

1.5 Zielsetzung dieser Arbeit

Neben der Produktion von Hybridsaatgut gewinnt die Generierung männlich steriler Pflanzen im Hinblick auf die Erhöhung der Biosicherheit transgener Pflanzen immer mehr an Bedeutung. Abgesehen von einer aufwändigen manuellen Emaskulierung der Pflanzen kann bei einigen Arten die genische (GMS), bzw. cytoplasmatische männliche Sterilität (CMS) verwendet werden. Bei einer Vielzahl wichtiger Kulturpflanzen sind GMS- und CMS-Systeme jedoch nicht bekannt oder nicht nutzbar. Über verschiedene biotechnologische Verfahren kann jedoch die männliche Fertilität beeinflusst werden. So zeigten Goetz *et al.* (2001), dass die antherenspezifische cw-INV Nin88 in Tabak für die Versorgung der Pollen mit Kohlenhydraten eine wichtige Rolle spielt. Eine Verringerung dieser Invertaseaktivität führt zu einer Beeinträchtigung der Pollenentwicklung und damit zu männlich sterilen Pflanzen. Dies kann durch Antisense-Repression der Invertase oder durch Expression eines proteinogenen Invertase-Inhibitors erreicht werden. Da die Pollenproduktion in allen höheren Pflanzen

den gleichen Prozessen unterworfen ist, stellt dieser Eingriff in die Entwicklung der Pollen ein universelles Werkzeug zur Herstellung männlich steriler Pflanzen dar. In diesem Zusammenhang galt es zu klären, ob bereits erfolgreich in Tabak etablierte Promotoren und Konstrukte für verschiedene Pflanzenarten verwendet werden können. Im Rahmen dieser Arbeit sollten deshalb spezifische Konstrukte für *Arabidopsis thaliana* und *Nicotiana tabacum* im jeweiligen homo- und heterologen System untersucht und damit die Übertragbarkeit der antherenspezifischen Promotoren auf andere Pflanzenarten getestet werden.

Gleichzeitig sollte die bislang unbekannt saure Invertasenfamilie der landwirtschaftlich relevanten Nutzpflanze *Brassica napus* identifiziert werden. Über die Klonierung der Invertasesequenzen und anschließende Analyse der Expressionsprofile sollte die pollenspezifische, orthologe cw-INV zu *Nin88* (Tabak) aus Raps identifiziert werden, um diese Invertasensequenz für die Erzeugung männlich steriler Rapspflanzen nutzen zu können.

Neben der Pollenbildung stellen auch die Pollenkeimung und das Pollenschlauchwachstum einen entscheidenden Prozess in der Reproduktion der Pflanzen dar. Beide Vorgänge sind dabei unabhängig voneinander, da der Keimungsvorgang vom internen Kohlenstoffspeicher der Pollen unterstützt wird, während das Pollenschlauchwachstum als heterotropher Prozess auf extrazelluläre Energiequellen angewiesen ist. Für beide Vorgänge dienen externe Kohlenhydrate nicht nur zur Energiegewinnung, sondern wirken auch als Signalsubstanzen. Im Rahmen dieser Arbeit sollte zum einen der Einfluss verschiedener Kohlenhydrate auf die Keimung und das Pollenschlauchwachstum von *Arabidopsis*- und Tabakpollen untersucht werden, um Prozesse des Zucker-Signaling in Pflanzenzellen aufzuklären. Zum anderen sollte anhand der Analyse transgener Tabakpflanzen untersucht werden, ob durch Invertasen generierte Zuckersignale auch an der Pollenschlauchleitung durch das Griffelgewebe beteiligt sind. Zu diesem Zweck sollten griffelspezifische Invertasen identifiziert und gezielt inhibiert werden, um die Generierung potentieller Zuckersignale durch Invertasen aufzuklären.

2 Ergebnisse

2.1 Einfluss der extrazellulären Invertase auf Pollenentwicklung und Pollenschlauchwachstum in *Arabidopsis thaliana*

2.1.1 Herstellung der Konstrukte und Erzeugung der transgenen Pflanzen

Die Herstellung der Konstrukte für die Transformation von *A. thaliana* und *N. tabacum* erfolgte nach den gängigen molekularbiologischen Verfahren. Die verwendeten DNA-Sequenzen wurden dafür entweder aus DNA oder cDNA amplifiziert bzw. aus bereits vorhandenen Plasmiden mittels Restriktions-enzymen entfernt und in die entsprechenden Vektoren ligiert. Nach Fertigstellung der binären Vektoren erfolgte eine Plasmid-Midipräparation und die anschließende Transformation der Vektoren in *Agrobacterium tumefaciens* 'LBA4404'.

Die Konstrukte (Tabelle 2-1) wurden mittels Agrobakterien-vermitteltem Gentransfer in *A. thaliana* (4.2.2.1) bzw. *N. tabacum* (4.2.2.2) transformiert. Die putativ transgenen Pflanzen wurden nach Protokoll selektiert und mittels PCR-Analyse identifiziert.

2.1.2 Aktivitätsvergleich der antheren- und pollenspezifischen Promotoren *AtcwINV2* und *Nin88* in *Arabidopsis* und *N. tabacum* durch *GUS*-Reporterlinien

Im Hinblick auf die praktische Einsetzbarkeit der gentechnologisch erzeugten männlichen Sterilität als wichtiges Werkzeug zur Erhöhung der Biosicherheit transgener Pflanzen ist es wichtig zu wissen, ob die bereits klonierten und als gewebespezifisch identifizierten Promotoren für den Einsatz in anderen Pflanzenarten und –familien genutzt werden können. Somit würde das meist sehr aufwändige Klonieren der entsprechenden Promotoren aus den zu transformierenden Pflanzen entfallen. Im Rahmen der folgenden Experimente sollte deshalb untersucht werden, ob die antheren- und pollenspezifischen Promotoren *AtcwINV2* (aus *A. thaliana*) und *Nin88* (aus *N. tabacum*) sowohl nach der Transformation in *Arabidopsis* als auch in *N. tabacum* weiterhin die gleiche Spezifität und Aktivität aufweisen, wie in der Ausgangspflanze.

Tabelle 2-1: Übersicht über die generierten Konstrukte und transgenen Pflanzenlinien zur antheren- und pollenspezifischen Expression.

Transgene Pflanzenlinie	Konstrukt	Plasmid	Nachgewiesen durch Primer	Größe des Amplifikats	Anzahl transgener Pflanzen	Klonierung durch Primer	Vektoren siehe
AT30	<i>Nin88::Nin88-AS*</i>	pNPII2	NPS13 RTN1	871 bp	70	-	6.1.1
AT31	<i>Nin88::NtC/F*</i>	pNPAN6	NPS13 NPK18	244 bp	7	-	6.1.1
AT32/2	<i>Nin88::GUS*</i>	pNPG3	NPS13 Gus-R	293 bp	6	-	6.1.1
NT19*, NT40*	<i>Nin88::GUS*</i>	pNPG3	-	-	-	-	6.1.1
AT33/2	<i>Atcw/INV2::AtC/VIF2+6AA</i>	pJHAT2ATCI	Ath2-P2-F Atcwinh-2 ----- Ath2-P2-F pbi101-R	780bp ----- 816 bp	19	-	6.1.4
AT34, AT34/2	<i>Atcw/INV2::Atcw/INV2-As</i>	pJHAT2AS	Ath2-P2-F pBI101-R ----- nptII-F nptII-R	1501 bp ----- 796 bp	57	At2CW-Ex3-F At2CW-Ex3-R	6.1.3
AT37	<i>Atcw/INV2::GUS</i>	pJHAT2G	Ath2-P2-F Gus-R	455 bp	12	Ath2CW-Prom-F Ath2CW-Prom-R	6.1.2
AT40, AT40/2	<i>Atcw/INV2::AtC/VIF2</i>	pJHAT2ATCI-S	Ath2-P2-F Atcwinh-2 ----- Ath2-P2-F pbi101-R	780 bp ----- 816 bp	9	Atcwinh-1 Atcwinh-2neu	6.1.4
AT41, AT41/2	<i>Atcw/INV2::NtC/F</i>	pJHAT2NTCI	Ath2-P2-F Ntcwinh-R	719 bp	19	Ntcwinh-F Ntcwinh-R	6.1.5

*Konstrukte und transgene Pflanzen von Goetz, 2001.

Der binäre Vektor zur Erzeugung transgener Pflanzen mit dem Konstrukt *Nin88::GUS* (pNPG3) wurde bereits von Goetz (2001) hergestellt. *In silico*-Expressionsanalysen aller cw-INV's aus *Arabidopsis* mit Hilfe des Tools "Genevestigator" (Zimmermann *et al.*, 2005) identifizierten *AtcwINV2* (At3g52600) als Ortholog zur antheren- und pollenspezifischen Invertase *Nin88* aus Tabak (Abbildung 6-1). Anhand der verfügbaren Sequenzdaten aus *A. thaliana* (Rhee *et al.*, 2003) wurden die Primer Ath2CW-Prom-F und Ath2CW-Prom-R abgeleitet, um eine 1160 bp große DNA-Sequenz zu amplifizieren, die der CDS der *AtcwINV2* in 5'-Richtung vorgelagert ist und die Promotorsequenz enthält. Zur Erzeugung des Reporterkonstrukts *AtcwINV2::GUS* wurde diese Sequenz in den binären Vektor pBI101 in 5'-Position des *GUS*-Gens kloniert.

2.1.2.1 Analyse der transgenen Reporterlinien

Zur genauen Bestimmung der Kopienanzahl der übertragenen Konstrukte (*Nin88::GUS* und *AtcwINV2::GUS*) im Genom der Pflanzen wurden Southern-Analysen durchgeführt (4.3.12). Je 15 µg genomischer DNA wurden mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI, *Eco*RI und *Hind*III hydrolysiert (AT32/2 zusätzlich mit *Ap*al). Nach Auftrennung der Fragmente im Agarosegel wurde die DNA auf eine Nylonmembran übertragen und mit ³²P-markierter Sonden-DNA (*GUS*-Gen) hybridisiert. 20 Stunden nach Auflegen der Membranen auf einen Screen wurden die Ergebnisse ausgewertet (Abbildung 2-1). Parallel dazu wurden die Samen dieser Primärtransformanten, Generation T2, erneut steril auf Selektionsmedium ausgelegt, um Spaltungsanalysen durchzuführen. Auf diese Weise konnten von den *Nin88*-Reporterlinien 2 Pflanzen und von den *AtcwINV2*-Reporterlinien insgesamt 4 Pflanzen mit nur 1 Insertionsort im Genom nachgewiesen werden (Tabelle 2-2).

Während der Blüte der Pflanzen wurden GUS-Färbungen an Blüten aller transgenen Linien der T1-Generation durchgeführt. Dabei zeigte sich eine gewebespezifische GUS-Färbung der Antheren. Die Intensität der Färbung variierte je nach Linie. Aufgrund visueller Beurteilung ließ sich feststellen, dass die Farbstärke mit der Kopienzahl des ins Genom inserierten Reporter-konstrukts korrelierte (Abbildung 2-2). Insgesamt fiel die Farbintensität der GUS-Färbung bei den *Nin88*-Reporterpflanzen deutlich geringer aus als bei den *AtcwINV2*-Reporterpflanzen. So zeigte die single-copy Linie AT32/2-2 nur eine sehr schwache Färbung im Bereich des Übergangs Filament-Anthere. Im Gegensatz dazu konnte bei der single-copy Linie AT37-13 eine starke Färbung der gesamten Anthere und der Pollenkörner beobachtet werden (Abbildung 2-2 A und D).

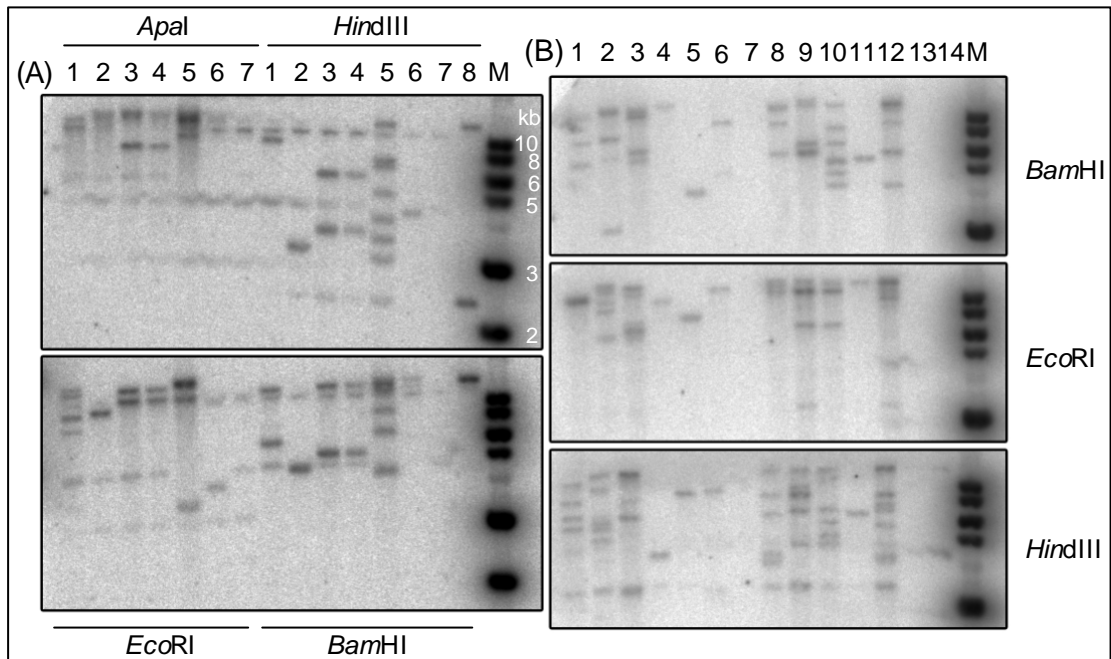


Abbildung 2-1: Southern-Analysen verschiedener Reporterlinien. Je 15 µg DNA wurden mit den angegebenen Enzymen hydrolysiert. (A) Reporterkonstrukt *Nin88::GUS*. AT32/2-1 (1), AT32/2-2 (2), AT32/2-3 (3), AT32/2-4 (4), AT32/2-5 (5), AT32/2-6 (6), Col-0 (7) und 5 pg pNPG3 (8). (B) Reporterkonstrukt *AtcwlInv2::GUS*. AT37-1 (1), AT37-2 (2), AT37-3 (3), AT37-4 (4), AT37-5 (5), AT37-7 (6), AT37-8(7), AT37-9 (8), AT37-10 (9), AT37-11 (10), AT37-13 (11), AT37-14 (12), Col-0 (13) und 5 pg pJHAT2G (14). DNA-Marker (M). Die Expositionszeit betrug 20 Stunden.

Tabelle 2-2: Ermittelte Kopienanzahl der übertragenen Reporterkonstrukte in den transgenen Linien AT32/2 und AT37 durch Southern-Analyse der Primärtransformanten (T1) bzw. Spaltungsanalyse der T2-Generation.

Linie	χ^2 (Spaltungshypothese)	Bandenanzahl Southern	Linie	χ^2 (Spaltungshypothese)	Bandenanzahl Southern
AT32/2-1	0,17 (3:1)	4	AT37-1	nd	4
AT32/2-2	nd	1	AT37-2	0,01 (15:1)	4
AT32/2-3	0 (1:0, T3)	2	AT37-3	nd	3
AT32/2-4	0,01 (15:1, T3)	2	AT37-4	0,8 (3:1)	1
AT32/2-5	4,9 (3:1, T3)	mind. 3	AT37-5	0,4 (3:1)	1
AT32/2-6	67,4 (3:1)	1	AT37-7	nd	1
			AT37-9	nd	3
			AT37-10	0,2 (3:1)	3
			AT37-11	6,7 (15:1)	6
			AT37-13	0,4 (3:1)	1
			AT37-14	nd	mind. 4

Eine höhere Kopienzahl führte bei den *Nin88*-Reporterpflanzen zu einer gesamten Färbung der Anthere, einschließlich der Pollenkörner, jedoch konnten auch zahlreiche schwach gefärbte Pollenkörner nachgewiesen werden. Dies deutet darauf hin, dass der antheren- und pollenspezifische Promotor *Nin88* aus *N. tabacum* in *A. thaliana* nicht in vergleichbarer Stärke exprimiert wird.

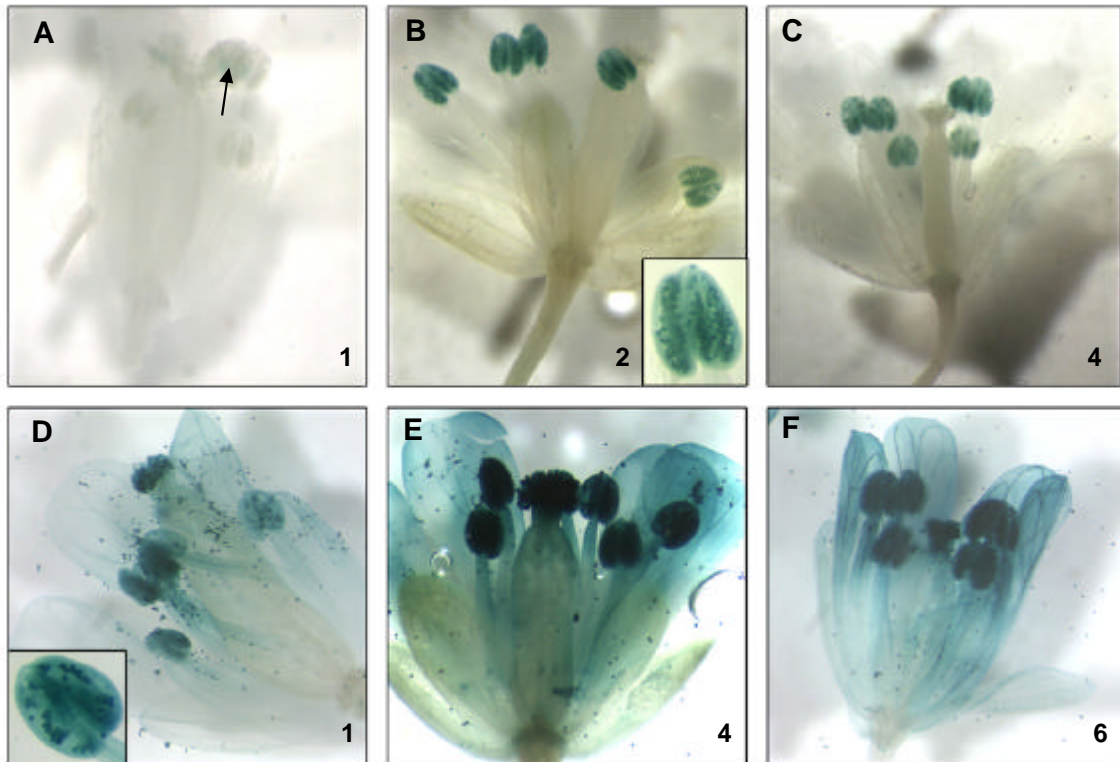


Abbildung 2-2: GUS-Färbung von *Arabidopsis*-Blüten verschiedener Reporterlinien. AT32/2-2 (A), AT32/2-4 (B), AT32/2-1 (C), AT37-13 (D), AT37-2 (E), AT37-11 (F). Die Zahlen entsprechen der Kopienzahl des Reporterkonstrukts im Genom der Pflanze. Der Pfeil in (A) weist auf die schwache GUS-Färbung in der Anthere hin.

Zur genaueren Untersuchung der Pollenspezifität der beiden Promotoren in *Arabidopsis* wurde die GUS-Aktivität in den Pollen der einzelnen Reporterlinien histologisch untersucht. Dazu wurden Pollen auf Pollenkeimungsmedium aufgebracht, das neben 440 mM Saccharose auch X-Gluc enthält. Diese Pollen wurden über Nacht bei 26 °C im Dunkeln inkubiert.

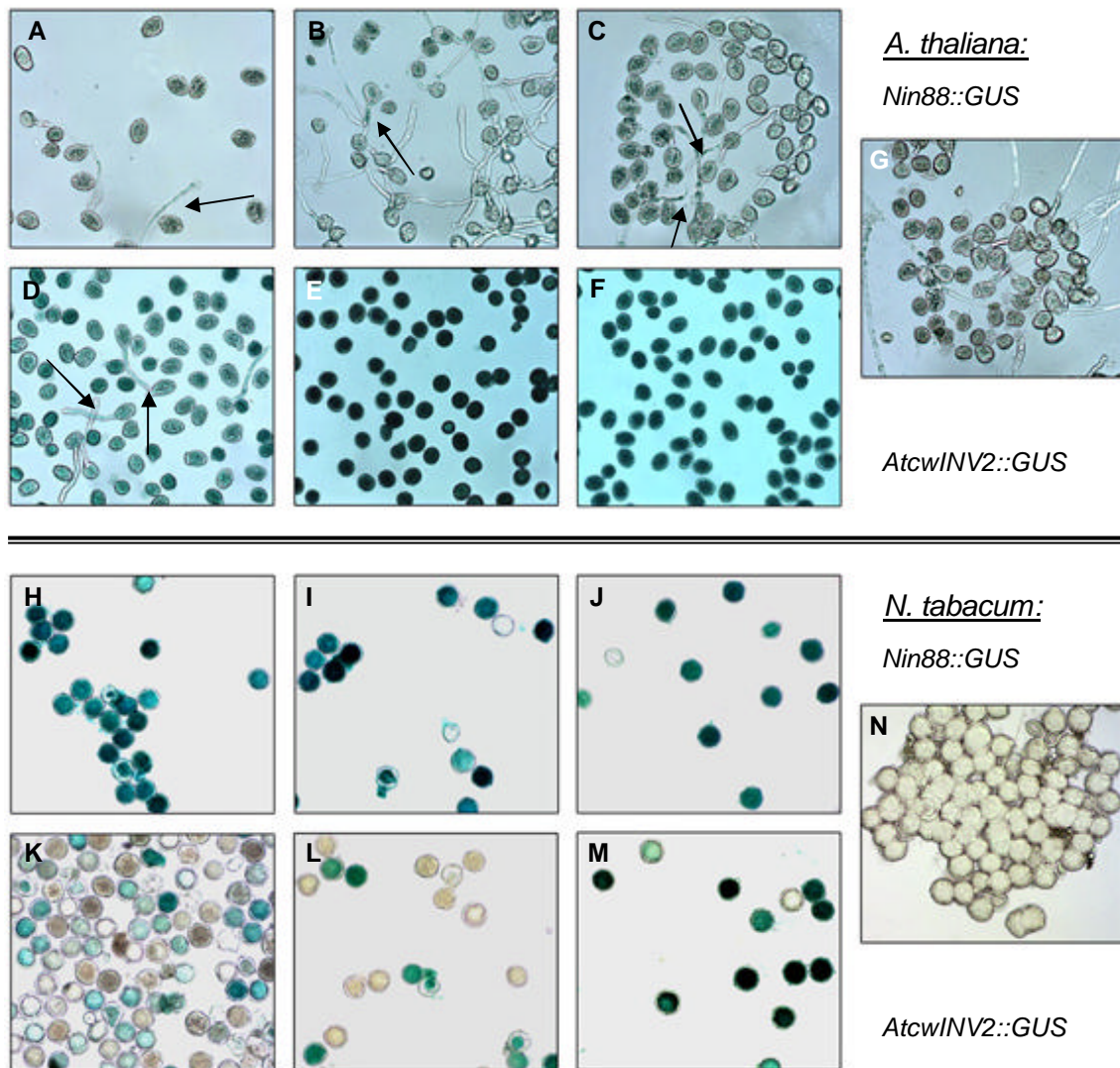


Abbildung 2-3: GUS-Färbung von Pollen verschiedener *GUS*-Reporterlinien. Die GUS-Färbung der Pollen von *A. thaliana* (A – G) wurde auf Pollenkeimungsmedium mit X-Gluc durchgeführt, während die Pollen von *N. tabacum* (H – N) in GUS-Färbelösung inkubiert wurden. AT32/2-2 (A), AT32/2-4 (B), AT32/2-1 (C), AT37-13 (D), AT37-2 (E), AT37-11 (F), Col-0 (G). NT19-10-5 (H), NT40-13-1 (I), NT40-1-2 (J), NT123-2-38 (K), NT123-2-25 (L), NT123-2-18 (M), 'SR1' (N). Die Pfeile markieren GUS-Färbung in den Pollenschläuchen.

Bei der Auswertung der Experimente zeigte sich, wie bereits bei der Färbung ganzer Blüten, eine deutlich geringere *GUS*-Expression in den Pollen bzw. Pollenschläuchen der *Nin88*-Reporterpflanzen in *Arabidopsis* (Abbildung 2-3 A – C). In den Pollen und den Pollenschläuchen aller AT32/2-Pflanzen, unabhängig von der Kopienanzahl der Reporterstrukture im Genom, konnte nur eine sehr schwache *GUS*-Aktivität nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu wurde eine Abhängigkeit der Farbintensität in den Pollen der *AtcwINV2*-Reporterpflanzen nachgewiesen. So nahm die Anzahl der stark gefärbten Pollen mit der Kopienzahl im Genom zu. Während die single-copy Linie AT37-13 unterschiedlich intensiv gefärbte Pollen aufwies, zeigten die multi-copy Linien ausschließlich stark gefärbte Pollen (Abbildung 2-3 D – F). Im Gegensatz zur Kontrolle, mit normal ausgeprägter Pollenkeimung, konnte auf Medium mit X-Gluc die Ausbildung

von Pollenschläuchen nur bei schwach gefärbten Pollen beobachtet werden (Abbildung 2-3 A – D und G). Alle Pollen mit sehr starker *GUS*-Expression konnten auf diesem Medium keine Pollenschläuche ausbilden, im Gegensatz zu Wildtyp-Pollen, die auch auf X-Gluc-haltigem Medium Pollenschläuche entwickelten.

Die quantitative Analyse der *GUS*-Aktivität ausgewählter Reporterlinien wies ebenfalls nach, dass *AtcwINV2* in den Blüten von *Arabidopsis* zu einer mehr als 100-fach stärkeren *GUS*-Aktivität führt, im Vergleich zum Tabak-Promotor *Nin88* (Abbildung 2-4). Ein tendenzieller Zusammenhang zwischen der Kopienzahl des übertragenen Konstrukts und der *GUS*-Aktivität wurde zudem beobachtet.

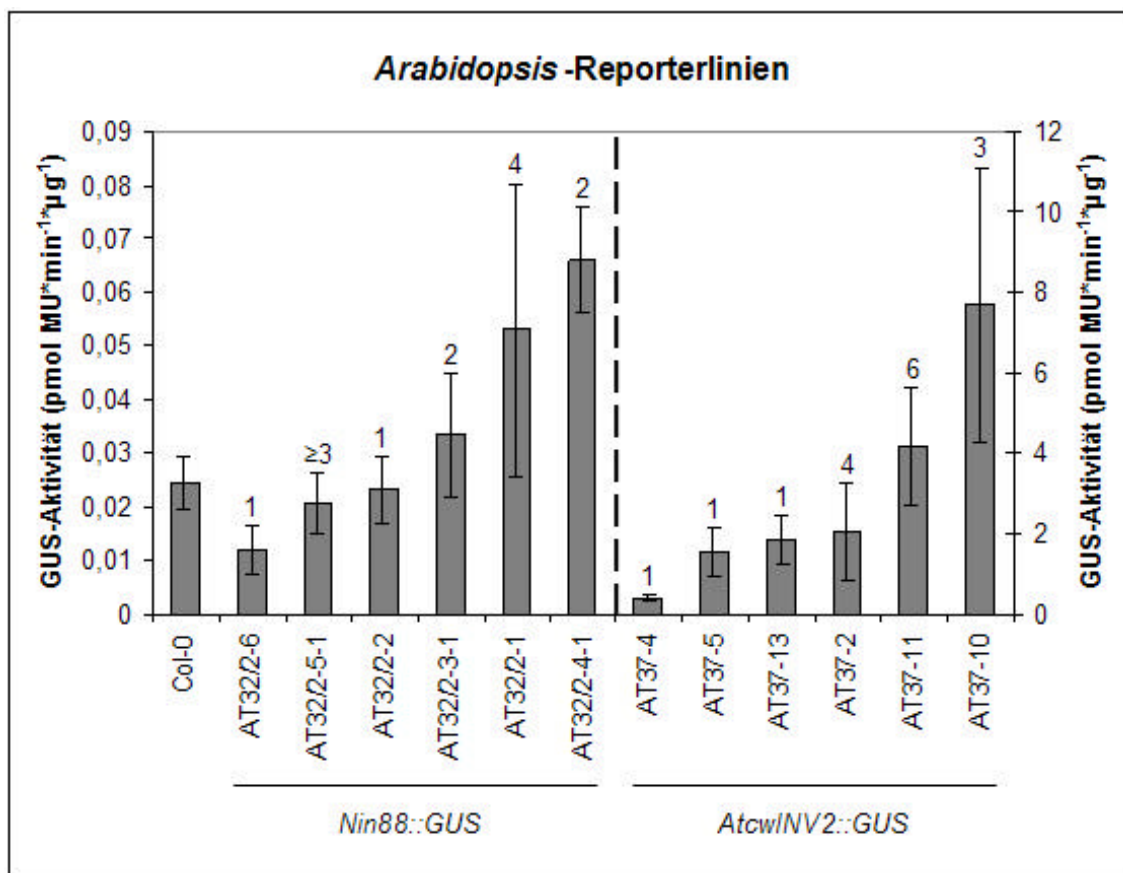


Abbildung 2-4: Fluorometrische Analyse der *GUS*-Expression in Blüten der *Arabidopsis*-Reporterlinien AT32 (*Nin88::GUS*) und AT37 (*AtcwINV2::GUS*). Die hochgestellten Zahlen stellen die nach Southern-Analysen ermittelte Kopienanzahl der transformierten Konstrukte in den untersuchten Pflanzen dar.

Eine Überprüfung der Expressionsmuster von *AtcwINV2::GUS* und *Nin88::GUS* in *N. tabacum* zeigte, dass wiederum der artfremde Promotor zu deutlich schwächerer Expression führt, hier also *AtcwINV2* aus *Arabidopsis*. So zeigten die Pollen der meisten Pflanzen der Reporterlinie NT123 (*AtcwINV2::GUS*) eine deutlich schwächere *GUS*-Färbung (Abbildung 2-3 K – M), im Vergleich zu Pollen der Linien NT19 und NT40 (*Nin88::GUS*; Abbildung 2-3 H – J). Es wurde außerdem, ähnlich zu den

untersuchten Pollen von *Arabidopsis*, eine unterschiedlich starke GUS-Färbung der einzelnen Pollen einer Pflanze beobachtet. Dies fiel besonders bei den schwächer gefärbten Pollen der Linien NT123 auf (Abbildung 2-3 K – M). Die fluorimetrische Analyse der GUS-Aktivität ausgewählter Tabak-Reporterlinien bestätigte eine bis zu 50-fach schwächere GUS-Aktivität in der Mehrheit der untersuchten NT123-Linien, während in einzelnen Pflanzen eine Aktivität vergleichbar zu Pollen der Linien NT19 bzw. NT40 nachgewiesen wurde (Abbildung 2-5).

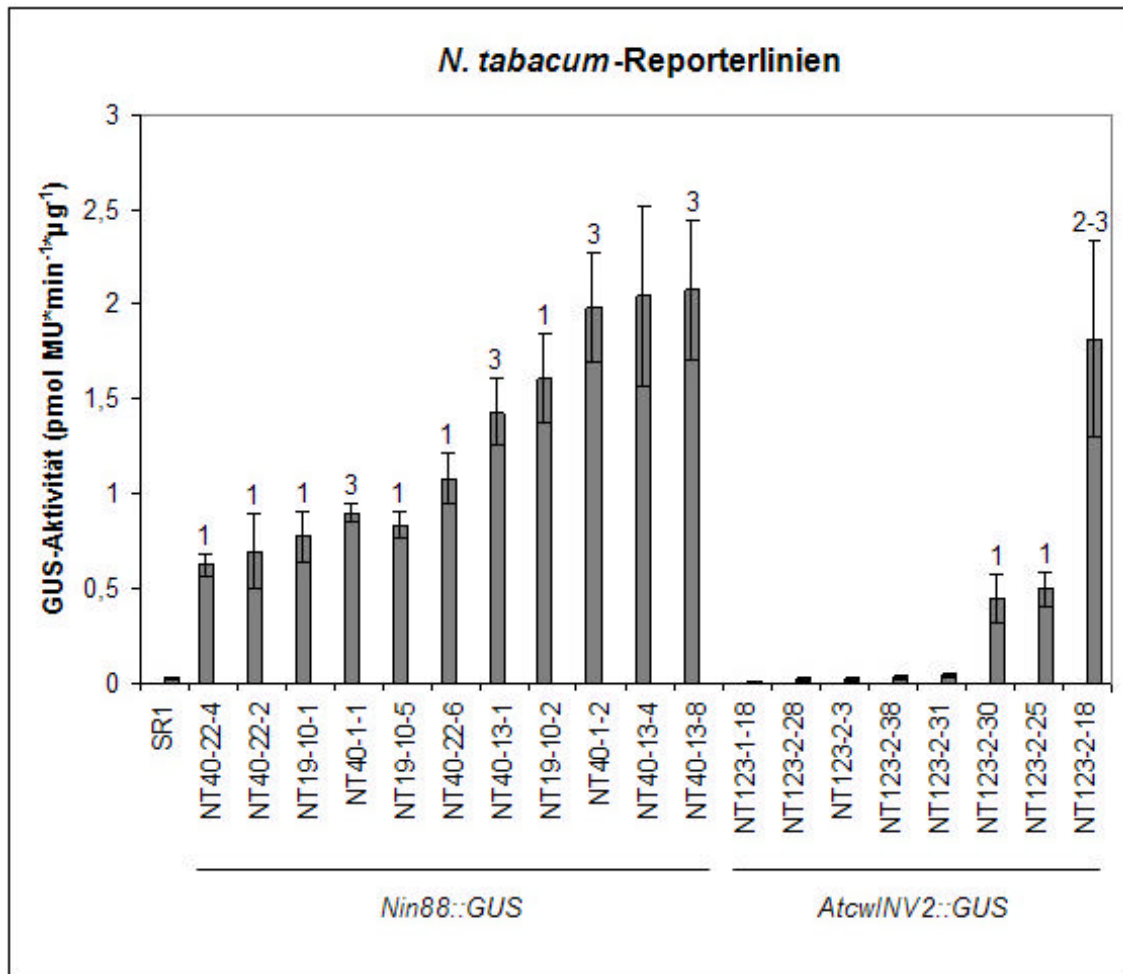


Abbildung 2-5: Fluorimetrische Analyse der GUS-Aktivität in Pollen der *N. tabacum*-Reporterlinien NT19/NT40 (*Nin88::GUS*) und NT123 (*AtcwINV2::GUS*). Die hochgestellten Zahlen stellen die nach Southern-Analysen ermittelte Kopienanzahl der transformierten Konstrukte in den untersuchten Pflanzen dar.

Um zu überprüfen, ob sich die Expression der β -Glucuronidase in den Antheren und Pollen auf die Fertilität der Pollen auswirkt, wurden Pollenkeimungstests an zahlreichen *Arabidopsis*-Reporterpflanzen der T2-Generation durchgeführt (4.4.2). Die Pollenkeimungsfähigkeit unterschied sich bei dem Großteil der untersuchten Reporterlinien nicht vom Wildtyp (Abbildung 2-6). Lediglich bei den Linien AT32/2-2, AT32/2-4, AT32/2-5, AT37-1 und AT37-9 konnte eine verringerte Pollenkeimungsaktivität

nachgewiesen werden, wobei mit 34 % und 25 % nur die Linien AT32/2-2 bzw. AT32/2-5 deutlich vom Anteil keimfähiger Pollen des Wildtyps abwichen. Im Anteil deformierter Pollen unterschied sich der größte Teil der untersuchten Reporterlinien ebenfalls nicht von Col-0. Die Linien AT32/2-5, AT37-3 und AT37-11 wichen mit 34 %, 16% bzw. 13 % deutlich vom Wildtypwert (1%) ab.

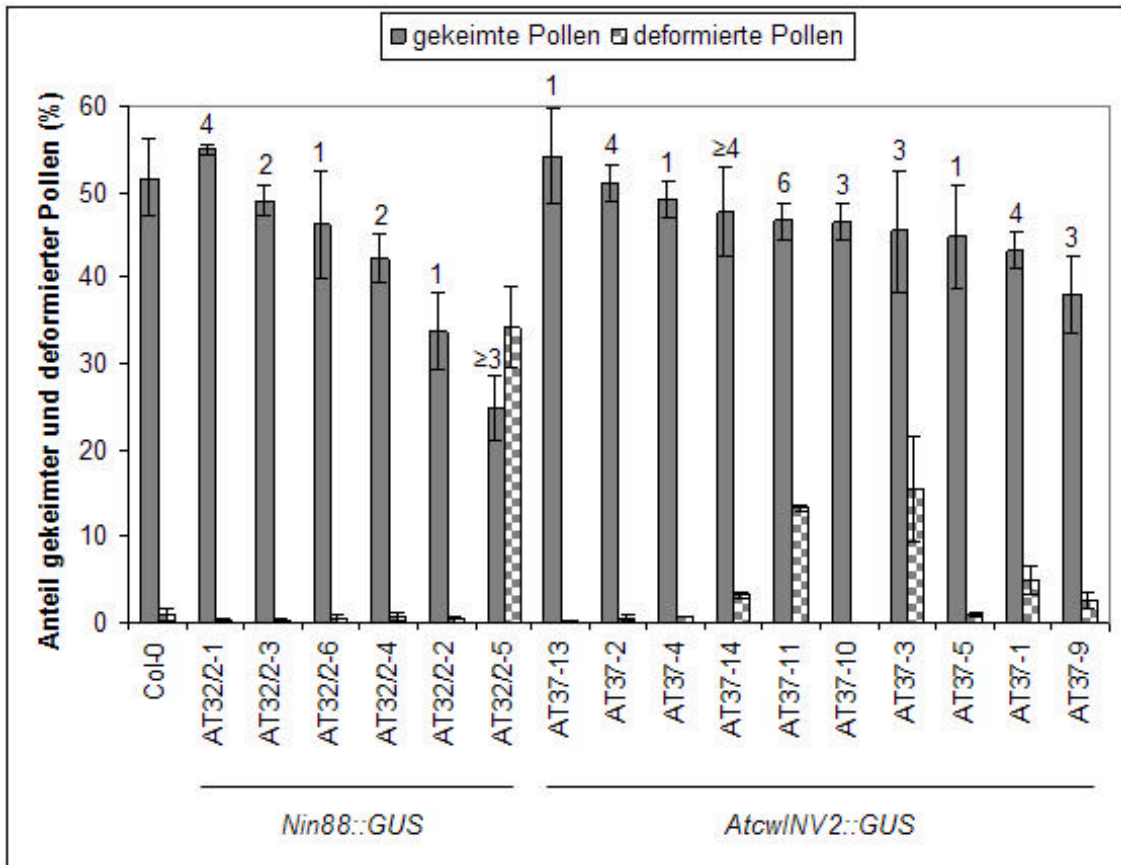


Abbildung 2-6: Anteil gekeimter Pollen verschiedener *Arabidopsis*-Reporterlinien (T2-Generation) sowie Anteil an degenerierten Pollen an der Gesamtpollenzahl in Prozent. Die hochgestellten Zahlen stellen die nach Southern-Analysen ermittelte Kopienanzahl der transformierten Konstrukte *Nin88::GUS* (AT32/2) bzw. *AtcwINV2::GUS* (AT37) in Pflanzen der Generation T1 der jeweiligen Linie dar.

2.1.3 Beeinflussung der Invertaseaktivität unter Verwendung des Promotors *Nin88* (aus *N. tabacum*) in *Arabidopsis*

Neben der Übertragbarkeit von antherenspezifischen Promotoren auf andere Pflanzenarten (2.1.2) sollte auch die Übertragbarkeit von bereits erfolgreich an Tabak und Tomate getesteten Konstrukten auf *A. thaliana* untersucht werden. Zur Reduzierung der Invertase-Aktivität in den Antheren und Pollen wurden zwei verschiedene Strategien verfolgt: Zur spezifischen Herabsetzung der *AtcwINV2*-Aktivität wurde das Antisense-Konstrukt *Nin88::Nin88-Antisense* (Goetz, 2001) eingesetzt. In

der Linie AT30 (Tabelle 2-1) sollte durch Nutzung der RNA-Interferenz spezifisch das Transkript der extrazellulären Invertase *AtcwINV2* abgebaut, und auf diesem Wege die Aktivität der Invertase posttranskriptionell verringert werden.

Über einen zweiten Weg sollte die Invertase-Aktivität gewebespezifisch posttranslational vermindert werden. Zu diesem Zweck wurde unter Kontrolle des *Nin88*-Promotors der Invertase-Inhibitor *NtCIF* aus *N. tabacum* exprimiert (*Nin88::NtCIF*; Goetz, 2001). Durch Analyse der erzeugten transgenen Linie AT31 (Tabelle 2-1) sollte überprüft werden, welche dieser beiden Strategien zu einer effektiveren Reduktion der Invertase-Aktivität und damit zu männlich sterilen Pflanzen führt. Diese Kenntnisse sind im Hinblick auf eine praktische Anwendung des Systems auf andere Pflanzenarten von besonderer Wichtigkeit.

2.1.3.1 Analyse der *Nin88::Nin88-Antisense*-exprimierenden *Arabidopsis*-Pflanzen

Die identifizierten Pflanzen wurden während der Blütezeit, vor detaillierten Pollenkeimungsexperimenten, einem Vorscreening unterzogen. Dabei wurde die Schoten- und Samenbildung der einzelnen Pflanzen beurteilt, um Rückschlüsse auf die Fertilität der Pollen ziehen zu können. Auf diese Weise sollten potentiell sterile Pflanzen zunächst vermehrt werden und die Zahl der zu untersuchenden Pflanzen minimiert werden. Unter den 70 transgenen Pflanzen wurde keine einzige Pflanze gefunden, die eine deutliche Reduktion des Samenansatzes zeigte. Aus diesem Grund wurden die Linien AT30-8, AT30-32 und AT30-77 als repräsentative Pflanzen ausgewählt und zu weiteren Analysen herangezogen. Nach der Gewinnung der Samen wurden diese Linien auf MS-Medium mit Kanamycin ausgesät und ca. 2 Wochen nach Beginn der Selektion pikiert und unter Kurztag weiterkultiviert. Die Ermittlung der Spaltungsverhältnisse ergab, dass diese Pflanzen mehrfache Insertionen des übertragenen Konstrukts im Genom enthielten. Zur genauen Bestimmung der Kopienzahl im Genom wurden Southern-Analysen (4.3.12) durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde DNA dieser Linien (T2-Generation) mit den Restriktionsenzymen *EcoRI*, *HindIII* und *ApaI* behandelt. Nach Auftrennung der Fragmente im Agarosegel und Übertragung der DNA auf eine Nylonmembran wurde diese mit ³²P-markierter Sonden-DNA (*Nin88*) hybridisiert und auf einem Screen bis zu 3 Tage exponiert. Auch nach 3tägiger Exposition konnte kein Signal detektiert werden. Möglicherweise war die DNA nicht korrekt an die Membran fixiert, da auch die verwendete DNA-Größenstandart kein Signal zeigte. Das Experiment konnte aufgrund mangelnder DNA nicht wiederholt werden.

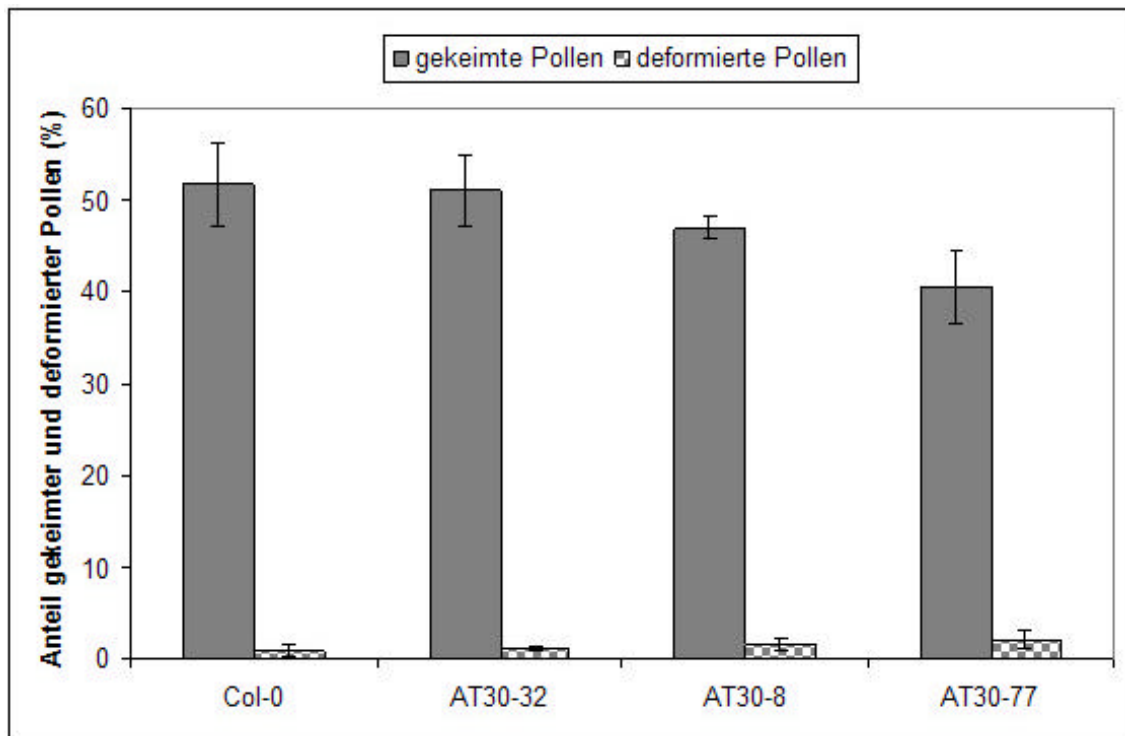


Abbildung 2-7: Anteil gekeimter Pollen verschiedener transgener Linien mit dem Konstrukt *Nin88::Nin88-Antisense* (T2-Generation) sowie Anteil degenerierter Pollen an der Gesamtpollenzahl in Prozent.

Mit dem Einsetzen der Blüte wurden Pollenkeimungsanalysen durchgeführt. Als Kohlenhydratquelle diente 440 mM Saccharose. Um eine ausreichende Menge Pollen aus Blüten der gleichen Altersstufe jeder Linie untersuchen zu können, wurden die Blüten aus den Einzelpflanzen jeder Linie gepoolt. Die Pollenkeimungsfähigkeit und der Anteil an deformierten Pollen wurden in mindestens 3 unabhängigen Versuchen bestimmt. In Abbildung 2-7 ist der prozentuale Anteil an gekeimten Pollen im Vergleich zum Wildtyp dargestellt. In den Versuchen zeigte sich, dass die Pollenkeimungsfähigkeit nur geringfügig beeinflusst war. Während sich der Anteil gekeimter Pollen der Linien AT30-8 und AT30-32 nicht von Wildtyp-Pollen unterschied, zeigten Pollen der Linie AT30-77 mit 40,5 % einen geringfügig kleineren Anteil keimfähiger Pollen als Col-0. Der Anteil deformierter Pollen war in allen untersuchten Linien sehr gering. Deren Anzahl unterschied sich nicht von der Kontrolle, jedoch zeigte sich die Tendenz einer Zunahme an deformierten Pollen bei einer Abnahme der Pollenkeimungsfähigkeit. Hinsichtlich der Schotenbildung konnte ebenfalls kein Unterschied zu Col-0 festgestellt werden (Abbildung 2-8).

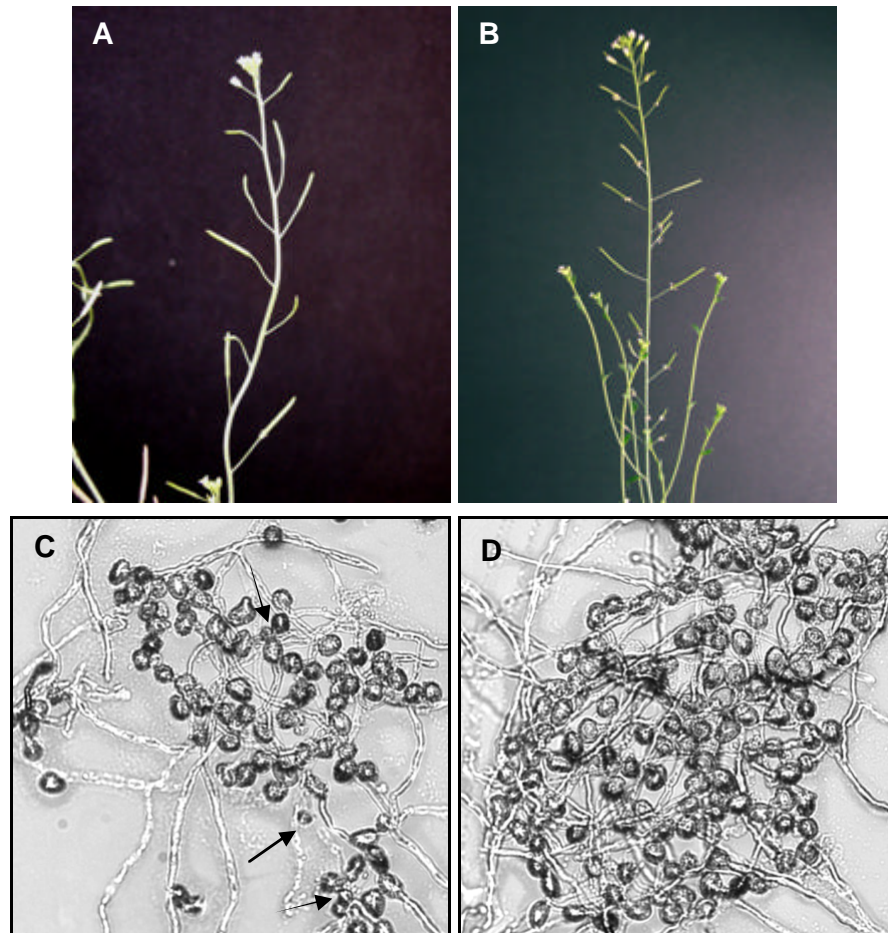


Abbildung 2-8: Vergleich von Schotenbildung (A+B) und Pollenkeimung (C+D) der Linie AT30-77 (A+C) im Vergleich zu Col-0 (B+D). Sowohl Schotenbildung als auch die Pollenkeimungsrate unterschieden sich nicht. Mit einem Pfeil sind deformierte Pollen markiert.

2.1.3.2 Analyse der *Nin88::NtCIF*-exprimierenden *Arabidopsis*-Pflanzen

Diese Pflanzen wurden während der Blüte ebenfalls einem Vorscreening unterzogen, um zunächst der Vermehrung der Pflanzen den Vorrang zu geben. Unter Beurteilung der Schoten- und Samenbildung wurden Rückschlüsse auf die Fertilität der Pollen gezogen. Wie bereits bei den Pflanzen der Linie AT30 wurden auch bei diesen transgenen Pflanzen keine Unterschiede hinsichtlich der Samenproduktion gefunden. Aus diesem Grunde wurden zufällig die Linien AT31-1, AT31-3 und AT31-6 ausgewählt und in Pollenkeimungsexperimenten näher charakterisiert. Nach der Samengewinnung der Primärtransformanden wurden die Samen der T2-Generation auf Selektionsmedium (MS-Medium mit Kanamycin) steril ausgelegt. Nach 2 Wochen wurde die Anzahl der resistenten Keimlinge ausgezählt und pro Linie wurden 11 Pflanzen pikiert und im Kurztag weiterkultiviert. Die Auswertung des Spaltungsverhältnisses ergab eine 3:1-Spaltung für die Linien AT31-3 und AT31-6. Die Linie AT31-1 spaltete nicht im

3:1-Verhältnis auf und beinhaltete somit wahrscheinlich mehr als 1 Kopie des Transgens. Zum exakten Nachweis der Kopienzahl wurden Southern-Analysen durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde DNA von Einzelpflanzen der Linien aus der T2-Generation extrahiert und mit den Restriktionsenzymen *Apal*, *EcoRI* und *HindIII* hydrolysiert. Nach Auftrennung der Fragmente im Agarosegel wurde die DNA auf eine Nylonmembran übertragen und mit ^{32}P -markierter Sonden-DNA (*NtC1F*) hybridisiert. Nach einer Exposition von 3 Tagen wurde der Screen eingescannt. Dabei zeigte sich, dass von den Linien AT31-1 und AT31-3 jeweils ein Fragment nachgewiesen werden konnte, während AT31-6 zwei Insertionen enthielt (Abbildung 2-9).

Dieses Ergebnis steht für die Linien AT31-1 und AT31-6 im Widerspruch zu den ermittelten Spaltungsverhältnissen. Bei AT31-6 lagen vermutlich beide Insertionen räumlich so eng beieinander, dass sie nicht mehr unabhängig voneinander vererbt wurden und die Pflanzen deshalb wie bei einer single-copy-Insertion spalten. Der Widerspruch zwischen dem Spaltungsverhältnis und dem Ergebnis der Southern-Analyse von AT31-1 ist ungeklärt, da es unwahrscheinlich ist, dass die beiden Kopien unabhängig voneinander vererbt wurden aber räumlich so eng beieinander lagen, dass keine der 3 Restriktionsschnittstellen zwischen diesen Kopien vorlag.

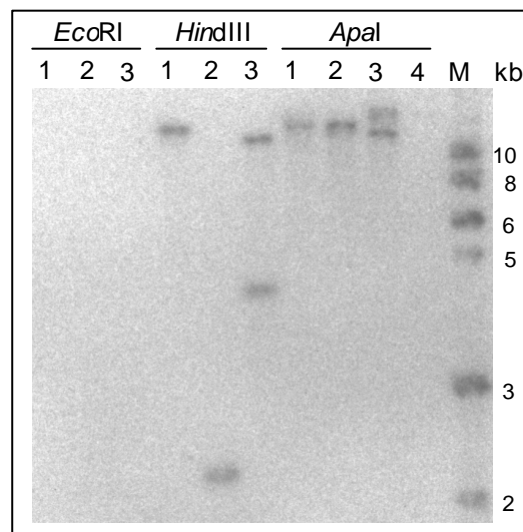


Abbildung 2-9: Southern-Analyse verschiedener AT31-Linien (*Nin88::NtC1F*). Je 15 µg DNA wurden mit den angegebenen Restriktionsenzymen hydrolysiert. AT31-1 (1), AT31-3 (2), AT31-6 (3) und Col-0 (4). Die Expositionszeit betrug 3 Tage.

Nach Einsetzen der Blüte wurden von den einzelnen Linien Pollenkeimungsanalysen durchgeführt. Als Kohlenhydratquelle diente 440 mM Saccharose. Zur Untersuchung von Pollen aus Blüten der gleichen Altersstufe wurden die Blüten der Pflanzen einer Linie gepoolt. Neben dem Anteil gekeimter Pollen wurde ebenfalls die Anzahl

deformierter Pollen in mindestens 3 unabhängigen Versuchen im Vergleich zu Col-0 bestimmt.

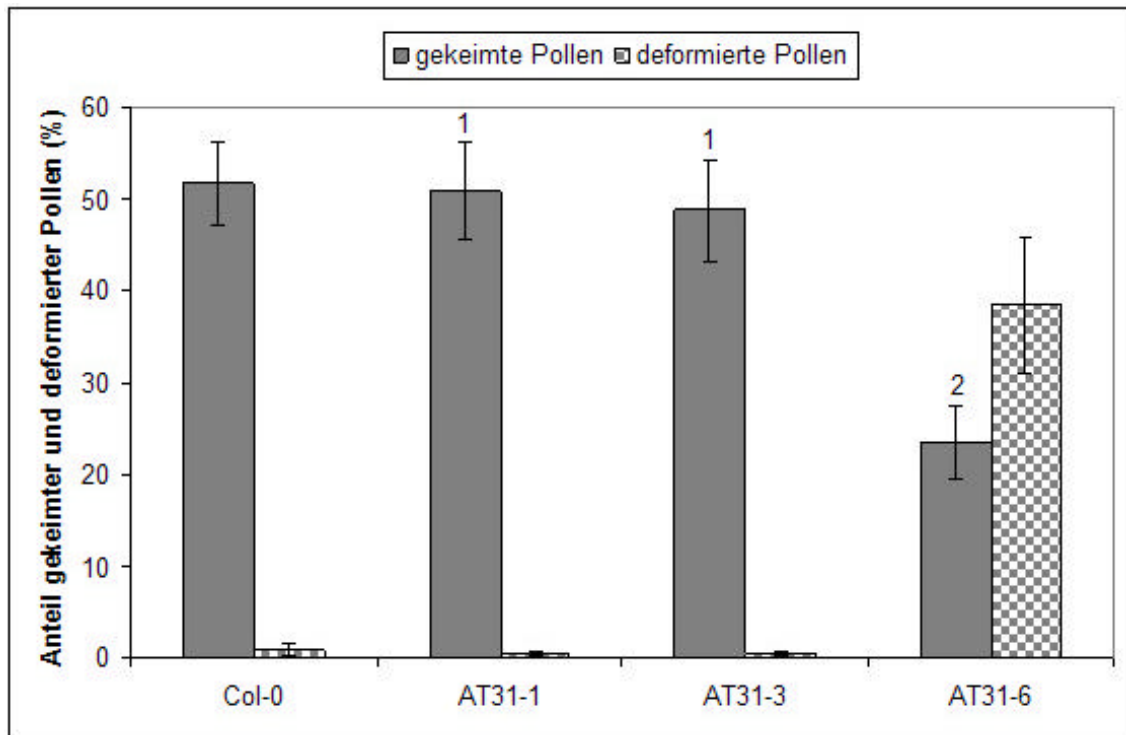


Abbildung 2-10: Anteil gekeimter Pollen verschiedener transgener Linien mit dem Konstrukt *Nin88::NtCIF* (T2-Generation) sowie Anteil degenerierter Pollen an der Gesamtpollenzahl in Prozent. Die hochgestellten Zahlen stellen die nach Southern-Analysen ermittelte Kopienanzahl des transformierten Konstrukts in Pflanzen der T1-Generation dar.

Die Pollenkeimungsfähigkeit der Linien AT31-1 und AT31-6 unterschied sich nicht vom Wildtyp (Abbildung 2-10). Mit einem Anteil von 23,5 % keimender Pollen wies die Linie AT31-6 eine deutliche Verschlechterung der Pollenfertilität auf. Dies beeinflusste jedoch nicht die Samenbildung der Pflanzen (Abbildung 2-11). Bei der Bestimmung des Anteils deformierter Pollen zeigte sich ein vergleichbares Bild. Während sich die Linien AT31-1 und AT31-3 nicht vom Wildtyp unterschieden, konnte bei der Linie AT31-6 ein Anteil von 38 % deformierter Pollen an der Gesamtpollenzahl festgestellt werden. Diese wiesen jedoch häufig nicht die charakteristische deformierte Struktur auf, sondern zeigten eine deutliche Verringerung der Größe.

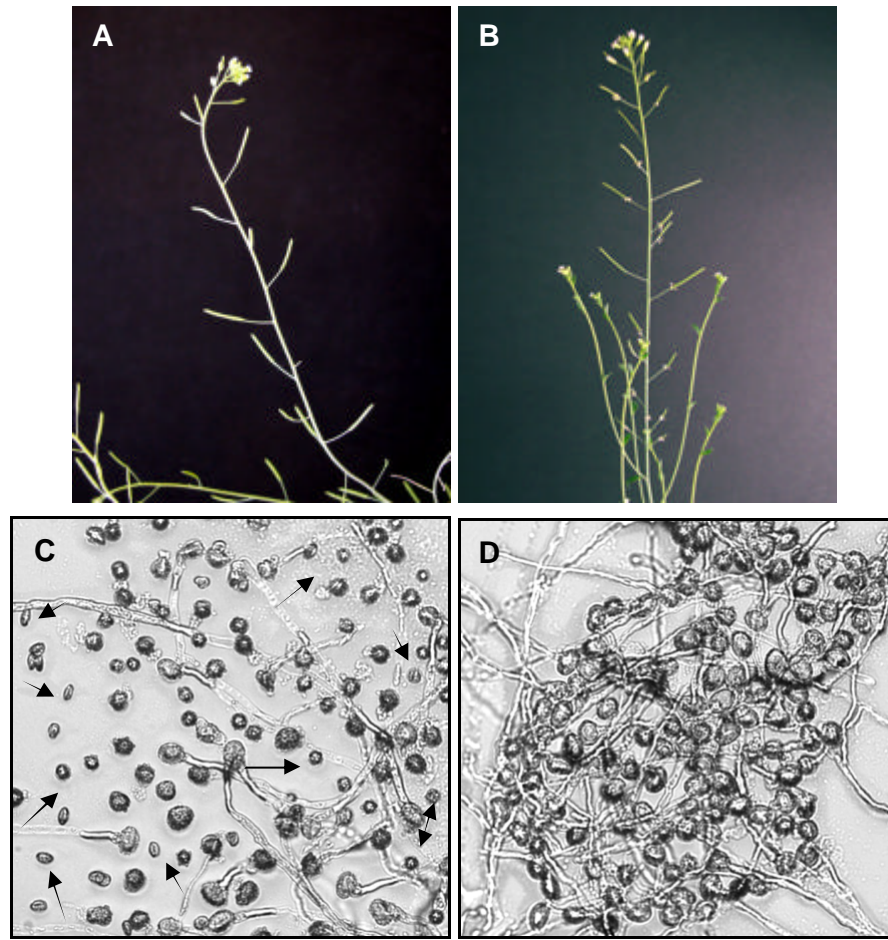


Abbildung 2-11: Vergleich von Schotenbildung (A+B) und Pollenkeimung (C+D) der Linie AT31-6 (A+C) im Vergleich zu Col-0 (B+D). In der Schotenbildung unterscheidet sich die transgene Linie nicht vom Wildtyp. Die Pollenkeimung ist deutlich reduziert. Zudem sind zahlreiche verkleinerte (deformierte) Pollen zu beobachten (durch Pfeile markiert).

2.1.4 Beeinflussung der Invertaseaktivität unter Verwendung des endogenen Promotors *AtcwINV2* in *A. thaliana*

Die Expression des Invertase-Inhibitors *NtCIF* und des *Nin88-Antisense*-Konstrukts unter der Kontrolle des Promotors *Nin88* (aus *N. tabacum*) führte zu keiner Veränderung der Pollenkeimung in *Arabidopsis*. Da zudem die Reporteranalysen belegten, dass der endogene Promotor *AtcwINV2* in *Arabidopsis* eine deutlich höhere Aktivität aufweist als *Nin88*, wurden Konstrukte zur Beeinflussung der Invertaseaktivität unter Verwendung des endogenen Promotors hergestellt. Zur Nutzung der RNA-Interferenz wurde dabei ein Fragment des Exon 3 der *AtcwINV2* in Antisense-Orientierung hinter den *AtcwINV2*-Promotor kloniert.

Neben dem Invertase-Inhibitor *NtCIF* aus Tabak sollte außerdem der endogene Inhibitor *AtC/VIF2* in *Arabidopsis* exprimiert werden, um potentielle Unterschiede in der Wirkung dieser Inhibitorproteine aufzuklären.

2.1.4.1 Analyse der transgenen *Atcw/INV2*-Pflanzenlinien

2.1.4.1.1 Analyse der *Atcw/INV2::Atcw/INV2*-Antisense-exprimierenden *Arabidopsis*-Pflanzen

Die Primärtransformanten der Linien AT34 und AT34/2 (Tabelle 2-2) wurden bis zur Blüte im Kurztag weiterkultiviert. Zur Blütezeit wurde ein erstes Screening der einzelnen Linien hinsichtlich ihrer Fertilität durchgeführt. Dabei fand eine Beurteilung des Samenansatzes der einzelnen Pflanzen statt, um Rückschlüsse auf die Fertilität der Pollen zu ziehen. Auf intensive Pollenkeimungsanalysen wurde zu diesem Zeitpunkt verzichtet, um zunächst die transgenen Pflanzen zu vermehren. Von den insgesamt 57 transgenen Linien zeigten 11 Linien eine deutlich verminderte Schotenbildung. 5 Linien wiesen eine sehr starke Sterilität auf. Bei ihnen konnte keinerlei Schoten- und Samenbildung beobachtet werden. Stattdessen zeichneten sich einige dieser Linien durch eine stark verlängerte Blütenhaltbarkeit aus. Während bei Col-0 durchschnittlich 2 – 3 Blüten pro Blütenstand geöffnet waren, zeigte Linie AT34/2-44 gleichzeitig bis zu 8 geöffnete Blüten (Abbildung 2-12). Die restlichen 7 Linien zeigten eine leicht eingeschränkte Fertilität. Bei diesen Pflanzen konnte eine Schotenentwicklung beobachtet werden, jedoch blieben die Schoten dieser Pflanzen hinsichtlich ihrer Größe im Vergleich zum Wildtyp kleiner (Abbildung 2-12). Um die Pflanzenlinien mit verminderter Fertilität zu erhalten und zu vermehren, wurden sie mit Wildtyp-Pollen bestäubt. Dazu wurden Blüten von Col-0 mit einer Pinzette entfernt und die Antheren wurden auf die Narben der sterilen Blüten gedrückt. Folgende Linien wurden mit Col-0 bestäubt: AT34/2-1, AT34/2-5, AT34/2-8, AT34/2-14, AT34/2-44, AT34/2-45. Die Blütenstände mit den sich entwickelnden Samen wurden bei einsetzender Samenreife in Papiertüten eingeschlagen, um die reifen Samen aufzufangen.

Die Samen dieser Primärtransformanten, Generation T2, wurden erneut steril auf Selektionsmedium ausgelegt, da die Linien in dieser Generation noch aufspalteten. Es wurde für jede Linie die Anzahl der resistenten und nicht-resistenten Pflanzen ausgezählt und der χ^2 -Wert berechnet. Für die untersuchten Linien AT34-5 und AT34/2-14 wurde ein Spaltungsverhältnis von 3:1 bestimmt. Somit war davon auszugehen, dass diese Linien nur eine Kopie des Transgens enthielten oder mehrere

Kopien gekoppelt vererbt wurden. Alle anderen Linien zeigten Spaltungsverhältnisse, die signifikant von einer 3:1-Spaltung abwichen. Dies ließ auf eine Kopienzahl der übertragenen DNA von mindestens 2 schließen.

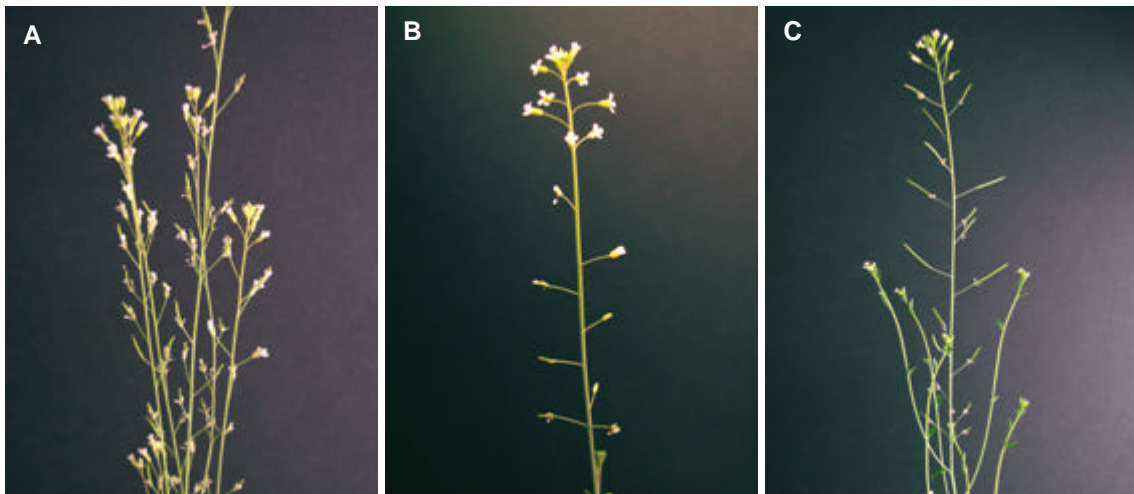


Abbildung 2-12: Blütenstände verschiedener AT34/2-Linien im Vergleich zum Wildtyp. AT34/2-8 (A) zeigte moderate Sterilität und Bildung zahlreicher, kleiner Schoten. AT34/2-44 (B) zeigte keinerlei Fruchtbildung und eine verlängerte Blütenhaltbarkeit, im Vergleich zu Col-0 (C).

Um die exakte Kopienzahl der übertragenen DNA im Genom der Pflanzen zu ermitteln, wurden Southern-Analysen (4.3.12) durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden je 15 μg genomischer DNA von Pflanzen der T1-Generation mit den Restriktionsenzymen *Apal*, *PstI* bzw. *XhoI* restringiert. Als Negativkontrolle diente Wildtyp-DNA, als Positivkontrolle Plasmid-DNA von pJHAT2AS. Die Fragmente wurden im Agarosegel aufgetrennt und anschließend auf eine Nylonmembran übertragen. Mit ^{32}P -markierten DNA-Sonden des Exon 3 der *Atcw/INV2* (pJHAT2EX3) wurden die Membranen hybridisiert und anschließend 20 Stunden auf einem Screen exponiert. Zur Auswertung wurde die Anzahl der markierten Fragmente aus den verschiedenen Restriktionsverdau miteinander verglichen (Abbildung 2-13). Neben 4 Linien mit single-copy Insertionen lagen auch 4 Linien mit 2 unabhängigen Insertionen und 3 Linien mit Mehrfachinsertionen vor (Tabelle 2-3).

Je Linie wurden 11 Pflanzen pikiert und unter Kurztagbedingungen weiterkultiviert. Von diesen Pflanzen wurden nach Beginn der Blüte Pollenkeimungsanalysen (4.4.2) durchgeführt. Als Kohlenhydratquelle wurde 440 mM Saccharose verwendet. Als Referenz dienten Pollen des Wildtyps Col-0. Um von jeder Linie genügend Pollen aus Blüten der gleichen Altersstufe für die Versuche einsetzen zu können, wurden die Blüten der Einzelpflanzen jeder transgenen Linie gepoolt. Neben der Anzahl der gekeimten und ungekeimten Pollen wurde auch die Zahl der degenerierten Pollen

bestimmt. Die Pollenkeimung jeder Linie wurde in mindestens 3 voneinander unabhängigen Versuchen bestimmt.

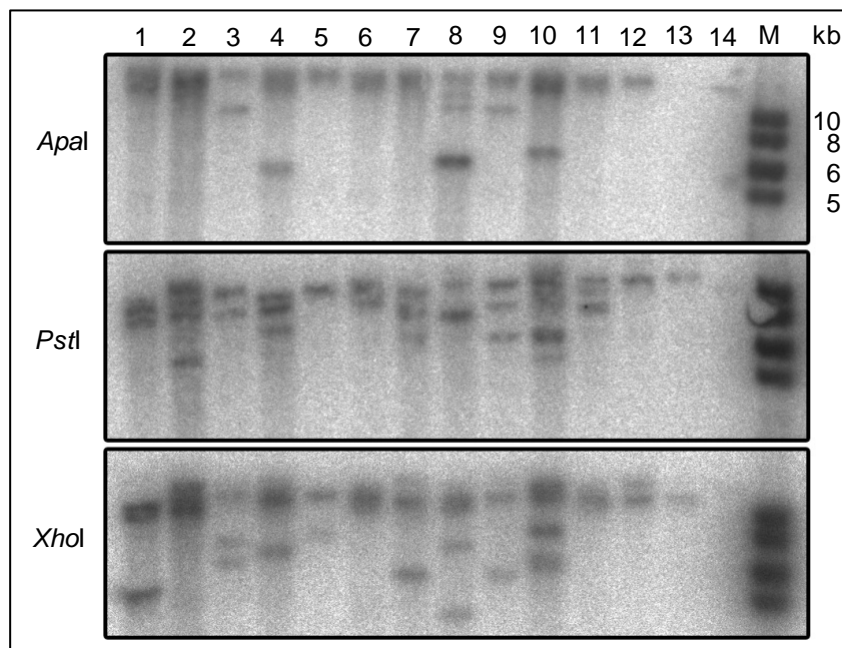


Abbildung 2-13: Southern-Analysen verschiedener AT34-Linien (*AtcwINV2::AtcwINV2-AS*). Je 15 µg genomischer DNA wurden hydrolysiert mit den Restriktionsenzymen *Apal*, *PstI* und *XhoI*. AT34-5 (1), AT34/2-1 (2), AT34/2-2 (3), AT34/2-5 (4), AT34/2-8 (5), AT34/2-14 (6), AT34/2-17 (7), AT34/2-19 (8), AT34/2-22 (9), AT34/2-44 (10), AT34/2-45 (11), AT34/2-50 (12), Col-0 (13), 5 pg pJHAT2AS (14), DNA-Marker (M). Die Expositionszeit betrug 20 Stunden.

Tabelle 2-3: Ermittelte Kopienanzahl des Konstrukts *AtcwINV2::AtcwINV2-AS* im Genom der untersuchten transgenen Linien durch Southern-Analyse der Primärtransformanten (T1) bzw. Spaltungsanalyse der T2-Generation (nd = nicht detektierbar).

Linie	X ² (Spaltungshypothese)	Bandenzahl Southern	Linie	X ² (Spaltungshypothese)	Bandenzahl Southern
AT34-5	nd	2	AT34/2-17	nd	3
AT34/2-1	nd	3	AT34/2-19	nd	2
AT34/2-2	nd	1	AT34/2-22	nd	3
AT34/2-5	nd	2	AT34/2-44	nd	4
AT34/2-8	nd	1	AT34/2-45	nd	2
AT34/2-14	nd	1	AT34/2-50	nd	1

In Abbildung 2-14 ist der prozentuale Anteil gekeimter Pollen der verschiedenen untersuchten AT34-Linien, im Vergleich zum Wildtyp, dargestellt. Die untersuchten Pollen der einzelnen Linien unterschieden sich hinsichtlich ihrer Fertilität deutlich

voneinander. Während Pflanzen der Linie AT34/2-2 mit 39 % die höchste Pollenkeimungsrate der untersuchten transgenen Pflanzen aufwiesen, lag der Anteil keimfähiger Pollen der Linie AT34/2-44 bei nur 5 %. Einen Sonderfall stellen die Pflanzen der Linie AT34/2-8 dar. Diese Pflanzen spalteten phänotypisch in zwei verschiedene Gruppen auf. Ein Teil der Pflanzen zeigte eine normale Schotenentwicklung während die restlichen Pflanzen keinerlei Samenbildung aufwiesen. Aus diesem Grund wurden diese Gruppen getrennt voneinander untersucht. Die fertilen Pflanzen erhielten die Bezeichnung AT34/2-8F und enthielten 29 % keimfähige Pollen, während die Pollen der sterilen Pflanzen der Subgruppe AT34/2-8S nur zu 2 % keimfähig waren.

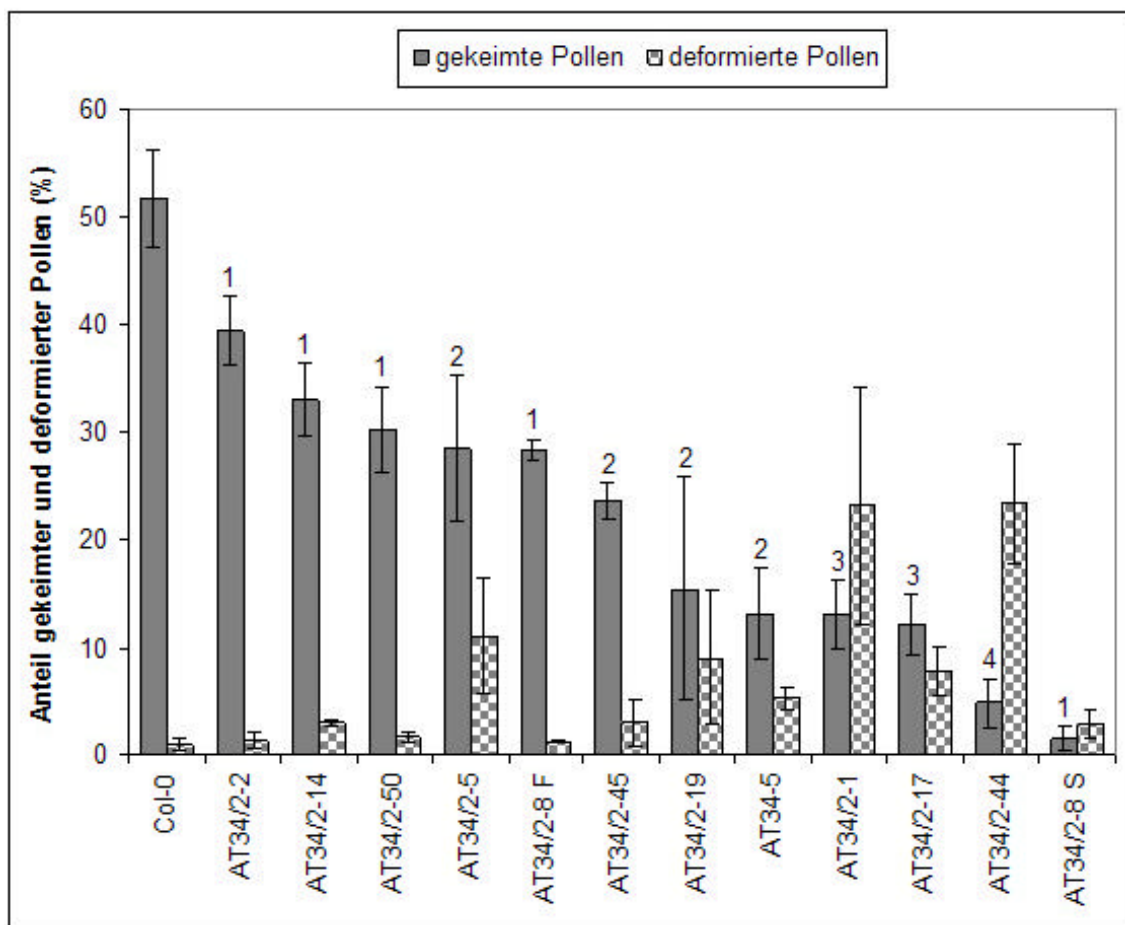


Abbildung 2-14: Anteil gekeimter Pollen verschiedener *AtcwINV2*-Antisense-Linien (T2-Generation) sowie Anteil an degenerierten Pollen an der Gesamtpollenzahl in Prozent. Die hochgestellten Zahlen stellen die nach Southern-Analysen ermittelte Kopienanzahl des transformierten Konstrukts *AtcwINV2:AtcwINV2-AS* in Pflanzen der Generation T1 der jeweiligen Linie dar.

Ein weiteres wichtiges Kriterium bei der Pollenkeimungsanalyse stellte die Anzahl der deformierten Pollen jeder transgenen Linie dar. Auch hier zeigten die einzelnen Linien deutliche Unterschiede (Abbildung 2-15). Während die Linie AT34/2-2, welche den höchsten Anteil an fertilen Pollen besaß, mit 1,4 % nur 0,5 % deformierte Pollen mehr

aufwies als der Wildtyp, zeigten die Pflanzen der Linie AT34/2-44 durchschnittlich 23 % deformierte Pollen (Abbildung 2-14). Die Linie AT34/2-8S mit der niedrigsten Pollenkeimungsrate wies jedoch nur einen Anteil von 3 % deformierter Pollen auf.

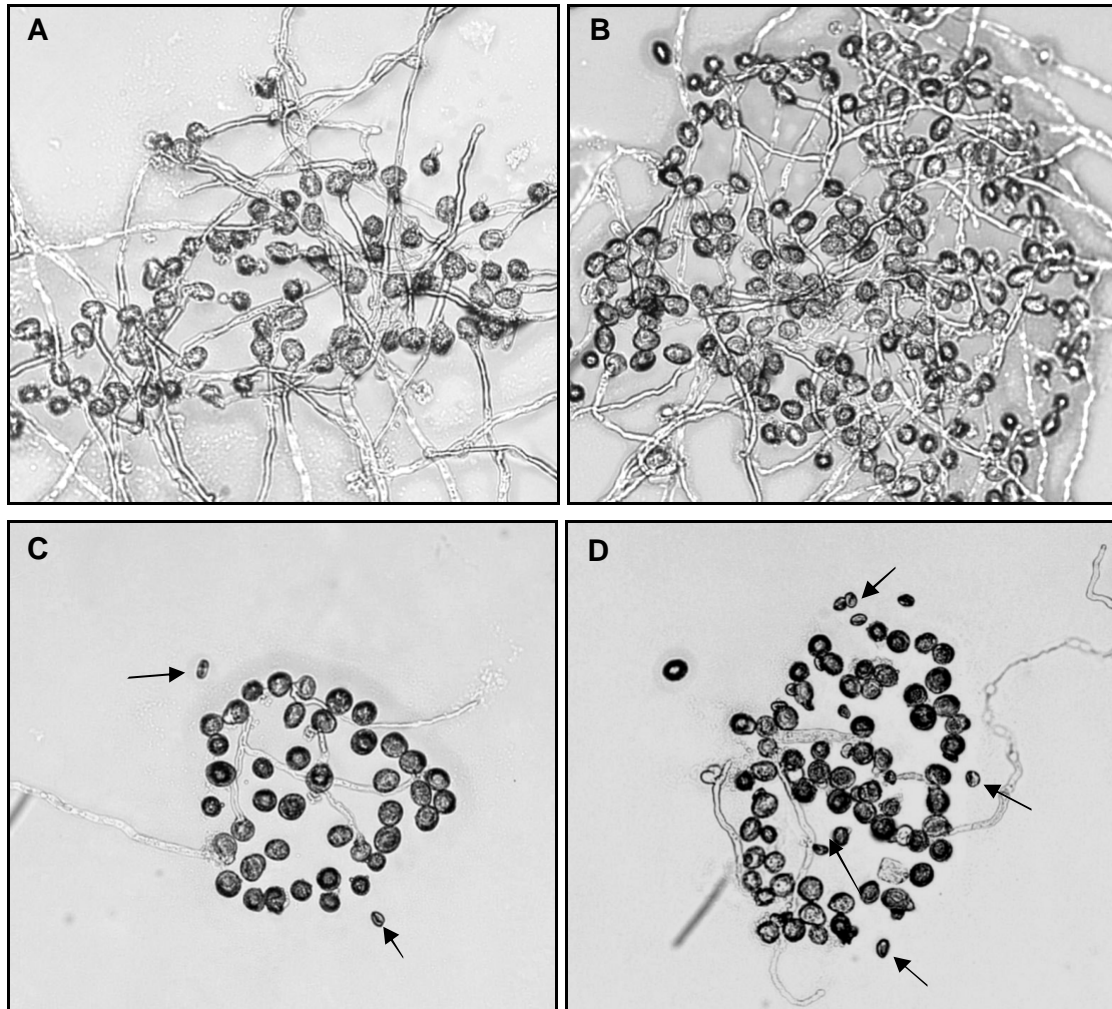


Abbildung 2-15: Pollenkeimung verschiedener transgener Linien im Vergleich zum Wildtyp. Col-0 (A), AT34/2-2 (B), AT34/2-1 (C) und AT34/2-44 (D). Die Pfeile markieren deformierte Pollen.

Aus dem Vergleich der Pollenkeimungsraten sowie dem Anteil deformierter Pollen und den Ergebnissen aus der Southern-Analyse der untersuchten Linien zeigt sich, dass ein Zusammenhang zwischen der Kopienanzahl des transformierten Konstrukts, der Pollenfertilität sowie der Bildung deformierter Pollen besteht. Während die Linien mit hoher Pollenkeimungsrate und einer geringen Anzahl strukturell veränderter Pollen nur eine Kopie des Antisense-Konstrukts im Genom enthielten, zeigten Linien mit 3 bzw. 4 Kopien sehr geringe Keimungsraten und einen zum Teil stark erhöhten Anteil an deformierten Pollen. Die Linien AT34/2-8F und AT34/2-8S stellten eine Ausnahme dar: Sie spalteten phänotypisch in der T2-Generation auf (Abbildung 2-16).

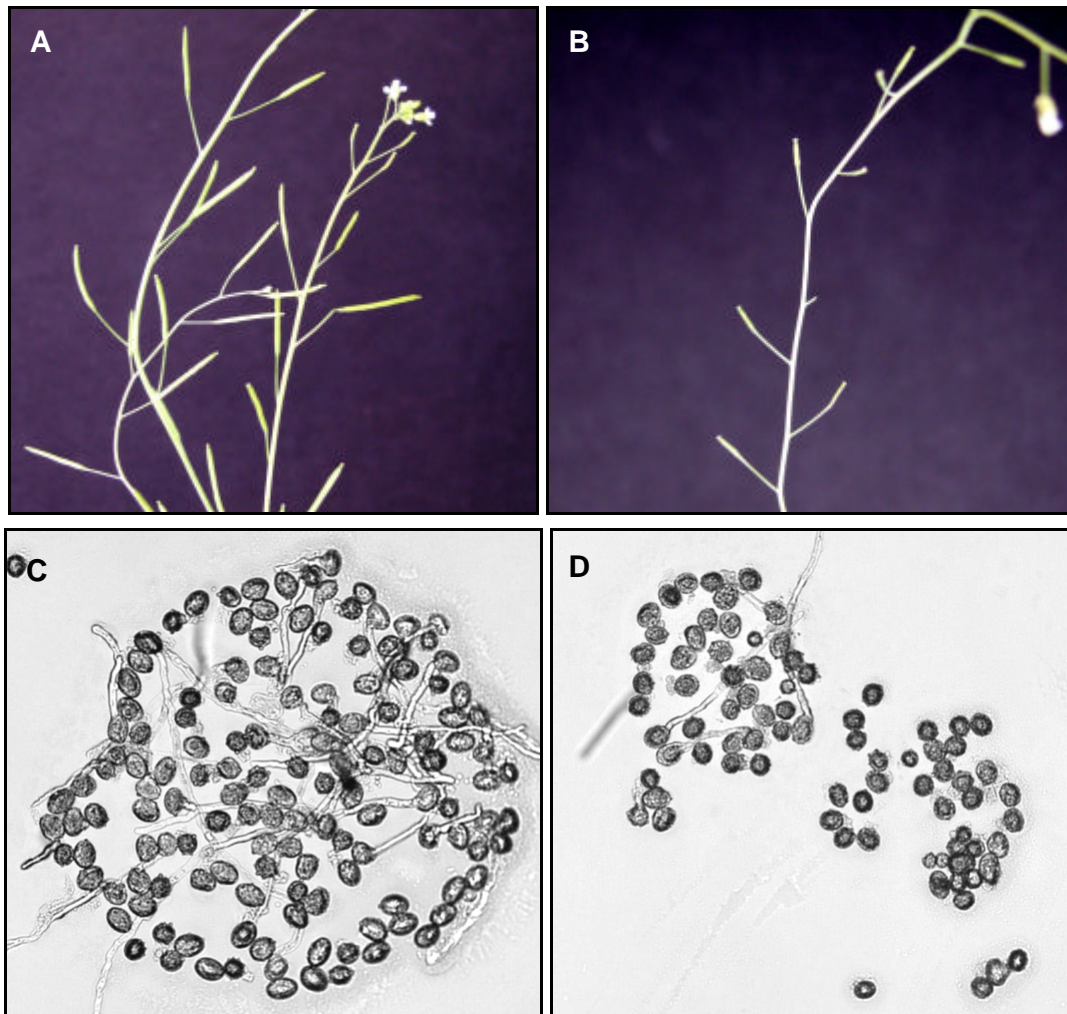


Abbildung 2-16: Vergleich von Schotenbildung (A+B) und Pollenkeimung (C+D) der beiden Subgruppen AT34/2-8F (A+C) und AT34/2-8S (B+D). Während AT34/2-8F zahlreiche, große Schoten bildet und über eine gute Pollenfertilität verfügt, findet bei AT34/2-8S keine Schoten- und Samenbildung statt. Gleichzeitig ist die Pollenkeimung stark inhibiert.

2.1.4.1.2 Analyse der *AtcWINV2::Invertase-Inhibitor*-exprimierenden *Arabidopsis*-Pflanzen

Nach erfolgter Generierung der transgenen Pflanzenlinie AT33/2 wurde durch eine erneute Sequenzierung der verwendeten *AtC/VIF2*-cDNA festgestellt, dass durch einen fehlerhaften Antisense-Primer bei der ursprünglichen Amplifikation der CDS die vorletzte Base vor dem Stop-Codon TGA deletiert war. Dieser Frameshift setzte das vorhandene Stop-Codon außer Funktion, so dass die Translation der Inhibitor-CDS in diesem Konstrukt erst nach weiteren 19 Basen endete. Dies führte zum Austausch der ursprünglich letzten Aminosäure Glutamat zu Aspartat, sowie zur Translation weiterer 6 Aminosäuren (Abbildung 2-17). Aus diesem Grund wurde diese Variante des Invertase-Inhibitors mit *AtC/VIF2+6AA* bezeichnet. Da die Expression dieses

Konstrukts in den transgenen Pflanzen zur Produktion eines um 6 Aminosäuren vergrößerten Invertase-Inhibitors führte und nicht abgeschätzt werden konnte, ob sich diese Vergrößerung des Proteins auf dessen Eigenschaften auswirkt, wurde der Inhibitor *AtC/VIF2* in der korrekten Variante neu kloniert und in *Arabidopsis* transformiert (AT40, AT40/2).

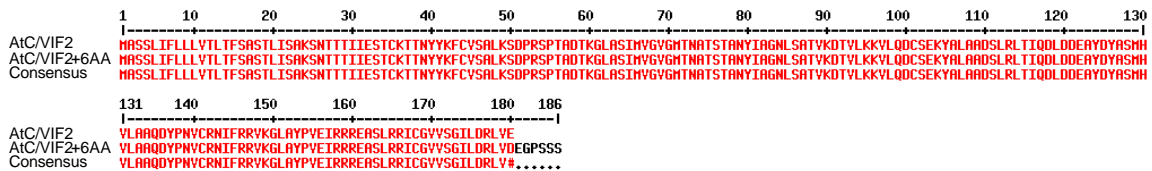


Abbildung 2-17: Vergleich der Aminosäuresequenzen des Invertase-Inhibitors *AtC/VIF2* sowie der deletierten Variante *AtC/VIF2+6AA*. In Rot sind die identischen Aminosäuren markiert.

Die transgenen Pflanzen (Tabelle 2-2) wurden nach dem Pikieren bis zur Blüte im Kurztag weiterkultiviert. Während der Blüte wurde, wie schon bei den Pflanzen der Linien AT34 bzw. AT34/2, ein Vorscreening zur Beurteilung der Schoten- und Samenbildung durchgeführt. Dies sollte Rückschlüsse auf die Fertilität der Pollen zulassen. Aufgrund des limitierten Pflanzenmaterials wurde an dieser Stelle auf die Durchführung von Pollenkeimungsanalysen verzichtet, um zunächst die Pflanzen der einzelnen Linien zu vermehren. Von den 19 transgenen Pflanzen der Linie AT33/2 zeigten 3 Linien eine deutlich verringerte Schoten- und Samenbildung. Die Linie AT33/2-10 wies eine verlängerte Blütenhaltbarkeit auf und war komplett steril (Abbildung 2-18). Zur Erhaltung dieser transgenen Linie wurde die Pflanze mit Col-0 bestäubt. Von den insgesamt 9 transgenen Linien der Transformation AT40 und AT40/2 konnten 5 Pflanzen mit deutlich eingeschränkter Fertilität nachgewiesen werden. Dabei zeigten 4 Pflanzen ein vollständiges Ausbleiben der Samenbildung und wurden deshalb mit Col-0 bestäubt (AT40-1, AT40/2-1, AT40/2-3 und AT40/2-4). 5 Linien von insgesamt 19 transgenen Pflanzen mit dem Konstrukt *Atcw/INV2::NtCIF* (AT41 und AT41/2) wiesen eine Veränderung in der Schotenbildung auf. 4 dieser Linien zeigten dabei ein vollständiges Ausbleiben der Samenbildung und wurden zum Erhalt der Linien mit Col-0 bestäubt (AT41-6, AT41-13, AT41-14, AT41/2-1). Die Samen der selektierten Pflanzen wurden aufgefangen und bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert.

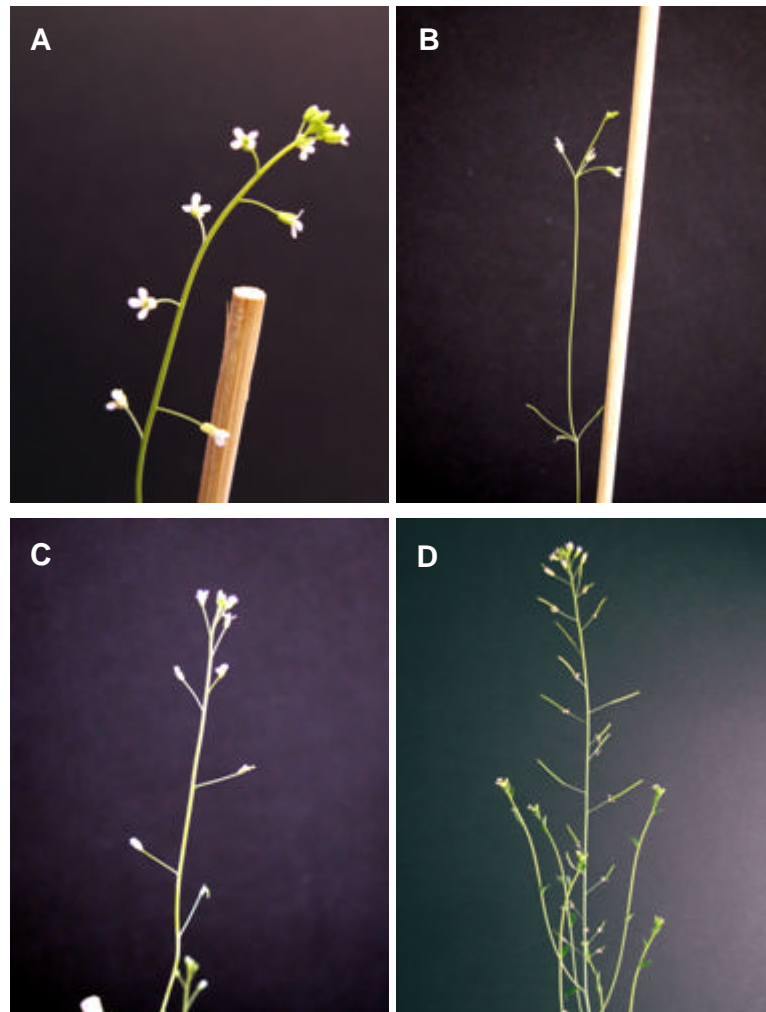


Abbildung 2-18: Blütenstände verschiedener *Invertase-Inhibitor*-exprimierender Linien. Sowohl AT33/2-10 (*AtcwINV2::AtC/VIF2+6AA*, A), AT40/2-4 (*AtcwINV2::AtC/VIF2*, B) und AT41-6 (*AtcwINV2::NtCIF*, C) zeigten ein vollständiges Ausbleiben von Schoten- und Samenbildung, im Vergleich zum Wildtyp Col-0 (D).

Zur weiteren Analyse der selektierten Pflanzenlinien wurden die erhaltenen Samen der Primärtransformanten (T2-Generation) steril auf Selektionsmedium ausgesät, da noch alle Linien aufspalteten. 2 Wochen nach der Keimung der Samen wurde die Anzahl der resistenten Pflanzen bestimmt, um einen Hinweis auf die Anzahl der Insertionen zu erhalten. Während die Linien AT33/2-7, AT33/2-10 und AT33/2-22, AT40/2-3 und AT41/2-1 nicht im Verhältnis von 3:1 spalteten, konnte für alle anderen Linien eine 3:1-Spaltung nachgewiesen werden (Tabelle 2-4). Somit war bei diesen Pflanzen davon auszugehen, dass sie nur 1 Kopie des Transgens im Genom enthielten, bzw. dass die Kopien gekoppelt vererbt wurden.

Zur exakten Bestimmung der Kopienzahl in den Pflanzenlinien wurden Southern-Analysen durchgeführt (4.3.12). Je 15 µg genomischer DNA von Pflanzen der T1-Generation (AT33/2, AT40 und AT40/2) bzw. der T2-Generation von AT41 und AT41/2 wurden mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI, *Eco*RI und *Xba*I gespalten und an-

schließlich auf einem Agarosegel aufgetrennt. Nach Fixierung der DNA auf einer Nylonmembran wurden diese mit ^{32}P -markierten DNA-Sonden hybridisiert und zur Detektion der Signale für 6 – 18 Stunden auf einem Screen exponiert. Zur Auswertung wurde die Anzahl der markierten Fragmente aus den verschiedenen Restriktionen miteinander verglichen (Abbildung 2-19). Dabei zeigte sich, dass nur in der Linie AT40-1 die übertragene DNA in einer Kopie vorlag. In allen anderen transgenen Linien waren dagegen 2 – 4 Insertionsstellen vorhanden (Tabelle 2-4). Von den übrigen Linien konnte die Kopienanzahl mittels Southern-Blot nicht überprüft werden, da von diesen Pflanzen aufgrund besonders kleinen Wuchses nicht ausreichend DNA extrahiert werden konnte.

Von jeder selektierten Linie wurden 11 Pflanzen pikiert und unter Kurztagbedingungen weiterkultiviert. Von diesen Pflanzen wurden nach Beginn der Blüte Pollenkeimungsanalysen (4.4.2) durchgeführt. Als Kohlenhydratquelle diente 440 mM Saccharose. Als Referenz wurden Pollen des Wildtyps Col-0 verwendet. Um von jeder Linie genügend Pollen aus Blüten der gleichen Altersstufe für die Versuche einsetzen zu können, wurden die Blüten der Einzelpflanzen jeder transgenen Linie gepoolt. Neben der Anzahl der gekeimten und ungekeimten Pollen wurde auch die Zahl der deformierten Pollen bestimmt. Die Pollenkeimung jeder Linie wurde in mindestens 3 voneinander unabhängigen Versuchen bestimmt.

Tabelle 2-4: Ermittelte Kopienzahl der übertragenen Konstrukte im Genom der transgenen *Invertase-Inhibitor*-exprimierenden Pflanzen durch Southern-Analyse der Primärtransformanden (T1) bzw. Spaltungsanalyse der T2-Generation (nd = nicht detektierbar).

Linie	χ^2 (Spaltungshypothese)	Bandenanzahl Southern
AT33/2-7	nd	2
AT33/2-10	nd	2
AT33/2-22	nd	2
AT40-1	1,2 (3:1)	1
AT40/2-1	2,7 (3:1)	nd
AT40/2-3	nd	2
AT40/2-4	0,1 (3:1)	nd
AT40/2-6	1,9 (3:1)	nd
AT41-6	0,6 (3:1)	4
AT41-13	0,1 (3:1)	4
AT41-14	2,8 (3:1)	4
AT41-15	0,4 (3:1)	nd
AT41/2-1	4,7 (3:1)	4

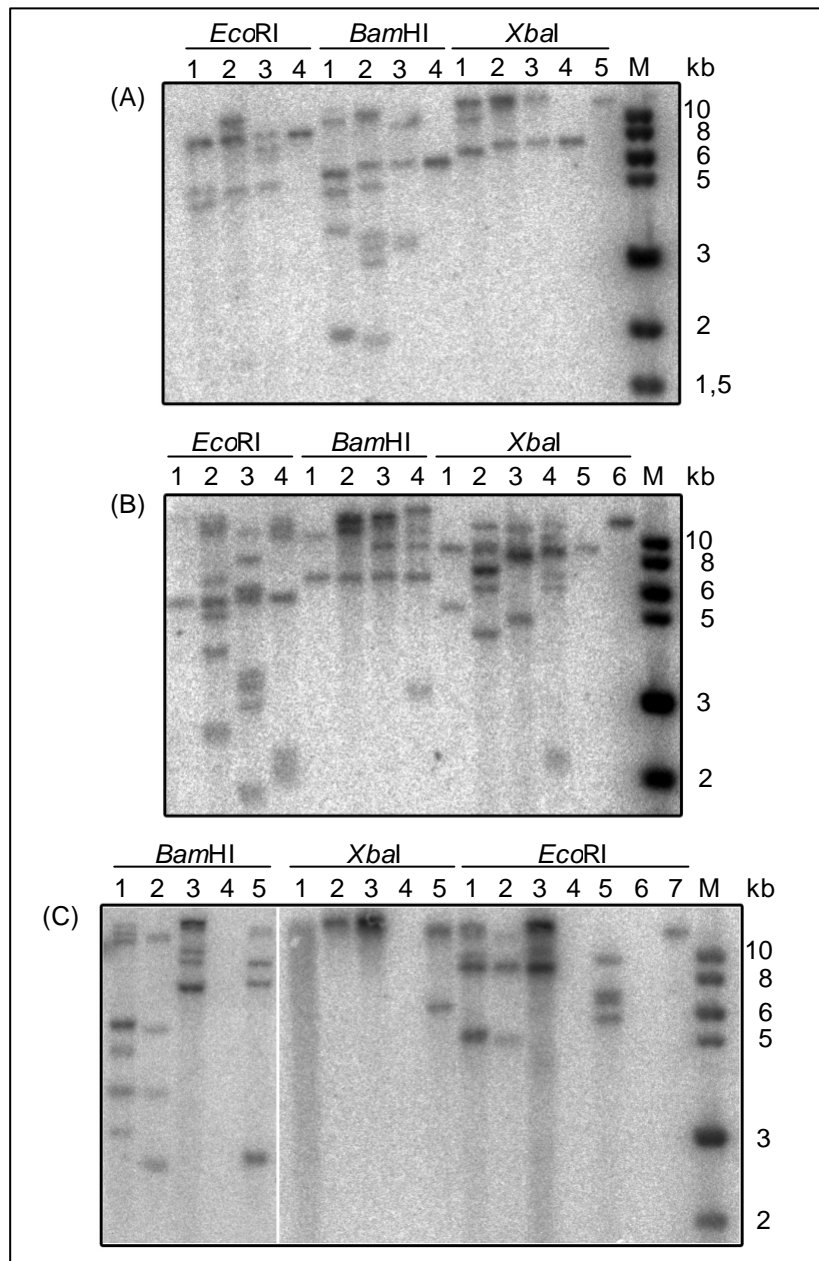


Abbildung 2-19: Southern-Analyse verschiedener transgener Pflanzen. (A) *AtcwlNV2::AtC/VIF2+6AA*: T1-Generation: AT33/2-7 (1), AT33/2-10 (2), AT33/2-22 (3), Col-0 (4), 5 pg pJHAT2ATCI (6). (B) *AtcwlNV2::AtC/VIF2*: T2-Generation: AT40-1 (1), AT40/2-1F (2), AT40/2-3 (3), AT40/2-6F(4), Col-0 (5), 7,5 pg pJHAT2ATCI-S (6). (C) *AtcwlNV2::NtCIF*: T2-Generation: AT41-6 (1), AT41-13 (2), AT41-14 (3), AT41-14 (4), AT41/2-1 (5), Col-0 (6), 7,5 pg pJHAT2NTCI (7). Pro Spur wurden 15 µg genomischer DNA mit den angegebenen Enzymen hydrolysiert. Die Expositionszeit betrug 6 Stunden (A + B) bis 3 Tage (C).

In Abbildung 2-20 ist der prozentuale Anteil gekeimter Pollen der untersuchten transgenen Linien im Vergleich zum Wildtyp dargestellt. Die Pollenkeimungsraten der untersuchten Pollen unterschieden sich deutlich voneinander. Alle Linien mit dem Konstrukt *AtcwlNV2::NtCIF* (AT41 bzw. AT41/2) wiesen eine Pollenkeimfähigkeit zwischen 38 und 32 % auf. Bei keiner Linie konnte eine starke Sterilität der Pollen festgestellt werden. Die Pflanzen der Linien AT40/2-1 und AT40/2-6 (*AtcwlNV2::AtC/VIF2*) spalteten sich phänotypisch in zwei Untergruppen auf und

wurden deshalb umbenannt. Jeweils eine Untergruppe zeigte eine relativ höhere Fertilität von 47 % (AT40/2-1F) bzw. 23 % (AT40/2-6F) als die andere Untergruppe mit einer phänotypisch sichtbaren Reduktion der Schotenbildung. Die Pollen dieser Pflanzen keimten nur noch zu 13 bzw. 6 % (AT40/2-1S bzw. AT40/2-6S). Es fiel außerdem auf, dass bei diesen Pflanzen die Pollenmenge pro Blüte deutlich reduziert war (Abbildung 2-21 D). Die Pollenkeimungsrate der 3 verschiedenen AT33/2-Linien (*AtcwInv2::AtC/VIF2+6AA*) variierte von 33 % bei Linie AT33/2-10 bis 16 % bei Linie AT33/2-7, trotz gleicher Kopienzahl des transformierten Konstrukts in den einzelnen Linien.

Mittels Spaltungsanalysen sollte überprüft werden, ob bei den sterilen Pflanzen der aufspaltenden Linien AT40/2-1 und AT40/2-6 bereits Homozygotie vorlag. Dabei zeigte sich, dass die Nachkommen der T2-Pflanzen in der T3-Generation unterschiedlich aufspalteten (Tabelle 2-5). Rückschlüsse bezüglich der Homozygotie der einzelnen Gruppen konnten nicht gezogen werden, da mittels Southern-Analyse ausgewählter Pflanzen eine deutlich höhere Kopienzahl im Genom festgestellt wurde.

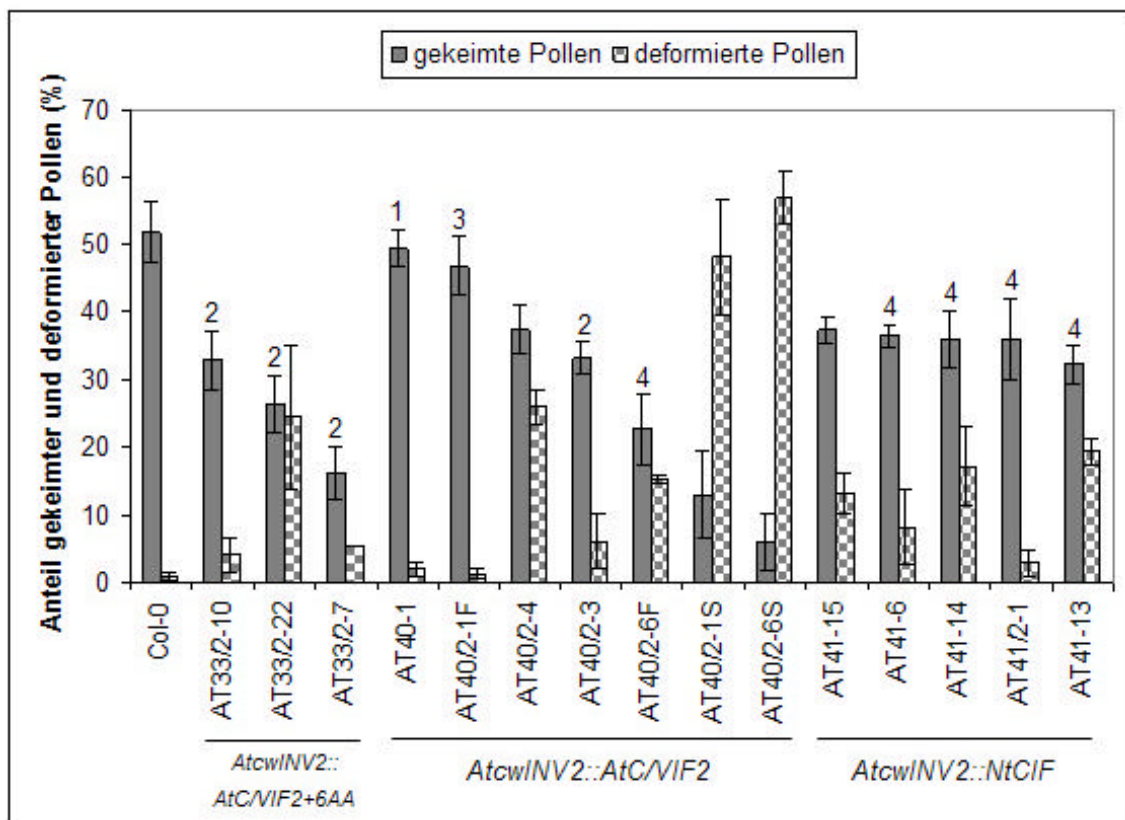


Abbildung 2-20: Anteil gekeimter Pollen verschiedener transgener Linien (T2-Generation) sowie Anteil degenerierter Pollen an der Gesamtpollenzahl in Prozent. Die hochgestellten Zahlen stellen die nach Southern-Analysen ermittelte Kopienzahl des jeweiligen transformierten Konstrukts in Pflanzen der Generation T1 (AT33/2, AT41, AT41/2) bzw. der Generation T2 (AT40, AT40/2) der jeweiligen Linien dar.

Als weiteres Merkmal zur Charakterisierung der transgenen Pflanzen diente die Bestimmung des Anteils deformierter Pollen an der Gesamtpollenzahl. Vergleichbar zur Pollenkeimungsfähigkeit zeigten die einzelnen Linien auch bei diesem Merkmal große Unterschiede (Abbildung 2-20). Bei Pflanzen mit dem Konstrukt *AtcwINV2::NtCIF* konnte ein Anteil an deformierten Pollen zwischen 3 % (AT41/2-1) und 19 % (AT41-14) nachgewiesen werden. Dabei war jedoch kein Zusammenhang zwischen Pollenkeimungsfähigkeit und dem Anteil deformierter Pollen erkennbar. Bei der Linie AT33/2 war ein solcher Zusammenhang ebenfalls nicht feststellbar. Hier schwankte der Anteil deformierter Pollen zwischen 4 % (AT33/2-10) und 24 % (AT33/2-22) wobei die Linie AT33/2-22 mit einer mittleren Pollenkeimungsrate den höchsten Anteil an deformierten Pollen aufwies.

Tabelle 2-5: Ermittelte Kopienzahl der übertragenen Konstrukte im Genom der aufspaltenden *AtcwINV2::AtC/VIF2*-exprimierenden Pflanzen (AT40/2-1 und AT40/2-6) durch Southern-Analyse bzw. Spaltungsanalyse der T3-Generation (nd = nicht detektierbar).

Linie	X ² (Spaltungshypothese)	Bandenzahl Southern	Linie	X ² (Spaltungshypothese)	Bandenzahl Southern
AT40/2-1F1	nd	3	AT40/2-6F1	0,07 (1:1)	4
AT40/2-1F2	0,01 (3:1)	nd	AT40/2-6F2	0,3 (1:1)	nd
AT40/2-1F3	0 (1:0)	nd	AT40/2-6F3	3,0 (3:1)	nd
AT40/2-1F4	0 (1:0)	nd	AT40/2-6F4	0 (1:0)	nd
AT40/2-1F6	0 (1:0)	nd	AT40/2-6F5	0,2 (15:1)	nd
AT40/2-1S1	25,9 (1:1)*	nd	AT40/2-6F6	0 (1:0)	nd
AT40/2-1S2	26,3 (1:1)*	nd	AT40/2-6F7	0,1 (1:1)	nd
AT40/2-1S4	20,5 (1:1)*	nd	AT40/2-6S1	28,7 (1:1)*	nd
			AT40/2-6S2	8 (1:1)*	nd
			AT40/2-6S3	8 (1:1)*	nd
			AT40/2-6S4	8 (1:1)*	nd

*Voraussetzung für angenommenes Spaltungsverhältnis ist eine single copy-Insertion und der Ausschluß von Selbstbestäubung

Die Linien AT40 und AT40/2 zeigten die deutlichsten Unterschiede hinsichtlich des Anteils deformierter Pollen. Im Vergleich mit der Pollenkeimungsrate in Abbildung 2-21 ist bei diesen Linien ein Zusammenhang zwischen Pollenkeimungsfähigkeit und dem Anteil an deformierten Pollen zu erkennen. Dies zeigte sich besonders deutlich in den aufgespaltenen Linien AT40/2-1 und AT40/2-6. So wiesen die fertilen Untergruppen mit 1 % (AT40/2-1F) und 15 % (AT40/2-6F) einen deutlich niedrigeren Anteil deformierter

Pollen auf als die sterilen Untergruppen mit 48 % (AT40/2-1S) bzw. 57 % (AT40/2-6S) Anteil an strukturell veränderten Pollen.

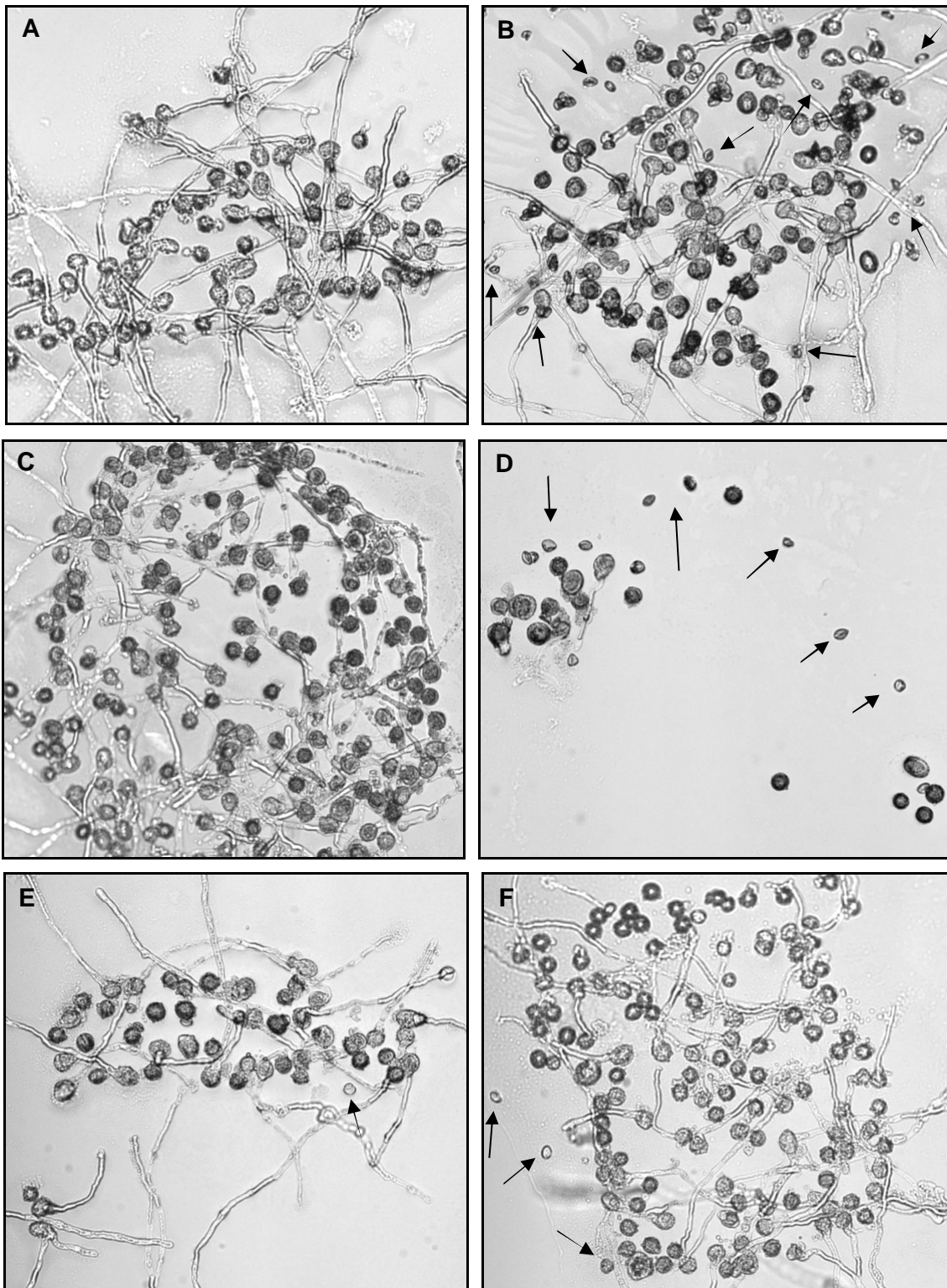


Abbildung 2-21: Pollenkeimung verschiedener transgener Linien. Col-0 (A), AT33/2-22 (B), AT40/2-1F (C), AT40/2-1S (D), AT41-13 (E) und AT41/2-1(F). Die Pfeile markieren deformierte Pollen.

2.2 Vorarbeiten zur Übertragung der erzielten Ergebnisse auf die Nutzpflanze *Brassica napus*

Um durch eine Modifizierung der extrazellulären Invertaseaktivität in den Rapspollen und die daraus resultierende männliche Sterilität als biologische Sicherheitsmaßnahme transgener Rapspflanzen nutzen zu können, muss zunächst die orthologe pollenspezifische Invertase in Raps identifiziert werden, um mittels RNA_i oder gewebespezifischer Expression von Invertase-Inhibitoren räumlich und zeitlich begrenzt die Invertaseaktivität in den Antheren und Pollen zu beeinflussen. Im Rahmen der folgenden Versuche sollte die Invertasen-Familie von *B. napus* identifiziert werden, um durch Aufklärung der Expressionsmuster die orthologe Invertase zu *Nin88* (aus Tabak) und *AtcwINV2* (aus *Arabidopsis*) zu bestimmen.

2.2.1 Klonierung der Invertasen-Familie aus *B. napus*

Zur Klonierung der *B. napus*-Invertasen-Familie wurden die degenerierten Primer OIN3 und OIN4 verwendet, deren Sequenz auf der Homologie der cw-INV_s in 2 Aminosäuremotiven des Exon 3 basiert (Roitsch *et al.*, 1995). Als Template wurde genomische DNA für die Amplifizierung eingesetzt. Um die Wahrscheinlichkeit zu erhöhen, die gesuchte antherenspezifische Invertase zu klonieren, wurde zusätzlich RNA aus Antheren isoliert. In diesem RNA-Gemisch sollte das Transkript der gesuchten Invertase stark angereichert sein. Aus dieser RNA wurde cDNA synthetisiert, die anschließend für die PCR-Reaktionen eingesetzt wurde.

Das amplifizierte DNA-Fragment (ca. 750 bp) wurde in den Klonierungsvektor pGemT-easy einligiert und schließlich in *E. coli* transformiert. Alle Klone, die ein amplifiziertes DNA-Fragment aus genomischer DNA enthielten, wurden mit pJHB1 bezeichnet und fortlaufend durchnummeriert. Alle Klone mit Fragmenten aus der RT-PCR erhielten die Bezeichnung pJHBRT1. Die auf LB-Medium mit Ampicillin selektierten Bakterienkolonien wurden daraufhin auf Integration des PCR-Fragments im Plasmid getestet. Dafür wurden Plasmid-Minipräparationen durchgeführt und die erhaltene Plasmid-DNA mit *EcoRI* restringiert. Alle Plasmide, aus denen ein Fragment von ca. 750 bp ausgeschnitten wurde, enthielten die in der PCR amplifizierte DNA-Sequenz. Bei Analyse dieser Kontrollrestriktionen fiel auf, dass zahlreiche Klone von pJHB1 ein DNA-Fragment enthielten, das mit ca. 950 bp deutlich größer war (Abbildung 2-22).

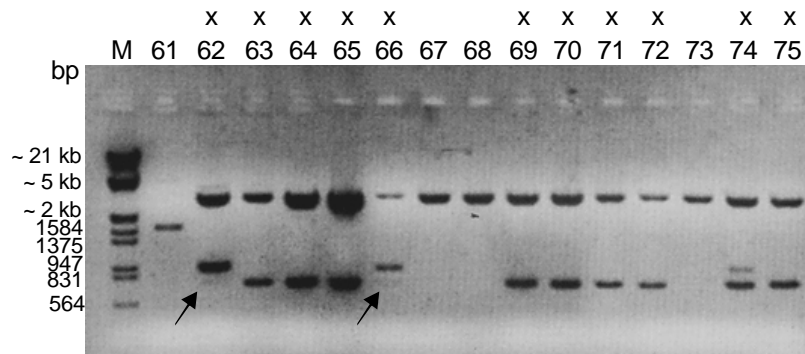


Abbildung 2-22: Selektion der pJHB1-Klone mit amplifiziertem Invertase-Fragment. Alle mit (x) markierten Klone wurden weiteren Analysen zugeführt. 950 bp Fragmente sind mit einem Pfeil markiert. Spur M: DNA-Marker.

Die Plasmid-DNA aller positiv getesteten Klone wurde anschließend jeweils mit den Restriktionsenzymen *BsuRI*, *HpaII* und *TaqI* gespalten (Abbildung 2-23). Die erhaltenen Bandenmuster wurden miteinander verglichen und anhand von Gemeinsamkeiten oder Unterschieden wurden die Klone in verschiedene Gruppen eingeteilt. Es konnte davon ausgegangen werden, dass alle Mitglieder einer Gruppe das gleiche DNA-Fragment beinhalteten. Auf diese Weise wurde die Anzahl der notwendigen Sequenzierreaktionen minimiert. Insgesamt wurden 67 Bakterienkolonien mittels Restriktionsanalyse genauer untersucht und schließlich 22 Klone sequenziert. Auf diese Weise konnten 4 verschiedene putativ extrazelluläre und 1 putativ vakuoläre Invertase identifiziert werden.

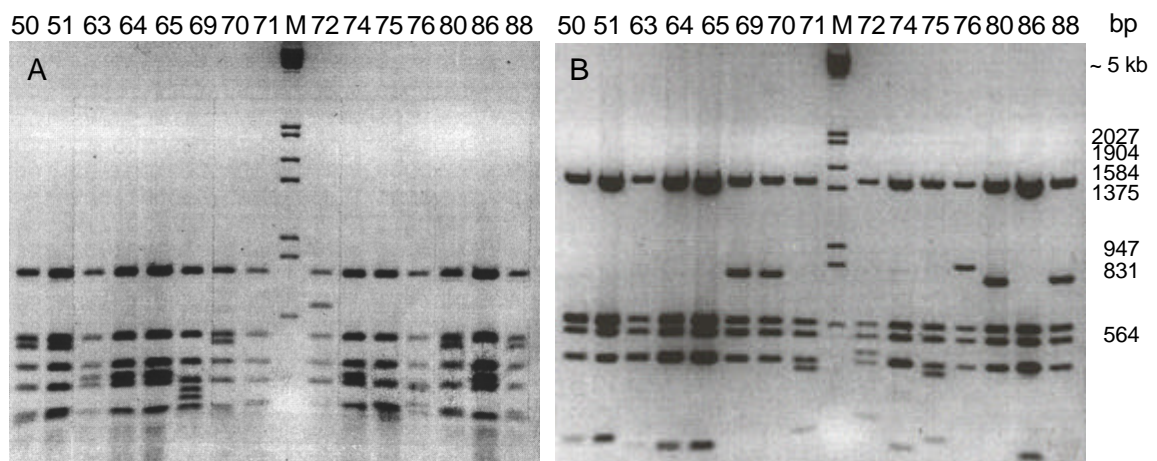


Abbildung 2-23: Analyse der Restriktionsmuster verschiedener pJHB1-Klone. Je 5 µl Plasmid-DNA wurden mit *HpaII* (A) bzw. *TaqI* (B) über Nacht hydrolysiert. Spur M: DNA-Marker

In weiteren Klonierungsexperimenten von Thomas Engelke konnten unter Verwendung einer Nested-PCR mit Hilfe anderer degenerierter Primer (PRIMER_KON1-F und PRIMER_KON5-R sowie PRIMER_KON3-F und PRIMER_KON4-R) durch

Amplifikation eines 410 bp großen Fragments 5 putativ extrazelluläre und 1 putativ vakuoläre Invertase identifiziert werden.

In Homologievergleichen mit den DNA-Sequenzen der Invertasen aus *A. thaliana* wurden alle klonierten DNA-Fragmente aufgrund ihrer Ähnlichkeit den entsprechenden Invertasen aus *Arabidopsis* zugeordnet (Tabelle 2-6). Wegen dieser Ähnlichkeit der DNA-Sequenzen wurde die Nomenklatur der neu identifizierten Raps-Invertasen an die Nomenklatur der Invertasenfamilie aus *A. thaliana* angepasst. Die *B. napus*-Homologen zu *AtcwINV1* – *AtcwINV3* konnten aufgrund von distinkten Sequenzunterschieden in 2 Untergruppen eingeteilt werden. Fehler in den Sequenzierreaktionen als Ursache für die Unterschiede konnten ausgeschlossen werden.

Tabelle 2-6: Homologievergleich der klonierten Raps-Invertasen mit der Invertasenfamilie aus *A. thaliana*.

Bezeichnung	Berechneter Isoelektrischer Punkt	Klone aus		Größte Homologie zu	
		DNA	RNA	Übereinstimmung	Gen
<i>BncwINV1</i>	7,6	+ (410)	-	97 %	<i>AtcwINV1</i> At3g13790 pI = 9,5
<i>BncwINV2a</i>	9,4	+ (750)	+ (750)	88 %	<i>AtcwINV2</i> At3g52600 pI = 9,7
<i>BncwINV2b</i>	9,5	+ (410)	-	98 %	
<i>BncwINV3a</i>	5,6	+ (750)	-	87 %	<i>AtcwINV3</i> At1g55120 pI = 5,5
<i>BncwINV3b</i>	5,1	+ (410)	+ (410)	98 %	
<i>BncwINV4</i>	9,4	+ (410)	-	97 %	<i>AtcwINV4</i> At2g36190 pI = 8,1
-	-	-	-	-	<i>AtcwINV5</i> At3g13784 pI = 9,3
<i>BncwINV6</i>	5,0	+ (750)	-	77 %	<i>AtcwINV6</i> At5g11920 pI = 4,8
<i>Bnβfruct3</i>	6,8*	+ (950)	-	87 %**	<i>Atβfruct3</i> At1g62660 pI = 5,3

<i>Bnβfruct4</i>	6,8	-	+	86 %	<i>Atβfruct4</i> At1g12240 pl = 5,3
			(410)		

*pl bestimmt aus größter, translaterbarer Proteinteilsequenz; **Teilsequenzvergleich mit 78 % der *Bnβfruct3*-Sequenz, da vermutlich ein Intron in der Sequenz enthalten ist; in Klammern angegeben ist die Größe des klonierten DNA-Fragments.

2.2.2 Expressionsanalyse der verschiedenen *B. napus*-Invertasen

Zur Analyse des Expressionsprofils der identifizierten putativen Invertasen wurde aus verschiedenen Geweben RNA isoliert und je 15 µg nach elektrophoretischer Auftrennung auf eine Nylonmembran geblotet. Sonden-DNA der einzelnen Invertasen wurde mit ³²P radioaktiv markiert und mit den Membranen über Nacht hybridisiert. Zur Detektion wurden die Screens 3 Tage exponiert.

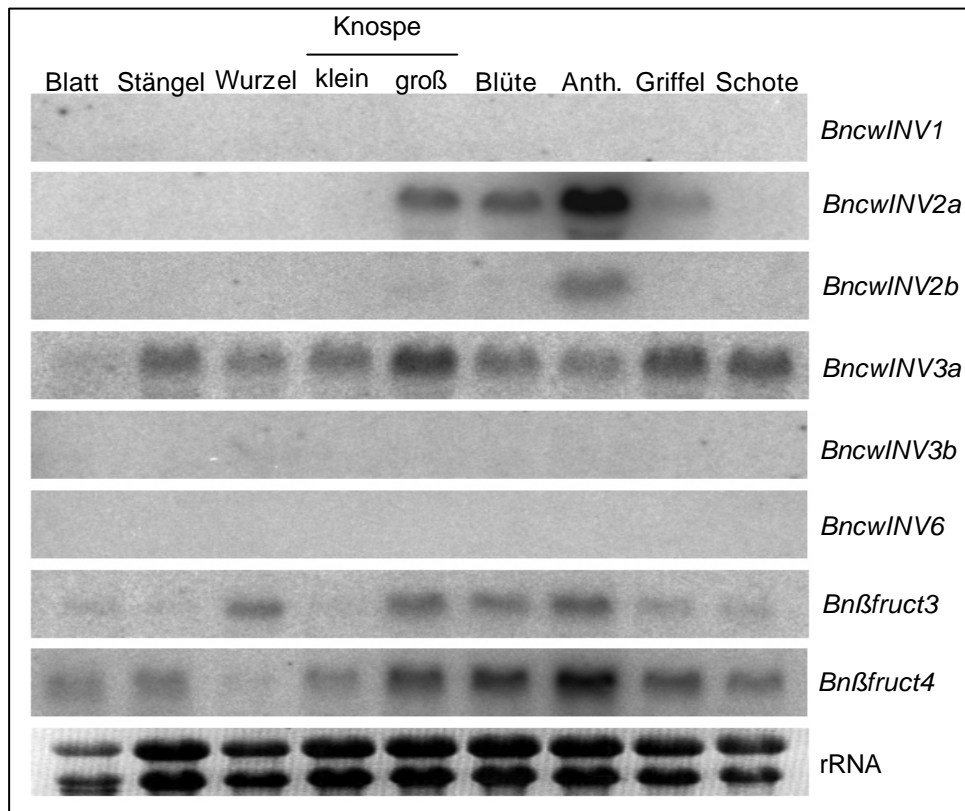


Abbildung 2-24: Northern-Analyse der klonierten Invertasen aus *B. napus*. Pro Spur wurden 15 µg RNA eingesetzt. Die Expositionsdauer betrug 3 Tage.

Im Vergleich der Expressionsprofile konnten *BncwINV2a* und *BncwINV2b* als orthologe Invertasen zu *Nin88* und *AtcwINV2* mit blüten- bzw. antherenspezifischer Expression identifiziert werden (Abbildung 2-24). *BncwINV2b* zeigte dabei eine deutlich schwächere Expression als *BncwINV2a*. Die putative cw-INV *BncwINV3a* zeigte eine relativ ubiquitäre Expressionsrate in den untersuchten Geweben (Abbildung 2-24). Von

den klonierten Invertasen *BncwINV1b*, *BncwINV3b* und *BncwINV6* konnte in allen untersuchten Geweben keine Expression nachgewiesen werden. Da mit Hilfe der Northern-Analysen vorrangig die zu *AtcwINV2* orthologe cw-INV aus *B. napus* identifiziert werden sollte, wurde auf weitere Northern-Analyse der Invertase *BncwINV4* verzichtet. Während die vac-INV *Bnβfruct3* hauptsächlich in Wurzeln und Blüten exprimiert wurde, zeigte *Bnβfruct4* eine weitgehend ubiquitäre Transkriptverteilung.

2.3 Einfluss der extrazellulären Invertasen während der Pollenkeimung und dem Pollenschlauchwachstum in *Nicotiana tabacum*

In vorangegangenen Untersuchungen hatten Goetz *et al.* (2001) sowie Schmidt (2006) gezeigt, dass eine verminderte Expression der cw-INV *Nin88* in Antheren und Pollen von Tabak zu einer Verringerung der männlichen Fertilität der transgenen Pflanzen führte. Dies äußerte sich in einer Veränderung der Pollenstruktur, einer Reduzierung der Pollenzahl und einer verringerten Pollenschlauchbildung. Während des Auskeimens der Pollen auf der Narbe und dem PS-Wachstum durch das Durchlassgewebe des Griffels konnte ebenfalls die Expression von *Nin88* nachgewiesen werden. Mit Hilfe polyklonaler Antikörper gegen *Nin88* wurde ein Signal im Griffelgewebe detektiert, das nicht durch die Expression von *Nin88* selbst bedingt war (Roitsch, unveröffentlichte Daten). Da die Expressionsprofile anderer cw-INVs im weiblichen Griffelgewebe bislang nicht aufgeklärt waren, sollte im Rahmen der folgenden Versuche die Bedeutung cw-INVs im Pollenschlauch-umgebenden Gewebe hinsichtlich der Pollenschlauch-Leitung im Durchlassgewebe näher untersucht werden.

2.3.1 Klonierung der Invertasen-Familie aus Tabak

Um die Bedeutung der Invertasen in den Tabak-Pflanzen untersuchen zu können, wurde zunächst die gesamte Invertasen-Familie dieser Pflanzenart kloniert. Zu diesem Zweck wurden, wie schon zur Amplifikation der Raps-Invertasen (2.2.1), die degenerierten Primer OIN3 und OIN4 verwendet (Roitsch *et al.*, 1995). Zur Amplifikation der Invertasen-Fragmente wurde genomische DNA aus Tabak 'SR1' als Template verwendet. Zusätzlich wurde aus Griffeln 4 Stunden nach der Bestäubung (4h nB) RNA isoliert und cDNA hergestellt, die als Template für eine weitere PCR-Reaktion diente. Mit Hilfe dieser Methode sollte sichergestellt werden, dass alle im Griffel exprimierten cw-INVs amplifiziert werden. Die Identifikation der klonierten

Invertasen aus der RT-PCR sollte ebenfalls einen ersten Aufschluss über den Expressionsort der entsprechenden Gene liefern.

Die PCR-Produkte beider Amplifikationen (ca. 750 bp) wurden aus dem Agarosegel ausgeschnitten und aus dem Gel eluiert (4.3.7). Die Amplifikate wurden in den Klonierungsvektor pSTBlue-1 (amplifizierte Fragmente aus genomischer DNA) bzw. in pGemT-easy (Amplifikate aus cDNA) einligiert und in *E. coli* transformiert. Mittels Plasmid-Minipräparation der selektierten Bakterienkolonien und anschließender Restriktion der erhaltenen Plasmide mit *EcoRI* wurden die Klone identifiziert, welche ein PCR-Fragment in dem Plasmid enthielten. Vor dem Sequenzieren der putativen Invertasenfragmente wurden die Bakterienkolonien mit identischen Invertasenfragmenten identifiziert. Dazu wurden deren Plasmide mit den Enzymen *HinfI* und *HpaII* restringiert. Die erhaltenen Bandenmuster wurden miteinander verglichen und alle untersuchten Klone hinsichtlich dieses Musters in Spaltungsgruppen eingeteilt. Gruppen mit besonders vielen Klonen wurden anschließend noch mit *BsuRI* und *TaqI* behandelt, um weitere Sequenzunterschiede nachweisen zu können und evtl. unentdeckte Invertasen so identifizieren zu können. Pro Spaltungsgruppe wurden anschließend 1 – 2 Klone sequenziert. Auf diese Weise konnten insgesamt 7 putative Invertasen identifiziert werden, von denen 4 bislang nicht untersucht und veröffentlicht waren (Tabelle 2-7).

Tabelle 2-7: Homologievergleich der klonierten Invertasen aus *N. tabacum* mit bereits publizierten Invertase-Sequenzen verschiedener Pflanzenarten.

Bezeichnung	Berechneter Isoelektrischer Punkt	Klone aus		Größte Homologie zu	
		DNA	RNA	Übereinstimmung	Gen
<i>Nin11</i>	6,2	-	+	60 %	<i>GmCWINV</i> (CAD91338) pI = 8,7
<i>Nin52</i>	8,9	+	-	98 %	<i>CIN1</i> (X81792) pI = 9,1
<i>Nin63</i>	4,6	+	-	-	-
<i>Nin77</i>	9,3	-	+	100 %	<i>Nin77</i> ¹ pI = 9,3

<i>Nin88</i> ²	9,1	+	-	100 %	<i>Nin88</i> ² (AF376773) pI = 8,4
-	-	-	-	-	<i>Ntβfruc1</i> ³ (CAA57428) pI = 9,1
<i>Nin21</i>	5,4	-	+	86 %	<i>Lin9</i> (AM050394) pI = 6,7
<i>Nin102</i>	5,0	-	+	100 %	<i>Nt-VI</i> ⁴ (AJ305044) pI = 5,8

¹identifiziert von D. Godt, aber Sequenz nicht in Datenbank veröffentlicht; ²Goetz et al. (2001); ³Greiner et al., 1995; ⁴Lauer, 2006.

In den sequenzierten Klonen war die codierende Sequenz für die cw-INV *Ntβfruc1* nicht enthalten, die bereits 1995 von Greiner et al. beschrieben wurde.

2.3.2 Expressionsanalyse der verschiedenen Tabak-Invertasen

2.3.2.1 Northern-Analysen

Um das Expressionsprofil der klonierten Invertasen genauer zu untersuchen, wurde aus verschiedenen Pflanzengeweben RNA isoliert und jeweils 15 µg nach dem elektrophoretischen Auftrennen auf Nylonmembranen geblottet. Zur Sondenherstellung wurden die verschiedenen Invertasenfragmente aus den Plasmiden mit *EcoRI* ausgeschnitten, aus dem Agarosegel eluiert und mit ³²P-dATP radioaktiv markiert. Die Membranen wurden nach der Hybridisierung für 3 Tage auf einem Screen exponiert.

Eine Expression der Invertasen *Nin52* und *Nin63* konnte nur sehr schwach im Blatt nachgewiesen werden, während RNA von *Nin11* nicht detektierbar war (Abbildung 2-25). Neben der blütenspezifischen Expression von *Nin77*, *Nin88* und *Ntβfruc1* wurde bei *Ntβfruc1* zusätzlich Transkription in den Wurzeln nachgewiesen. Während die vac-INV *Nt-VI* eine ubiquitäre Expression zeigte, konnte RNA von *Nin21* vor allem in den Blüten detektiert werden.

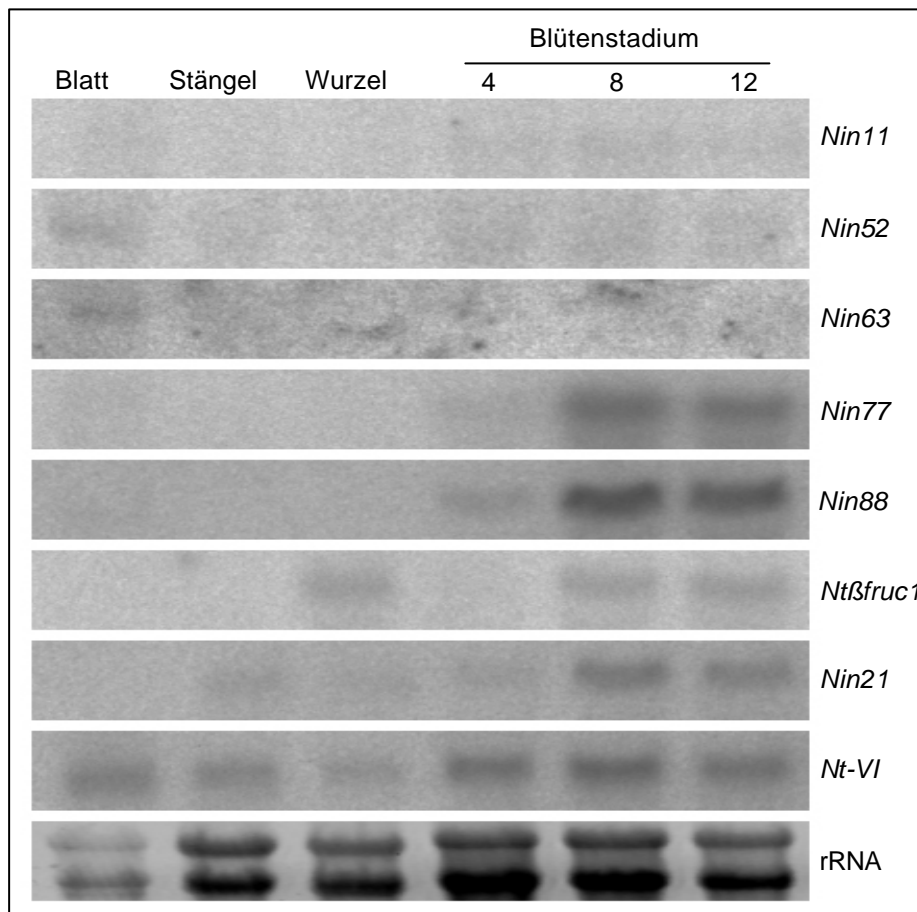


Abbildung 2-25: Northern-Analyse aller bekannten und neu klonierten Invertasen aus *N. tabacum*. Aus jedem Gewebe wurden 15 µg RNA aufgetragen. Die Expositionsdauer betrug 3 Tage.

Da es das Ziel war, Mitglieder der Invertasen-Familie zu identifizieren, die im Griffelgewebe exprimiert werden und an einer potentiellen Pollenschlauch-Leitung beteiligt sein könnten, wurde aus Antherengewebe verschiedener Entwicklungsstufen, sowie aus Pollenschläuchen und Griffelmaterial RNA isoliert und ebenfalls zu Transkriptionsanalysen aller Invertasen herangezogen.

Während die cw-INVs *Nin52* und *Nin63* in den untersuchten Geweben nicht nachweisbar waren, zeigte die Invertase *Nin11* eine Griffel-spezifische Expression (Abbildung 2-26). Neben *Ntβfruc1* konnten vor allem *Nin77* und *Nin88* in Antheren, Pollenschläuchen und befruchteten Griffeln nachgewiesen werden. Die Transkription von *Nin77* und *Nin88* setzte, im Gegensatz zu *Ntβfruc1*, bereits in Antheren des Blütenstadiums 1 (nach Koltunow *et al.*, 1990) ein. Da keine RNA dieser cw-INV's in unbestäubten Griffeln detektierbar war, ist der Nachweis dieser Transkripte in bestäubten Griffeln höchstwahrscheinlich auf einwachsende Pollenschläuche selbst, bzw. eine durch die Pollenschläuche induzierte Expression im Griffelgewebe zurückzuführen. Die beiden vac-INV's *Nin21* und *Nt-VI* konnten, im Gegensatz zu den drei letztgenannten cw-INV's, sowohl in den Antheren als auch im Griffel nachgewiesen

werden. Die Expression von *Nin21* begann in den Antheren ab Stadium 8 und konnte im gleichen Verhältnis in Pollenschläuchen und unbestäubten Griffeln belegt werden. Im bestäubten Griffelmaterial addierte sich die nachgewiesene Transkriptmenge (Abbildung 2-26). Die relativ ubiquitär vertretene Invertase *Nt-VI* wurde sowohl in den Antheren als auch im Griffelgewebe nachgewiesen. In den Antheren nahm die Transkriptmenge jedoch in den älteren Stadien ab und konnte in den Pollenschläuchen nicht nachgewiesen werden.

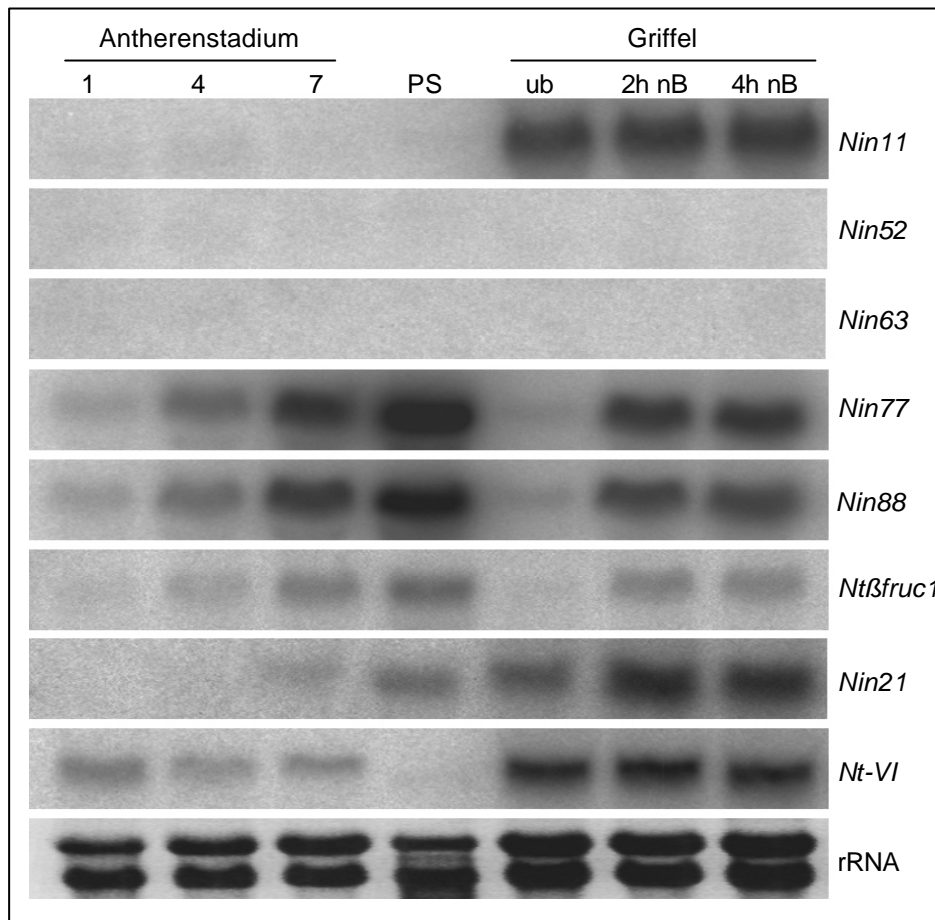


Abbildung 2-26: Northern-Analyse aller bekannten und neu klonierten Invertasen aus *N. tabacum* mit RNA verschiedener Blütengewebe. Pro Spur wurden 15 µg RNA eingesetzt. Die Expositionsdauer betrug 3 Tage. PS = Pollenschlauch; ub = unbestäubt; nB = nach Bestäubung.

2.3.2.2 *In-situ*-Hybridisierung

Zur genauen Lokalisation des Expressionsortes neu klonierter, griffelspezifischer Invertasen wurden *in-situ*-Hybridisierungsexperimente an Griffelschnitten durchgeführt, um eine mögliche Beteiligung dieser Invertasen an der Pollenschlauch-Leitung durch das Durchlassgewebe aufzuklären. Daher wurde die Expression der extrazellulären Invertasen *Nin11* und *Nin21* im Griffelgewebe genauer untersucht.

Zur Synthese von RNA-Sonden der Länge 150 – 200 bp für die *in-situ*-Hybridisierung wurde aus den Plasmiden pJHRT2-11 und pJHRT2-21 mit den Primern OIN3 und 11-Anf-Rev bzw. 21-Anf-Rev mittels PCR ein Fragment der Länge 171 bzw. 170 bp amplifiziert und in den Vektor pGemT-easy einligiert (Abbildung 2-27). Nach Überprüfung der Leserichtung der Fragmente wurden von den entstandenen Plasmiden pJHISH11A und pJHISH21A Midipräparationen durchgeführt und die Plasmide jeweils mit den Restriktionsenzymen *Apa*I bzw. *Pst*I linearisiert. Mit diesen linearisierten Vektoren, pJHISH11A bzw. pJHISH21A, wurden die Antisense-Sonden aus DIG-markierter RNA *in vitro* transkribiert (4.3.16). Die Sense-Sonden, als Negativkontrolle der *in-situ*-Hybridisierungen, wurden mit den entsprechenden *Pst*I- bzw. *Apa*I-linearisierten Plasmiden hergestellt.

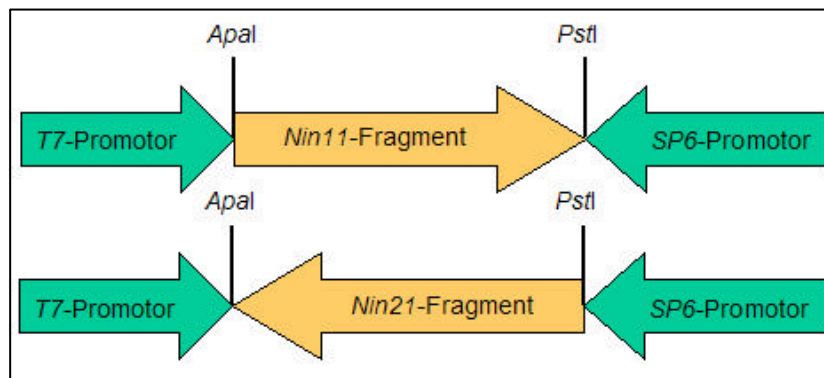


Abbildung 2-27: Schematische Darstellung der Konstrukte zur *in vitro* RNA-Synthese.

Als Probenmaterial für die *in-situ*-Hybridisierungen wurde Griffelmaterial von *N. tabacum* 'SR1' verwendet. Dazu wurden die Blüten kurz vor der Anthese emaskuliert und nach dem vollständigen Aufblühen wurde ein Teil der Blüten von Hand bestäubt. 4 Stunden nach der Bestäubung wurden sowohl unbestäubte, als auch bestäubte Griffel geerntet und sofort fixiert. Die Aufarbeitung der Proben und die Durchführung der Hybridisierungen erfolgte nach 4.4.1. Nach Beendigung der Farbreaktion wurden die Präparate unter dem Binokular betrachtet.

Die Hybridisierung mit *Nin11*- und *Nin21*-Antisense-RNA führte zu einem sehr starken Signal im Bereich des gesamten Durchlassgewebes. Sowohl in unbestäubten, als auch in bestäubten Griffeln konnte das Signal mit gleicher Intensität nachgewiesen werden (Abbildung 2-28 A, B, D und E). Expression der putativen vac-INV *Nin21* wurde zudem in Zellen des Narbengewebes detektiert (Abbildung 2-28 F). In einigen Präparaten, sowie in der Sense-Kontrolle (Abbildung 2-28 A – C), wurden starke Signale im Bereich der Leitbündel nachgewiesen. Dabei handelte es sich jedoch um Artefakte, da Sonden-RNA in diesen Geweben eingeschlossen wurde und nicht durch RNase-Behandlung und Waschschrte entfernt werden konnte.

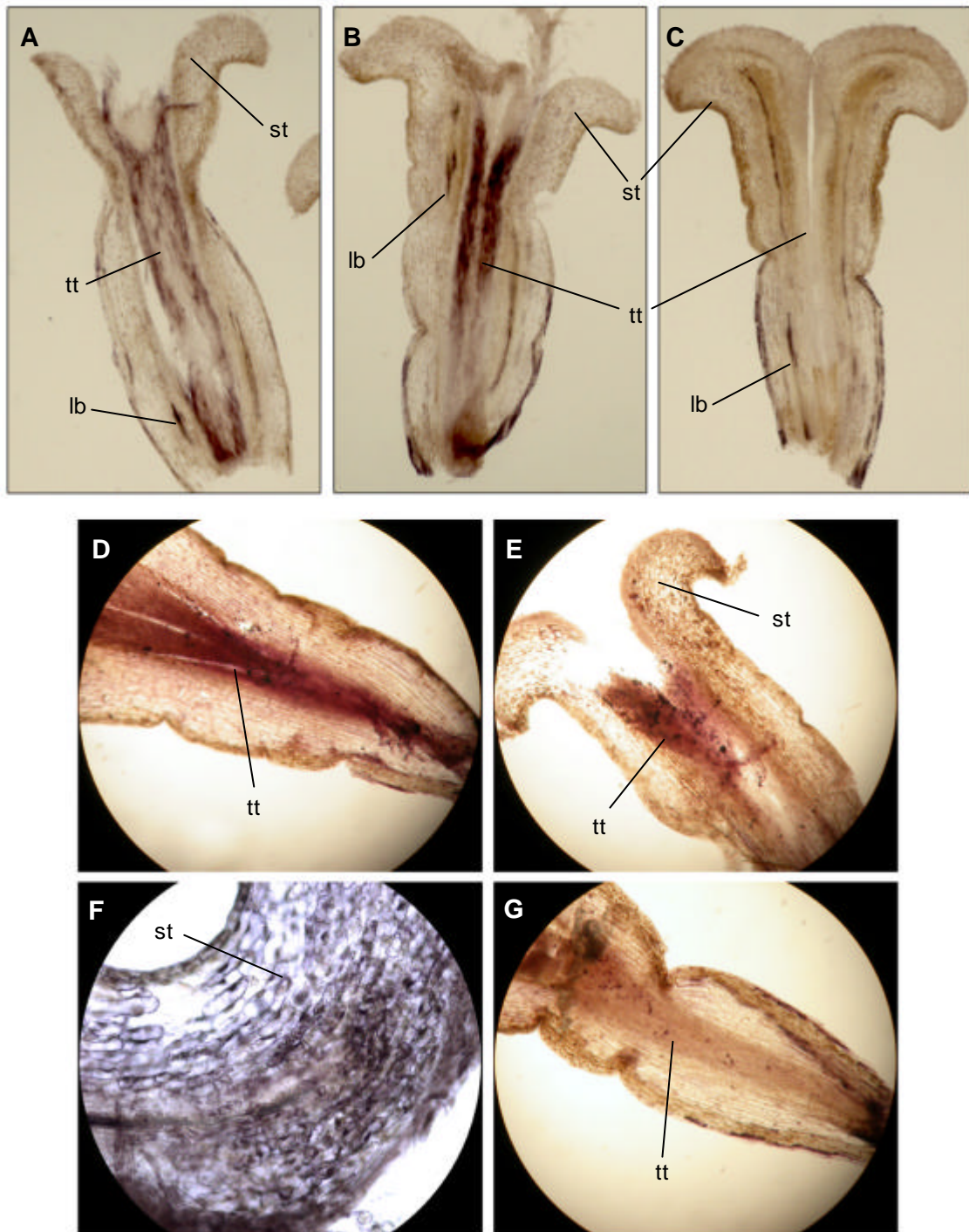


Abbildung 2-28: *In-situ*-Hybridisierungen von Tabakgriffeln. Hybridisierungen: *Nin11-Antisense* (A+B), *Nin11-Sense* (C), *Nin21-Antisense* (D-F), *Nin21-Sense* (G). Abgebildet sind Schnitte aus unbestäubten (A+D) und bestäubten Griffeln (B, C, E, F, G). lb = Leitbündel, st = Narbe, tt = Durchlassgewebe.

2.3.3 Hemmung der Invertaseaktivität im Stempel von *N. tabacum*

Das Wachstum der Pollenschläuche erfolgt zielgerichtet von der Narbe zu den Ovarien. Die daran beteiligten Signalsubstanzen sind jedoch weitgehend unbekannt. Als mögliche Signalmoleküle kommen z. B. verschiedene Kohlenhydrate in Betracht, da Pflanzenzellen bestimmte Saccharide, bzw. Konzentrationsverhältnisse verschiedener Zucker identifizieren können (1.3). Im Rahmen der folgenden Versuche sollte deshalb untersucht werden, ob cw-INV's an der Generierung dieser Zuckersignale beteiligt ist. Um die cw-INV-Aktivität möglichst unspezifisch zu hemmen, wurde auf die Expression des proteinogenen Invertase-Inhibitors *NtCIF* aus *N. tabacum* zurückgegriffen.

2.3.3.1 Herstellung der Konstrukte und Erzeugung der transgenen *N. tabacum*-Pflanzen

Die Herstellung der Konstrukte für die Transformation von *N. tabacum* 'SR1' erfolgte nach den gängigen molekularbiologischen Verfahren. Die verwendeten DNA-Sequenzen wurden dafür entweder aus DNA oder cDNA amplifiziert bzw. aus bereits vorhandenen Plasmiden mittels Restriktionsenzymen entfernt und in die entsprechenden Vektoren ligiert. Nach Fertigstellung der binären Vektoren erfolgte eine Plasmid-Midipräparation und die anschließende Transformation der Vektoren in *Agrobacterium tumefaciens* 'LBA4404'.

Die Konstrukte (Tabelle 2-8) wurden mittels Agrobakterien-vermitteltem Gentransfer in *N. tabacum* (4.2.2.2) transformiert. Die putativ transgenen Pflanzen wurden nach Protokoll selektiert und mittels PCR-Analyse identifiziert.

2.3.3.2 Spezifische Reduzierung der Invertaseaktivität im Narbengewebe

Um zu untersuchen, ob eine Reduzierung der Invertaseaktivität im weiblichen Narbengewebe einen Einfluss auf die Keimung der Pollen und das erste Pollenschlauchwachstum hat, wurde der Promotor des narbenspezifischen Gens *STIG1* aus Tabak kloniert. Bereits Goldman *et al.* (1994) konnten mit Hilfe von Reporterlinien die gewebespezifische Aktivität des *STIG1*-Promotors zeigen.

Tabelle 2-8: Übersicht über die generierten Konstrukte und transgenen Pflanzenlinien zur griffelspezifischen Expression in *N. tabacum*.

Transgene Pflanzenlinie	Konstrukt	Plasmid	Nachgewiesen durch Primer	Größe des Amplifikats	Anzahl transgener Pflanzen	Klonierung durch Primer	Vektoren siehe
NT117	<i>STIG1::GUS</i>	pJHStig1G	Stig1-Pr-F2 Gus-R	526 bp	44	Stig1-Pr-F Stig1-Pr-R	6.1.6
NT118	<i>STIG1::NtCtF</i>	pJHStig1NTCI	Stig1-Pr-F2 NPK18	421 bp	30	Ntc winh-F2 Ntc winh-R	6.1.7
NT119	<i>SK2-3::GUS</i>	pJHSK2-3G	SK2-Pr-F2 GUS-R	421 bp	13	SK2-Pr-F SK2-Pr-R	6.1.8
NT120	<i>Sat-SK2-7::GUS</i>	pJHSat-SK2-7G	SK2-Pr-F2 GUS-R	427 bp	0	SK2-Pr-F SK2-Pr-R	6.1.8
NT121	<i>SK2-3::NtCtF</i>	pJHSK2-3NTCI	SK2-Pr-F2 Ntc winh-R	759 bp	11	-	6.1.9
NT122	<i>Sat-SK2-7::NtCtF</i>	pJHSat-SK2-7NTCI	SK2-Pr-F2 Ntc winh-R	755 bp	16	-	6.1.9

2.3.3.2.1 Analyse der transgenen *STIG1*-Tabakpflanzenlinien

2.3.3.2.1.1 Analyse der Promotoraktivität mittels *GUS*-Reporterpflanzen

Zum Nachweis der gewebespezifischen Promotoraktivität von *STIG1* wurden *GUS*-Färbungen an verschiedenen Pflanzen der Linie NT117 (Tabelle 2-8) durchgeführt. Dazu wurden Griffel verschiedener Entwicklungsstadien und andere Pflanzengewebe geerntet und über Nacht bei 37 °C in *GUS*-Färbelösung inkubiert (4.4.3). Vor der Inkubation wurden die Griffel mit einem Skalpell in zwei Hälften geschnitten, um die *GUS*-Färbung besser detektieren zu können.

In den untersuchten transgenen Pflanzenlinien konnte an den Griffeln in der Narbenregion *GUS*-Färbung unterschiedlicher Intensität nachgewiesen werden. Die Färbung beschränkte sich dabei immer auf den Bereich der Narbe und endete am oberen Beginn des Durchlassgewebes (Abbildung 2-29). Vergleichende Färbungen mit Wildtyp-Griffeln zeigten keine Färbungen in den entsprechenden Gewebebereichen. Somit konnte die gewebespezifische Aktivität des *STIG1*-Promotors nachgewiesen werden.

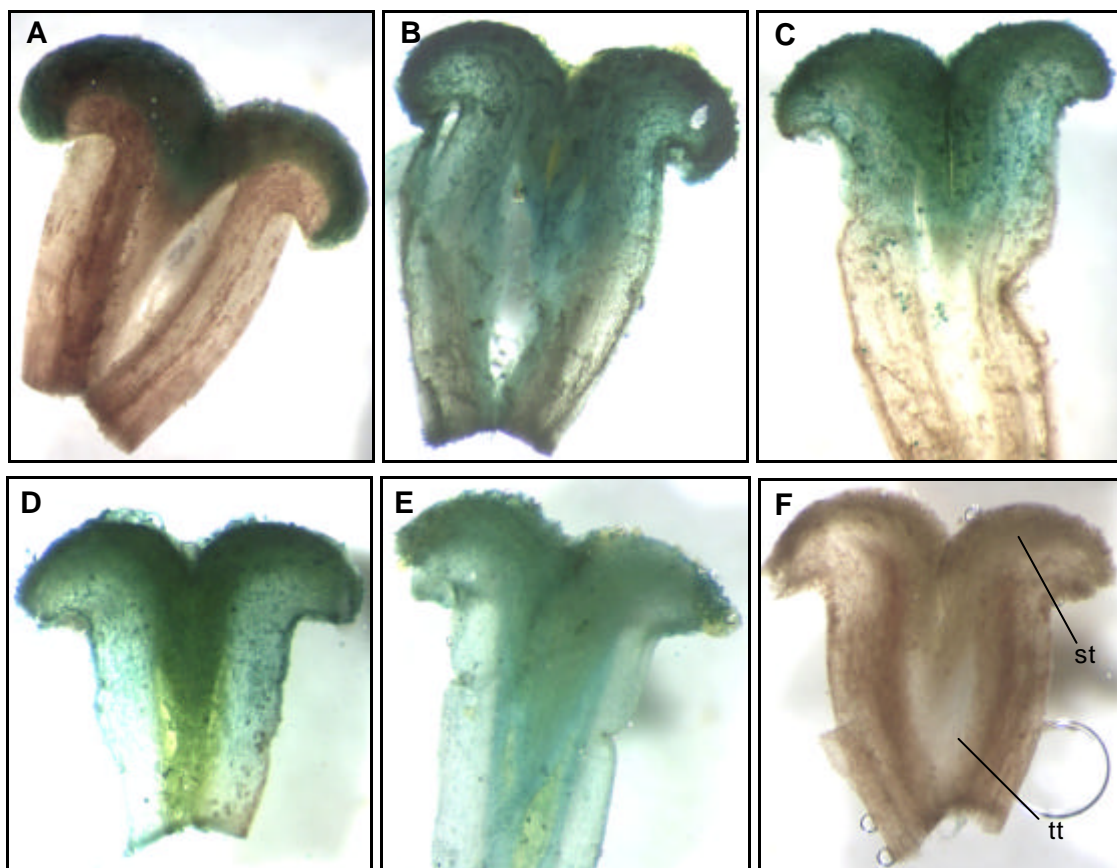


Abbildung 2-29: *GUS*-Färbung von Griffelgewebe transgener NT117-Reporterlinien. NT117-1-14 (A), NT117-1-18 (B), NT117-1-21 (C), NT117-1-24 (D), NT117-1-36 (E) und SR1 (F). st = Narbe, tt = Durchlassgewebe.

Die Färbungen von Griffeln aus unterschiedlichen Blüten-Entwicklungsstadien (nach Koltunow *et al.*, 1990) zeigten eine starke Farbintensität und somit eine starke *STIG1*-Aktivität in sehr jungen Griffeln und eine nachlassende Aktivität in älter werdendem Griffelgewebe (Abbildung 2-30).

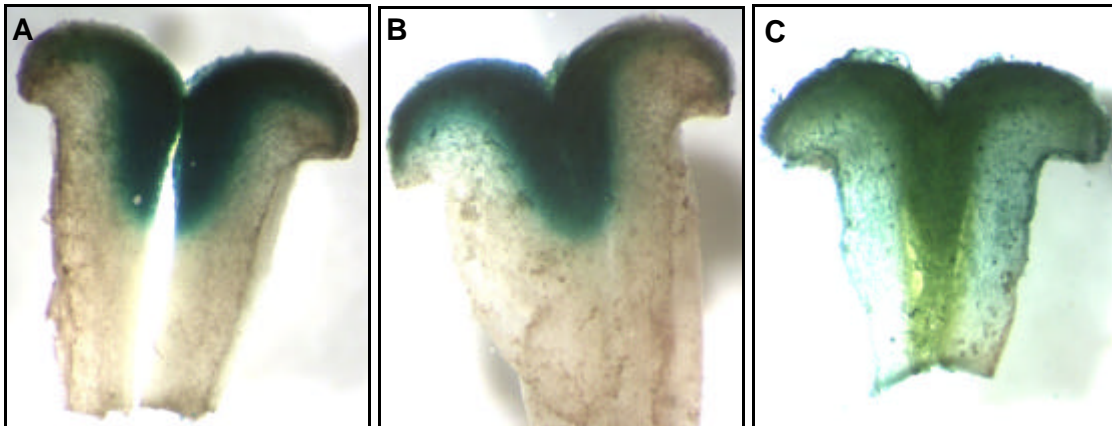


Abbildung 2-30: GUS-Färbungen von Griffeln unterschiedlicher Blütenentwicklungsstadien der Reporterlinie NT117-1-24. Stadium 4 (A), Stadium 8 (B) und Stadium 12 (C).

2.3.3.2.1.2 Analyse der *STIG1::NtCIF*-exprimierenden Tabakpflanzen

Zur Analyse des Pollenschlauchwachstums *in vivo* wurden Blüten der verschiedenen NT118-Linien (Tabelle 2-8), sowie Blüten des Wildtyps als Kontrolle, vor dem Aufplatzen der Antheren emaskuliert. Nach dem vollständigen Öffnen der Blüten wurden diese mit Pollen der jeweiligen transgenen Pflanze bestäubt. Am nächsten Tag wurden die Griffel der Blüten geerntet und mit Hilfe einer Rasierklinge in dünne Scheiben geschnitten und fixiert. Die Anfärbung der im Gewebe befindlichen Pollenschläuche wurde mit Anillinblau durchgeführt (4.4.4).

In Abbildung 2-31 ist eine Auswahl der untersuchten transgenen Linien dargestellt. Unter dem UV-Licht war zu erkennen, dass die Pollen nach der Bestäubung auf der Narbenoberfläche zahlreich ausgekeimt waren und Pollenschläuche bildeten. Im Vergleich zum Wildtyp konnte kein Unterschied hinsichtlich der Pollenkeimung auf dem Narbengewebe und dem Pollenschlauchwachstum im Griffelgewebe selbst festgestellt werden. Die Pollenschläuche passierten ohne offensichtliche Richtungsänderungen oder Wachstumsverzögerungen das Narbengewebe und wuchsen zielgerichtet in das Durchlassgewebe ein. Die in Abbildung 2-31 erkennbaren Richtungsänderungen einzelner oder Gruppen von Pollenschläuchen sind auch beim Wildtyp wieder zu finden. Dieses im Vergleich zur Mehrheit der Pollenschläuche untypische Verhalten ist

auf die Präparation der Griffelschnitte zurückzuführen und in allen untersuchten Gewebeproben zu finden.

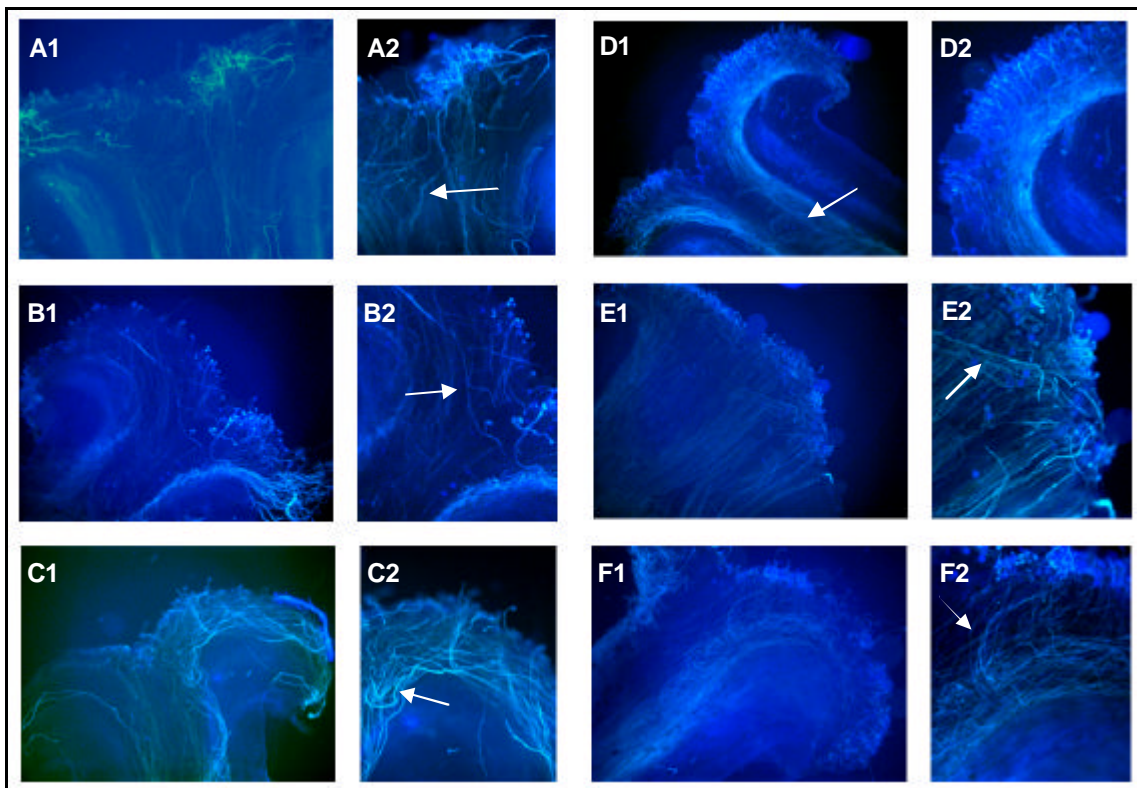


Abbildung 2-31: Anillinblaufärbung von Pollenschläuchen *in vivo* in verschiedenen transgenen Linien. (1) Aufnahmen bei 5-facher Vergrößerung. (2) Detailaufnahmen bei 10-facher Vergrößerung. NT118-1-14 (A); NT118-1-18 (B); NT118-2-14 (C); NT118-2-21 (D); NT118-2-25 (E), WT (F). Durch einen Pfeil markiert sind Artefakte des Pollenschlauchwachstums, entstanden durch die Aufarbeitung der Präparate.

2.3.3.3 Spezifische Reduzierung der Invertaseaktivität im Durchlassgewebe

Im Rahmen der folgenden Versuche sollte untersucht werden, ob die cw-INV's an der Generierung eines Zuckersignals im Durchlassgewebe der Griffel beteiligt sind. Zur spezifischen Expression des Invertase-Inhibitors *NtCIF* wurde der *SK2*-Promotor aus *Solanum tuberosum* kloniert, für den bereits Ficker *et al.* (1997) eine für das Durchlassgewebe spezifische Aktivität nachwies.

Zur Klonierung des Promotors wurden 2 unterschiedliche Kartoffelsorten herangezogen. Aus einer unbekanntem Sorte (kultiviert im Botanischen Garten Würzburg) wurde der *SK2-3*-Promotor amplifiziert und aus der Sorte 'Saturna' der Promotor *Sat-SK2-7*. Da kein Klon identifiziert wurde, der mit der veröffentlichten

Originalsequenz zu 100 % identisch war, wurde für die Herstellung der Konstrukte von jeder Kartoffelsorte diejenige Promotorsequenz ausgewählt, welche die größte Homologie zum Original aufwies (Homologien: *SK2-3* 92 %, *Sat-SK2-7* 98%).

2.3.3.3.1 Analyse der transgenen SK2-Tabakpflanzenlinien

2.3.3.3.1.1 Analyse der Promotoraktivität mittels GUS-Reporterpflanzen

Im Gegensatz zur Linie NT119 (*SK2-3::GUS*, Tabelle 2-8) konnten keine transgenen Pflanzen der Linie NT120 (*Sat-SK2-7::GUS*) identifiziert werden. Vermutlich war der Selektionsdruck während der Regeneration für diese Linie ungenügend, weshalb sich Wildtyp-Sprosse durchgesetzt hatten.

Zum Nachweis der gewebespezifischen Aktivität des *SK2-3*-Promotors wurden GUS-Färbungen mit verschiedenen Pflanzengeweben durchgeführt (4.4.3). Griffel verschiedener Entwicklungsstufen wurden geerntet, mit einer Rasierklinge längs halbiert und sofort in X-Gluc-Lösung inkubiert. Aber auch Pollen, Antheren, Kronblätter und Blätter wurden in Färbelösung mit X-Gluc über Nacht bei 37°C inkubiert und im Anschluss mehrere Tage mit 70 % EtOH entfärbt und schließlich unter dem Binokular betrachtet.

In Abbildung 2-32 sind Griffel verschiedener Reporterlinien abgebildet. In den einzelnen transgenen Linien konnte eine unterschiedlich starke *GUS*-Expression nachgewiesen werden. So ist die Intensität der *GUS*-Färbung in den Linien NT119-3-13B und NT119-3-23 im Vergleich zu den anderen Linien sehr schwach ausgeprägt (Abbildung 2-32 E – H). Die Färbung konnte im Griffelgewebe jedoch spezifisch nur im Durchlassgewebe nachgewiesen werden. Bereits in jüngeren Entwicklungsstadien der Griffel zeigte der Promotor im Durchlassgewebe starke Aktivität (Abbildung 2-32 C+D). In Reporterlinien mit einer verringerten *GUS*-Expression zeigte sich auch eine entsprechend verringerte *GUS*-Färbung im Gewebe.

Zur Untersuchung der Promotoraktivität im männlichen Reproduktionsgewebe der Pflanzen wurden GUS-Färbungen an Pollen und Pollenschläuchen durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden die Pollen zunächst bei 26 °C in Pollenkeimungsmedium mit 290 mM Saccharose zum Keimen gebracht (4.4.2) und nach 2,5 Stunden in GUS-Färbelösung überführt. Nach einer Inkubation bei 37 °C über Nacht wurden die Pollenschläuche unter dem Mikroskop betrachtet. Im Vergleich zum Wildtyp zeigte sich eine deutliche Blaufärbung der Pollen und der Pollenschläuche (Abbildung 2-33). Die Intensität der *GUS*-Färbungen in Griffeln und Pollen war in den jeweiligen Linien vergleichbar. So zeigte die Reporterlinie NT119-3-7 mit einer starken Färbung des

Durchlassgewebes auch eine starke Farbintensität der Pollen und Pollenschläuche, während Line NT119-3-13B mit einer geringen GUS-Expression im Griffel auch nur eine sehr geringe GUS-Färbung in den Pollen bewirkte. In den untersuchten Pflanzen konnte nicht in allen Pollen und Pollenschläuchen einer Blüte GUS-Aktivität nachgewiesen werden.

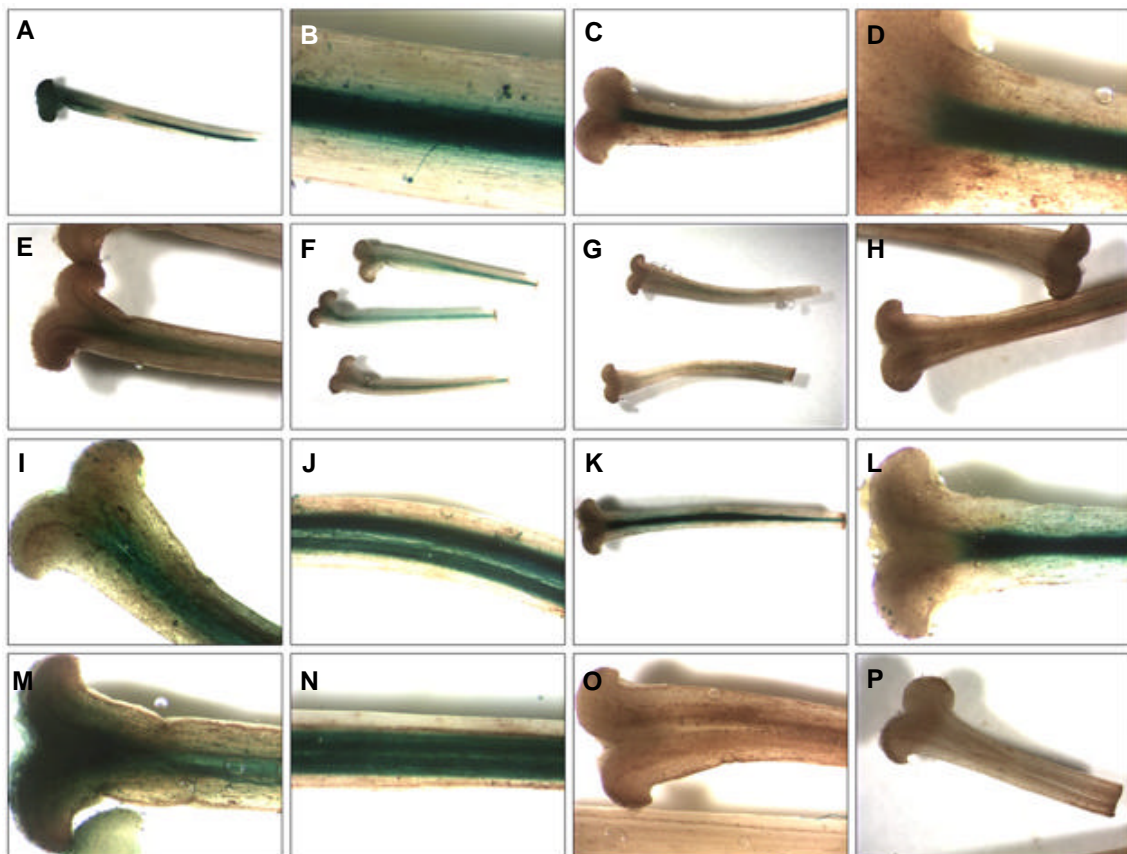


Abbildung 2-32: GUS-Expression unter Kontrolle des SK2-3-Promotors in verschiedenen transgenen Tabaklinien. NT119-3-7 (A-D), NT 119-3-13B (E); NT 119-3-23 (F-H); NT119-3-28 (I, J); NT119-3-34 (K, L); NT119-3-40 (M, N); NT120-1-33 (O); WT (P); Dargestellt ist Griffelgewebe des Entwicklungsstadiums 12, außer: Stadium 8 (G) und Stadium 4 (C, D, H).

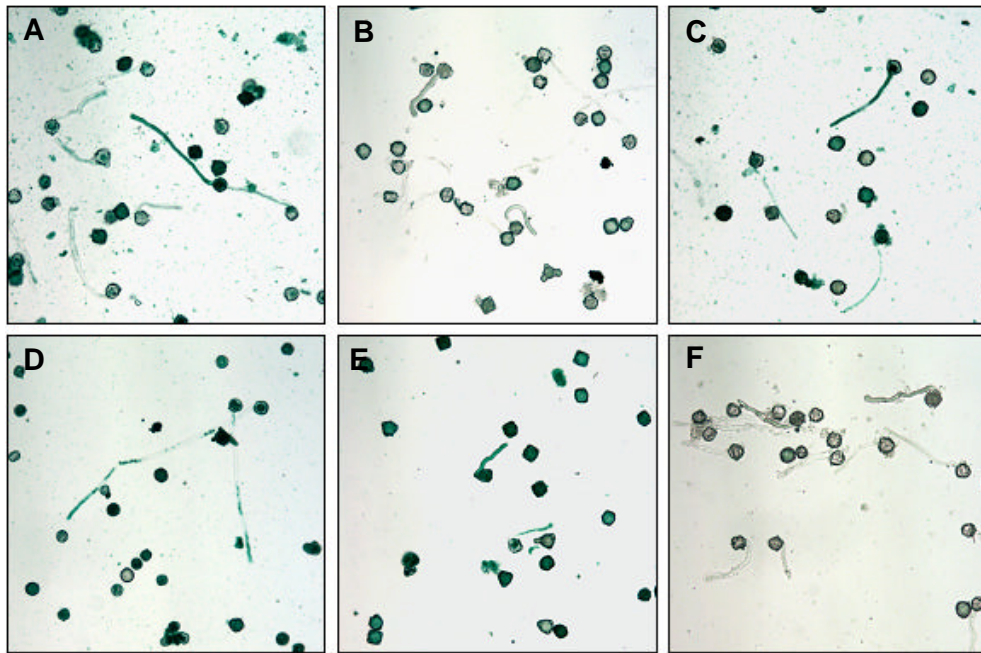


Abbildung 2-33: GUS-Expression von Pollen und Pollenschläuchen verschiedener transgener *SK2-3::GUS*-Linien. NT119-3-7 (A), NT119-3-13B (B), NT 119-3-23 (C), NT199-3-28 (D), NT119-3-40 (E), SR1 (F).

2.3.3.3.1.2 Analyse der *NtCIF*-exprimierenden Tabakpflanzen

Zur Analyse des Pollenschlauchwachstums im *NtCIF*-exprimierenden Gewebe von Pflanzen der Linien NT121 (*SK2-3::NtCIF*) und NT122 (*Sat-SK2-7::NtCIF*, Tabelle 2-8) wurden zunächst die zu untersuchenden Blüten vor dem Öffnen emaskuliert. Nach vollständigem Aufblühen wurden die Griffel mit Pollen der jeweiligen Linie bestäubt und ca. 20 Stunden nach dem Bestäuben geerntet. Die Griffel wurden mit einer Rasierklinge in Scheiben geschnitten, fixiert und die Pollenschläuche durch Färbung mit Anillinblau (4.4.4) sichtbar gemacht. Die Präparate wurden unter dem Mikroskop mit UV-Licht betrachtet.

Abbildung 2-34 zeigt eine Auswahl von Griffelpräparaten verschiedener untersuchter transgener Linien. 20 Stunden nach dem Aufbringen der Pollen auf die Narben hatten die Pollenschläuche sehr zahlreich das Narbengewebe bereits zu einem großen Teil durchdrungen. Im Vergleich zum Wildtyp (Abbildung 2-34 H) konnte jedoch bei allen untersuchten Linien keine Veränderung des Pollenschlauchwachstums beobachtet werden. Trotz der spezifischen Aktivität der *SK2*-Promotoren im Durchlassgewebe führte die Expression des Invertase-Inhibitors *NtCIF* in diesem Gewebe zu keiner Veränderung des Pollenschlauchwachstums. Alle Pollenschläuche wuchsen zielgerichtet und geradlinig in Richtung Fruchtknoten und zeigten keinerlei ungezieltes Wachstum, verursacht durch eine Störung in der Pollenschlauch-Leitung. Das

Auftreten von nicht geradlinigen Pollenschläuchen wurde durch die Probenaufarbeitung verursacht (Abbildung 2-34 A1, C2, E1).

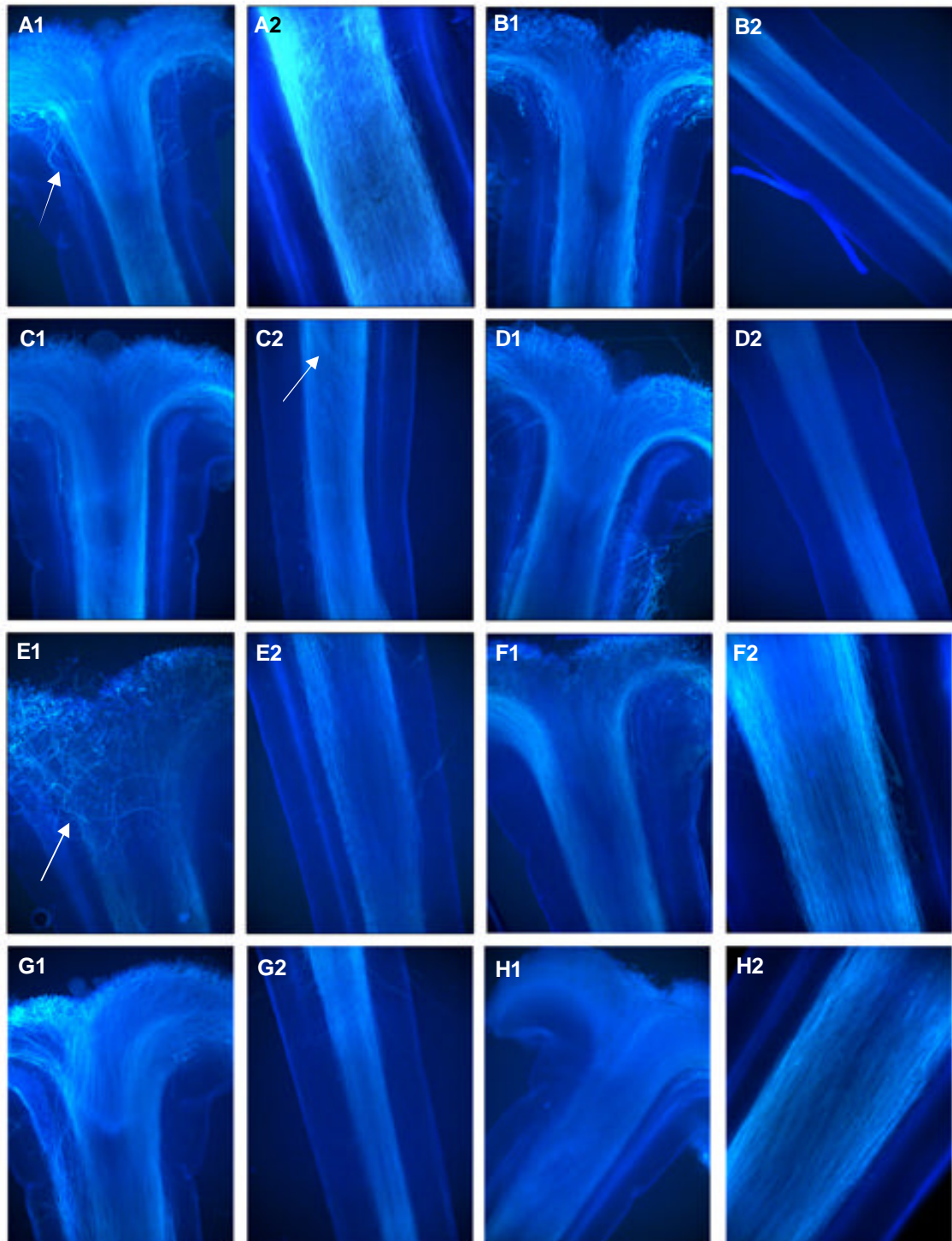


Abbildung 2-34: Anillinblaufärbung von Pollenschläuchen *in vivo* in verschiedenen transgenen Linien (NT121=*SK2-3::NtCIF*, NT122=*Sat-SK2-7::NtCIF*). (1) Aufnahmen von Narbe und oberer Region des Durchlassgewebes. (2) Aufnahmen des Durchlassgewebes im zentralen Bereich des Griffels. NT121-1-4 (A); NT121-1-15 (B); NT121-1-32 (C); NT122-1-22 (D); NT122-1-35 (E), NT122-1-36 (F), NT122-2-4 (G), SR1 (H). Durch einen Pfeil sind einen Artefakte des Pollenschlauchwachstums markiert, entstanden durch die Aufarbeitung der Präparate.

Um abzuklären, warum sich das Pollenschlauchwachstum im Durchlassgewebe trotz spezifischer Expression des Invertase-Inhibitors *NtCIF* nicht veränderte, wurden Northern-Analysen durchgeführt. Für den Promotor *SK2-3* in Reporterlinie NT119 konnte zwar eine starke Aktivität im Durchlassgewebe gezeigt werden (2.3.3.3.1.1). Da jedoch keine transgenen NT120-Pflanzen generiert wurden, konnte die Aktivität des Promotors *Sat-SK2-7* mittels GUS-Analysen nicht aufgeklärt werden. Zudem bestand die Möglichkeit, dass trotz der Aktivität des Promotors eine Expression von *NtCIF* z. B. durch Gene-Silencing verhindert wurde und somit kein Invertase-Inhibitor zur Reduzierung der Invertase-Aktivität im Gewebe vorhanden war. Außerdem hatten frühere Untersuchungen zur Expression der Invertasen-Familie aus Tabak (2.3.2.1) gezeigt, dass im befruchteten Griffel 6 verschiedene Invertasen exprimiert werden. Im Rahmen von Northern-Analysen sollte daher aufgeklärt werden, ob das Expressions-Verhältnis der cw-INV's im Griffel zur Expression von *NtCIF* ausreicht, um eine effiziente Reduzierung der Invertase-Aktivität zu bewirken.

Zur Untersuchung der Expressionsstärke von *NtCIF*, *NtVIF* sowie der beiden stellvertretenden cw-INV's aus dem befruchteten Griffelgewebe, *Nin88* und *Nin11*, in verschiedenen Linien von NT121 und NT122, wurde RNA aus Pollenschläuchen, unbestäubten Griffeln und Griffeln 4 Stunden nach der Bestäubung gewonnen (4.3.1.3). Je 15 µg RNA wurde auf einem denaturierenden Agarosegel aufgetrennt und anschließend auf eine Nylonmembran geblottet (4.3.13). Die Membranen wurden mit ³²P-markierten DNA-Sonden hybridisiert und 2 Tage auf einem Screen exponiert.

In der Northern-Analyse ausgewählter Linien der Transformationen NT121 und NT122 (Abbildung 2-35 bis 2-39) zeigte sich die verhältnismäßige Expression der untersuchten Gene zueinander. Während der natürlich in *N. tabacum* vorhandene Invertase-Inhibitor *NtVIF* sehr gering in bestäubten und unbestäubten Griffeln exprimiert wurde, konnte ein sehr stark gesteigertes Expressionsniveau von *NtCIF* im Griffelgewebe der transgenen Pflanzen, im Vergleich zum Wildtyp (Abbildung 2-39), nachgewiesen werden.

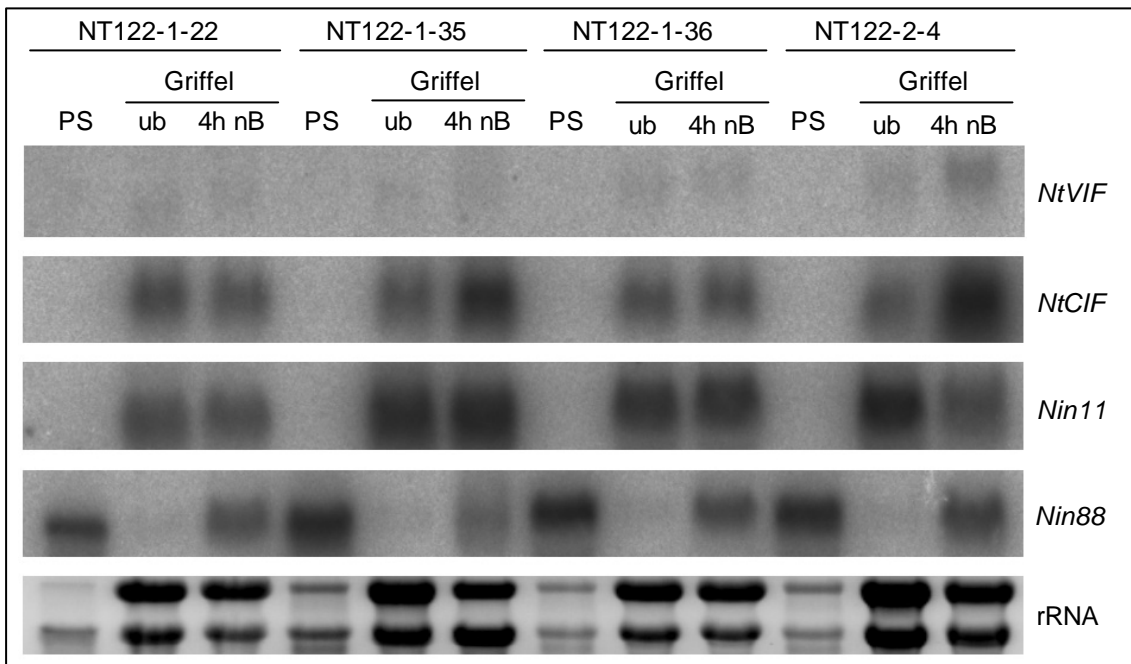


Abbildung 2-35: Northern- Analyse verschiedener NT122-Linien (*Sat-SK2-7::NtCIF*). Untersucht wurde die Expression der Invertase-Inhibitoren *NtVIF* und *NtCIF* im Vergleich zur Transkriptmenge der extrazellulären Invertasen *Nin11* und *Nin88*. Je Spur wurden 15 µg RNA aufgetragen. Die Expositionszeit betrug 2 Tage.

Obwohl in den Reporterlinien NT119 eine Aktivität des Promotors *SK2-3* auch in Pollen und Pollenschläuchen bestätigt wurde (Abbildung 2-33), konnte in Northern-Analysen keine erhöhte Transkriptmenge des exprimierten Invertase-Inhibitors *NtCIF* nachgewiesen werden. Auch eine Expression des Invertase-Inhibitors *NtVIF* wurde weder in transgenen Pflanzen, noch im Wildtyp festgestellt (Abbildung 2-39). Im übrigen Pflanzengewebe war nur in den Wurzeln eine erhöhte *NtVIF*-Transkriptmenge nachweisbar, während *NtCIF* sehr gering in Blättern und offenen Blüten (Stadium 12) detektierbar wurde (Abbildung 2-38).

Die nachgewiesene *NtCIF*-RNA aus den Blüten stammte dabei vermutlich aus dem Griffelgewebe, worauf Abbildung 2-39 schließen lässt. *Nin88* wurde sehr stark in Pollenschläuchen und bestäubtem Griffelgewebe exprimiert. Da keine *Nin88*-RNA in unbestäubtem Gewebe nachweisbar war, stammte diese RNA im bestäubten Griffelgewebe höchstwahrscheinlich aus den eingedrungenen Pollenschläuchen. Die Invertase *Nin11* war in den transgenen Linien, ebenso wie im Wildtyp, ausschließlich im Griffelgewebe lokalisiert. Neben den Invertasen *Nin88* und *Nin11* wurden noch die beiden cw-INV's *Nin77* und *Ntβfruc1* im bestäubten Griffelgewebe exprimiert. Weiterhin konnten hohe Transkriptmengen der vac-INV's *Nin21* und *Nt-VI* in diesem Gewebe nachgewiesen werden (Abbildung 2-26).

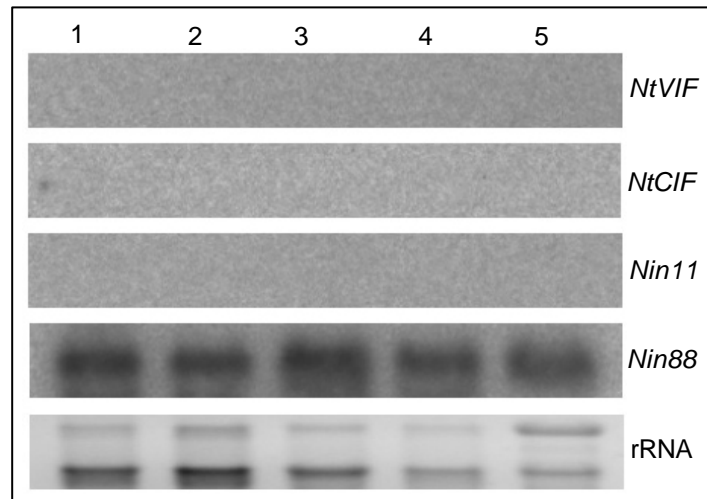


Abbildung 2-36: Northern-Analyse von Pollenschlauch-RNA verschiedener NT121-Linien (*SK2-3::NtCIF*). Untersucht wurde die Expression der Invertase-Inhibitoren *NtVIF* und *NtCIF* im Vergleich zur Transkriptmenge der extrazellulären Invertasen *Nin11* und *Nin88*. NT121-1-4 (1), NT121-1-14 (2), NT121-1-19 (3), NT121-1-32 (4), SR1 (5). Je Spur wurden 7,5 µg RNA aufgetragen. Die Expositionszeit betrug 2 Tage.

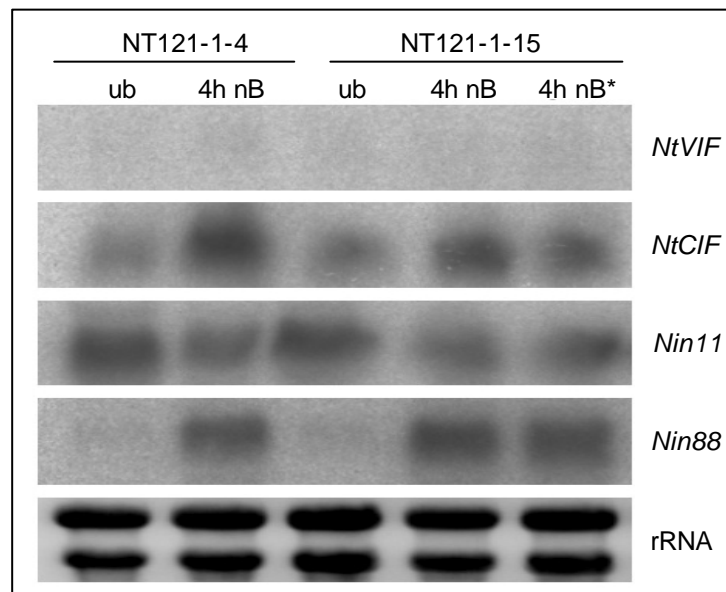


Abbildung 2-37: Northern-Analyse verschiedener NT121-Linien (*SK2-3::NtCIF*). Untersucht wurde die Expression der Invertase-Inhibitoren *NtVIF* und *NtCIF* im Vergleich zur Transkriptmenge der extrazellulären Invertasen *Nin11* und *Nin88*. Je Spur wurden 15 µg RNA aufgetragen. Die Expositionszeit betrug 2 Tage. *Bestäubung mit WT-Pollen.

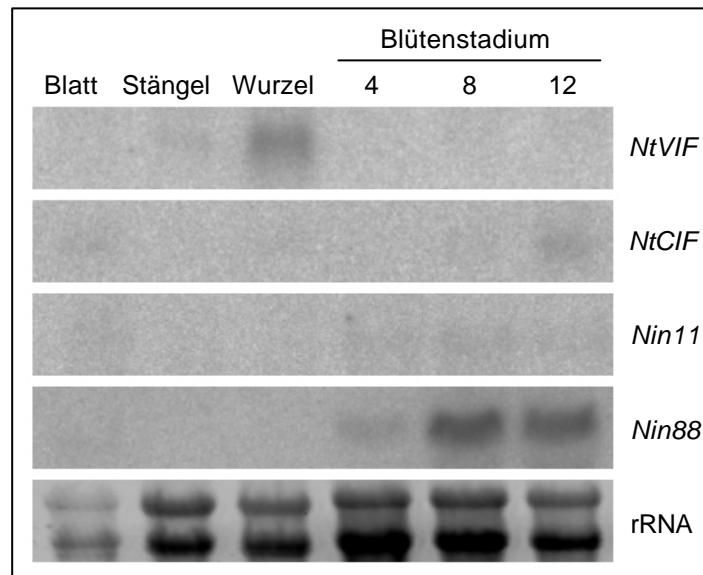


Abbildung 2-38: Expressionsprofile der Invertase-Inhibitoren *NtVIF* und *NtCIF* im Vergleich zu den extrazellulären Invertasen *Nin88* und *Nin11* in verschiedenen Geweben von *N. tabacum* 'SR1'. Pro Spur wurden 15 µg RNA aufgetragen. Die Expositionszeit betrug 2 Tage.

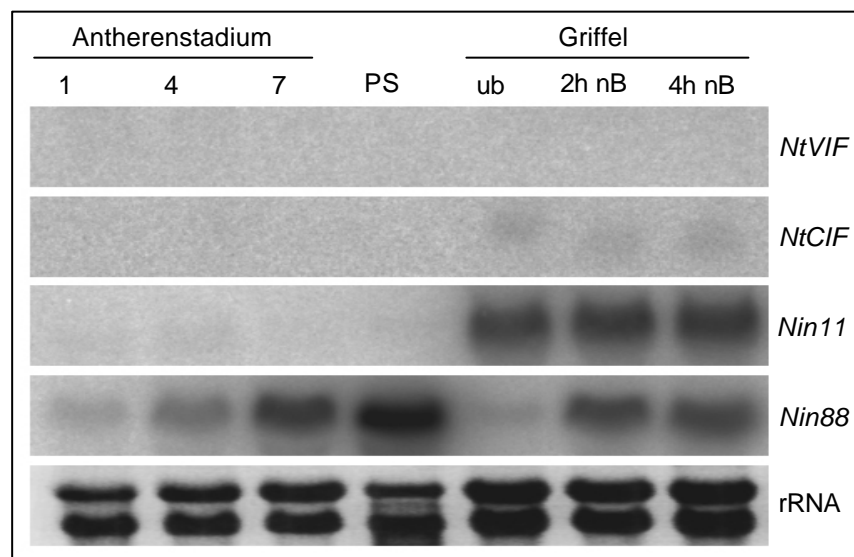


Abbildung 2-39: Expressionsprofile der Invertase-Inhibitoren *NtVIF* und *NtCIF* im Vergleich zu den extrazellulären Invertasen *Nin88* und *Nin11* in Antheren und Griffeln von *N. tabacum* 'SR1'. Pro Spur wurden 15 µg RNA aufgetragen. Die Expositionszeit betrug 2 Tage.

2.4 Die Pollenkeimung als Modell zum Verständnis des Zucker-Signaling in Pflanzen

Kohlenhydrate haben neben ihrer Funktion als Energieträger auch die Eigenschaft, als Signalmoleküle verschiedenste physiologische Prozesse in den Zellen zu beeinflussen (1.3). Im Rahmen der folgenden Experimente sollte der Einfluss verschiedener Kohlenhydrate auf den Vorgang der Pollenkeimung und des Pollenschlauchwachstums untersucht werden, um Mechanismen des Zucker-Signaling in Pflanzen aufzuklären.

2.4.1 *Arabidopsis thaliana*

Zur Analyse des Einflusses verschiedener Kohlenhydrate auf Pollenkeimung und Pollenschlauchwachstum in *Arabidopsis* wurden Pollenkeimungsanalysen nach 4.4.2 durchgeführt. Da Saccharose der Haupttransportzucker in *Arabidopsis* ist, diente Pollenkeimungsmedium mit 440 mM Saccharose als Kontrolle. Andere zu untersuchende Mono- und Disaccharide wurden ebenfalls in einer Konzentration von 440 mM dem Pollenkeimungsmedium zugefügt, bzw. in einer Konzentration von 60 bzw. 6 mM zusätzlich zur Saccharose (440 mM) beigemischt. Nach einer Inkubationszeit von 20 Stunden bei 26 °C wurde die Anzahl der gekeimten Pollen von der Gesamtmenge aller vorhandenen Pollen bestimmt.

In Abbildung 2-40 ist der Einfluss verschiedener Monosaccharide auf die Pollenkeimungsfähigkeit von Col-0 dargestellt. Wurde die Saccharose durch 440 mM Hexosen ersetzt, zeigte sich eine starke Inhibierung der Pollenkeimung. Lediglich bei 440 mM Glucose bzw. Mannitol konnte die Bildung von Pollenschläuchen beobachtet werden. Im Saccharose-Medium nahm der Anteil nicht gekeimter Pollen mit sinkender Zugabe der Hexosen ab (60 mM → 6 mM). Während bei 6 mM Mannitol, Sorbose und Sorbitol kein Unterschied mehr zur Kontrolle beobachtet wurde, zeigten die Monosaccharide Fructose, Glucose, Galactose und Mannose auch bei diesen niedrigen Konzentrationen eine zum Teil sehr starke Hemmung der Pollenkeimung. Es war auffallend, dass die Spaltungsprodukte der Saccharose, Glucose und Fructose, die Pollenkeimungsfähigkeit verringerten. Auch die Kombination von gleichen Teilen Glucose und Fructose (je 220 bzw. 440 mM) führte zu einer sehr starken Inhibition der Pollenkeimung (Daten nicht gezeigt).

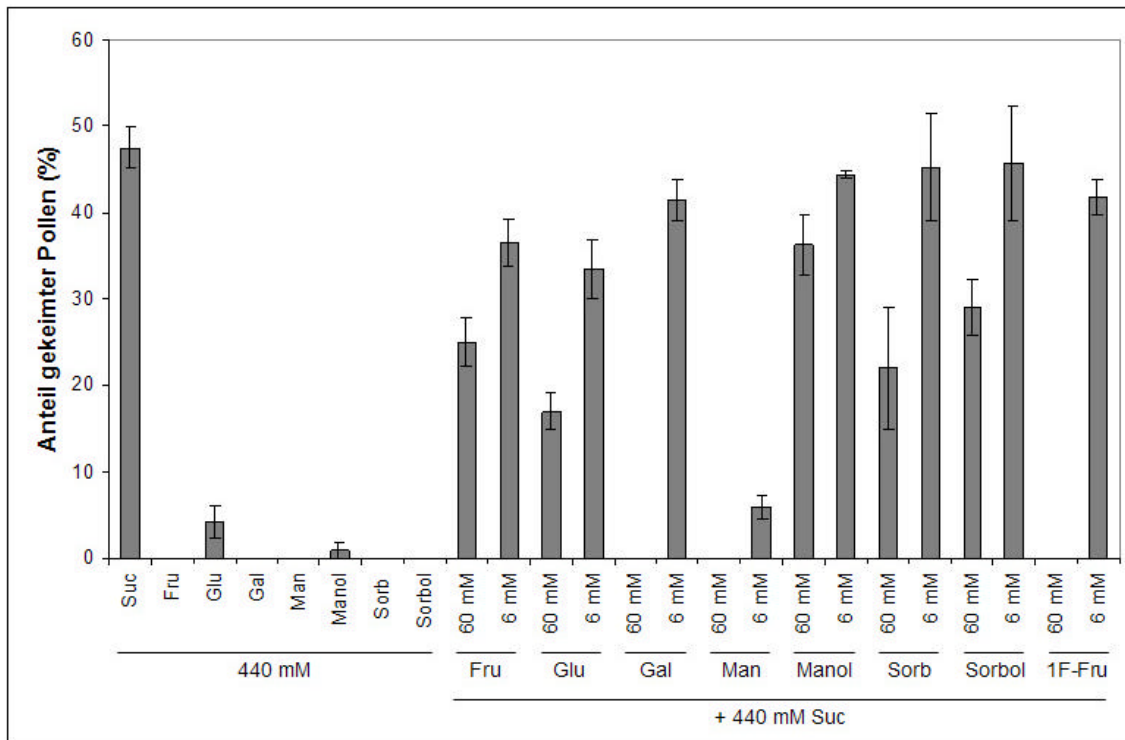


Abbildung 2-40: Einfluss verschiedener Monosaccharid-Konzentrationen auf die Pollenkeimung von Col-0.

Der Einfluss von Di- und Oligosacchariden auf die Pollenkeimung unterschied sich zum Teil deutlich vom Einfluss der Monosaccharide (Abbildung 2-41). Während die Pollenkeimung auf Medien mit 440 mM der Zweifachzucker Cellobiose, Maltose und Saccharose stark gefördert wurde, führten Lactose, Leucrose, Melibiose und Trehalose nur zu sehr geringen Keimungsraten (<10 %). DAF III, Lactulose, Turanose und die Disaccharid-Alditole unterstützten die Pollenkeimung nicht und auch der Austausch von OH-Gruppen durch Cl-Gruppen (Sucralose, Dichlorosaccharose) führte zu einem vollständigen Ausbleiben der Pollenkeimung. Die aus Saccharose abgeleiteten Oligosaccharide (Melezitose, Raffinose und Stachyose) bewirkten jedoch sehr hohe Keimungsraten. Im Gegensatz zu Hexosen führte die Beimengung von 6 mM der untersuchten Di- und Oligosaccharide zum Saccharose-Medium (440 mM) zu keiner Veränderung der Pollenkeimungsfähigkeit, unabhängig vom Einfluss dieser Mehrfachzucker bei alleiniger Verabreichung (Abbildung 2-41).

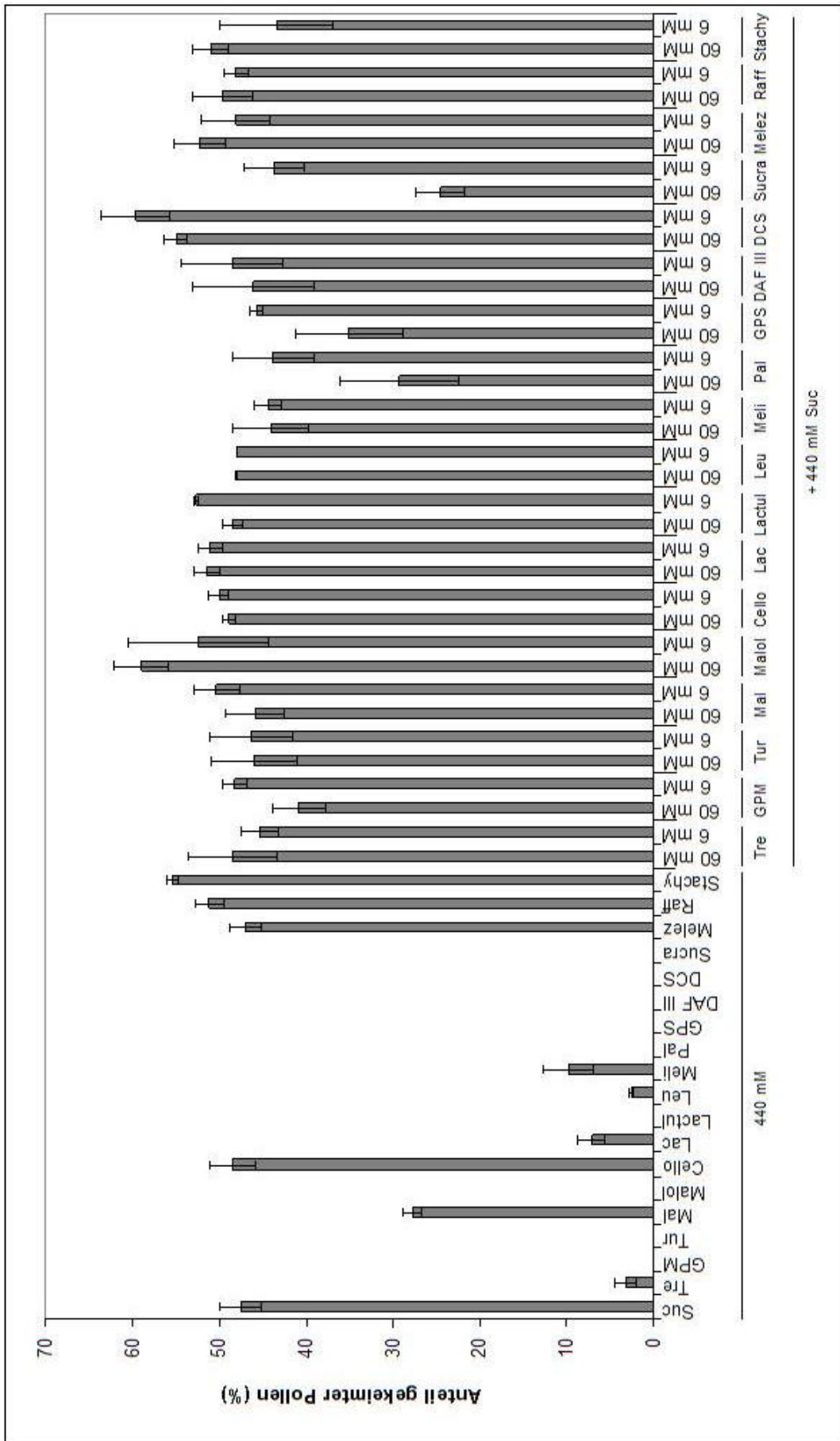


Abbildung 2.41: Einfluss verschiedener Di- und Oligosaccharid-Konzentrationen auf die Pollenkeimung von Col-0.

2.4.1.1 Glucose und Mannose inhibieren die Pollenkeimung über Hexokinase-vermitteltes Zucker-Signaling

Um den Einfluss der Hexokinase an der Glucose- und Mannose-vermittelten Inhibition der Pollenkeimung zu untersuchen, wurden Pollenkeimungsexperimente mit dem Hexokinase-Inhibitor Mannoheptulose durchgeführt. Dieser wurde mit 100 mM im Überschuss dem Pollenkeimungsmedium mit 440 mM Saccharose und 6 mM Glucose bzw. Mannose zugefügt. Die Auswertung der Experimente ergab, dass die Zugabe von Mannoheptulose zu einer vollständigen Aufhebung der Glucose-vermittelten Inhibition der Pollenkeimung führte. Zudem konnte durch Mannoheptulose die Keimungsrate unter Mannose-Einfluss von 6 % auf 30 % deutlich erhöht werden (Abbildung 2-42).

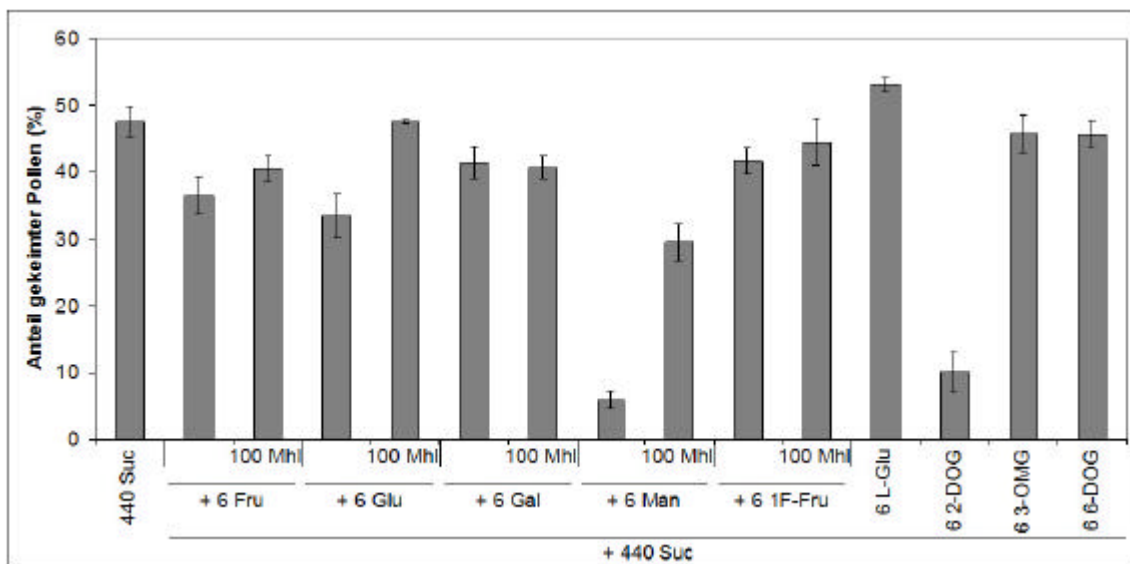


Abbildung 2-42: Einfluss von Mannoheptulose (Mhl) auf die Glucose (Glu)- und Mannose (Man)-vermittelte Inhibition der Pollenkeimung sowie der Einfluss verschiedener Glucose-Analoga unter 440 mM Saccharose (Suc). Angegebene Konzentrationen in mM.

Um die Beteiligung der Hexokinase an der Glucose- bzw. Mannose-vermittelten Inhibition der Pollenkeimung genauer zu untersuchen, wurde der Einfluss von Glucose-Analoga auf die Keimung von *Arabidopsis*-Pollen untersucht. Zu diesem Zweck wurden folgende Substanzen in 6 mM Konzentration dem Kontrollmedium zugefügt: L-Glucose, 2-Desoxy-Glucose (2-DOG), 3-O-Methyl-Glucose (3-OMG) und 6-Desoxy-Glucose (6-DOG). In Abbildung 2-42 ist der Einfluss der verschiedenen Analoga auf die Pollenkeimungsfähigkeit dargestellt. Wie erwartet konnte die Glucose-vermittelte Inhibition der Pollenkeimung durch L-Glucose nicht erzielt werden, da diese Hexose nicht in die Zelle transportiert wird. Ebenso führten 3-OMG und 6-DOG (keine Substrate der Hexokinase) nicht zu veränderten Keimungsraten, im Vergleich zur Kontrolle. Nur 2-DOG, das von der Hexokinase phosphoryliert werden kann, führte zu

einer starken Inhibierung der Pollenkeimungsrate, vergleichbar zur Mannose-vermittelten Inhibition.

Zur Bestätigung der Hexokinase-abhängigen Inhibition der Pollenkeimung, worauf die Experimente mit Mannoheptulose und den Glucose-Analoga hinwiesen, wurden Pollen der *HXK1*-ko-Mutante *gin2-1* und *gin2-2* (Moore *et al.*, 2003) eingesetzt (Abbildung 2-43 A und B).

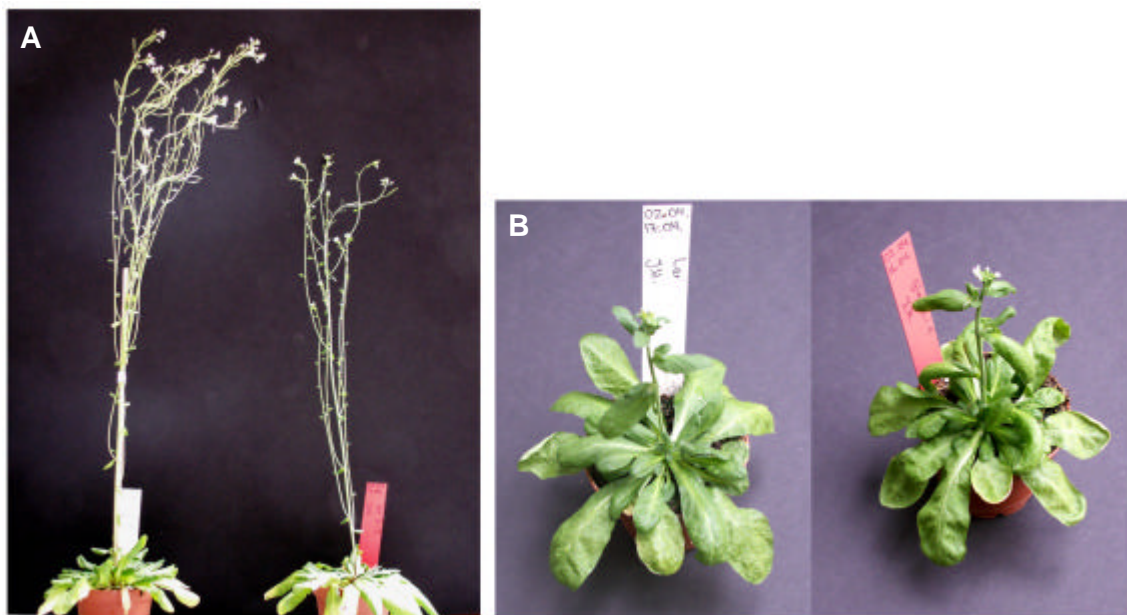


Abbildung 2-43: Phänotypen der verwendeten Mutanten im Vergleich mit ihren korrespondierenden Wildtypen. Links jeweils Wildtyp, rechts Mutante. Col-0 und *gin2-2* (A) sowie Ler und *gin2-1* (B).

Das Pollenkeimungsvermögen dieser Mutanten wurde mit der Pollenkeimung der korrespondierenden Wildtypen Ler bzw. Col-0 verglichen. Bei der Auswertung der Pollenkeimungsexperimente zeigte sich, dass sich die Pollenkeimungsfähigkeit nicht nur der beiden Wildtypen, sondern auch die der Mutanten von ihren jeweiligen Wildtypen unterschied (Abbildung 2-44). Auch die untersuchten Hexosen beeinflussten die Pollenkeimung der einzelnen Linien unterschiedlich stark. Um jedoch den Einfluss der eingesetzten Monosaccharide auf die Pollenkeimungsfähigkeit der verschiedenen Linien miteinander vergleichen zu können, wurden die ermittelten Prozentwerte der einzelnen Zuckervarianten auf die Saccharose-Kontrolle bezogen. Diese Verhältniswerte der Mutanten wurden wiederum auf die Verhältniswerte der jeweiligen Wildtypen bezogen (Abbildung 2-45), um eine Aussage über fördernde oder hemmende Eigenschaften des untersuchten Zuckers, im Vergleich zum Wildtyp, machen zu können.

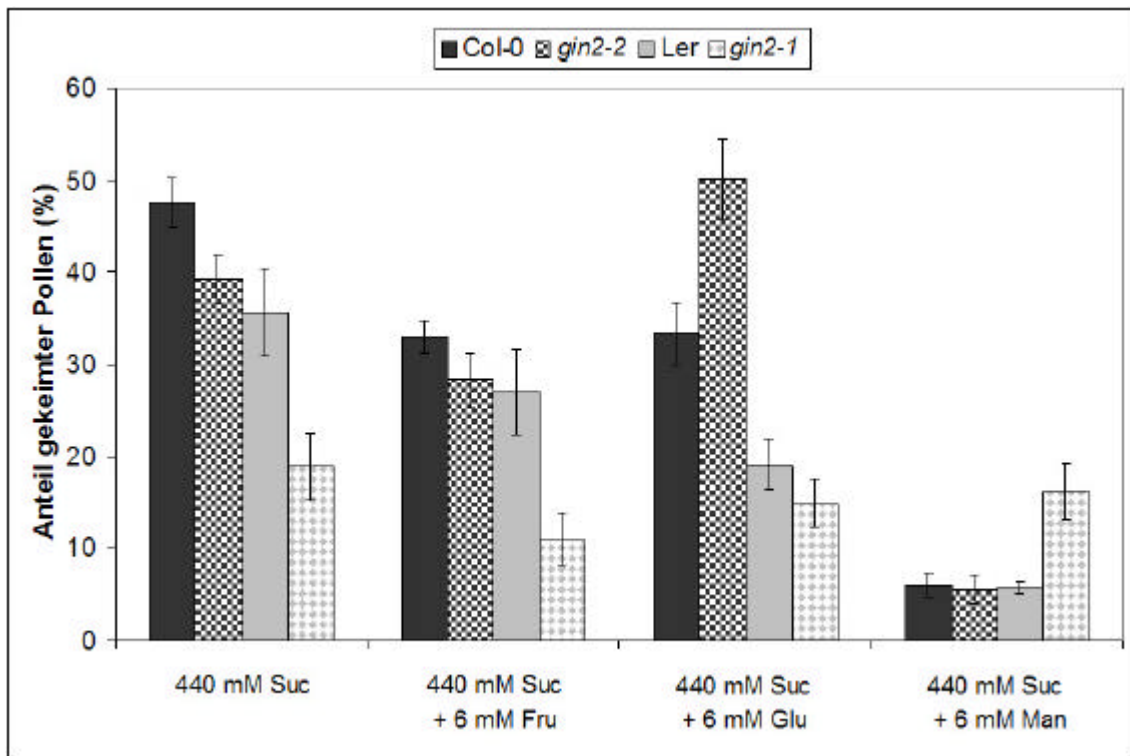


Abbildung 2-44: Einfluss verschiedener Hexosen auf die Pollenkeimung unter 440 mM Saccharose (Suc) der Mutanten *gin2-1* und *gin2-2*, sowie ihrer korrespondierenden Wildtypen Ler bzw. Col-0.

Die erhaltenen Quotienten ließen eine Aussage hinsichtlich des Effekts des untersuchten Zuckers in Bezug auf die Kontrolle zu: $Q_{PK} < 1$: Pollenkeimung der Mutante schlechter als Wildtyp; $Q_{PK} = 1$: Pollenkeimung der Mutante entsprechend Wildtyp; $Q_{PK} > 1$: Pollenkeimung der Mutante besser als Wildtyp.

$$\text{Quotient Pollenkeimung } (Q_{PK}) = \frac{PK_{\text{Mutante}}(\text{Zucker}) / PK_{\text{Mutante}}(\text{Suc})}{PK_{\text{WT}}(\text{Zucker}) / PK_{\text{WT}}(\text{Suc})}$$

Abbildung 2-45: Formel zur Berechnung der Pollenkeimungsverhältnisse der untersuchten Mutanten zu ihren korrespondierenden Wildtypen.

Die bereits von Moore *et al.* (2003) beschriebenen Eigenschaften der beiden untersuchten *gin*-Mutanten konnten auch bezüglich der Pollenkeimung bestätigt werden. So führte der Ausfall des Hexokinase-vermittelten Zucker-Signalings zu einer Glucose-insensitiven Pollenkeimung auf Medien mit 6 mM Glucose (Abbildung 2-46).

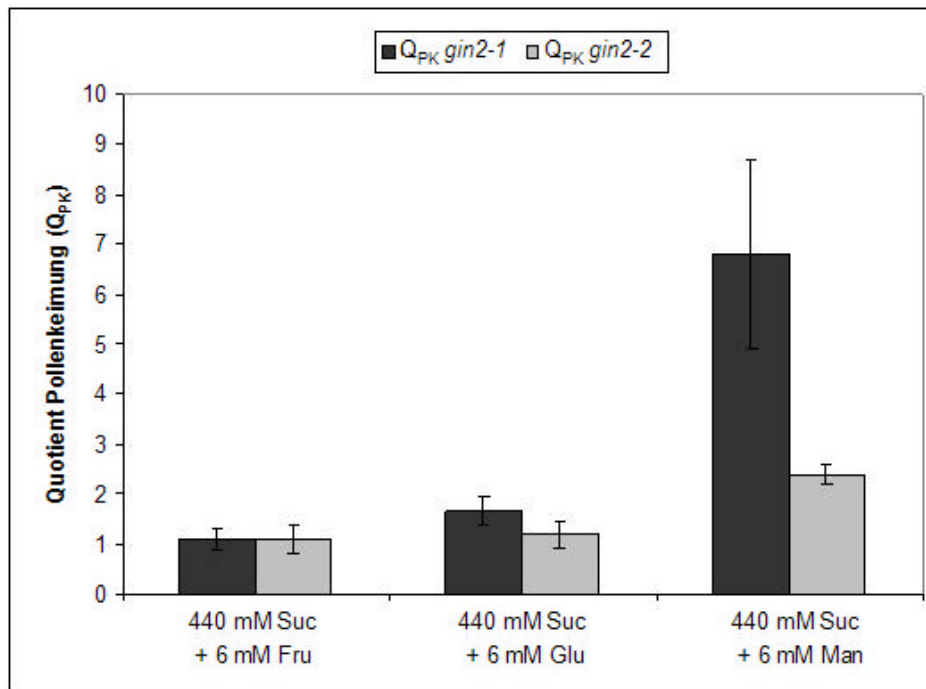


Abbildung 2-46: Einfluss der Hexosen Fructose (Fru), Glucose (Glu) und Mannose (Man) unter 440 mM Saccharose (Suc) auf die Pollenkeimungsquotienten (Q_{PK}) der Mutanten *gin2-1* und *gin2-2*.

Einen noch stärkeren Effekt zeigte der Vergleich der Pollenkeimung von *gin2-1* (16,2 %) im Vergleich zum Wildtyp Ler (5,8 %) auf 6 mM Mannose-haltigem Saccharose-Medium. Mit einem daraus resultierenden durchschnittlichen Q_{PK} von 6,8 keimten die Pollen von *gin2-1* in Anwesenheit von 6 mM Mannose fast so effizient wie in Saccharose allein (18,9 %), während Pollen des Wildtyps Ler auf reinem Saccharose-Medium eine Keimungsrate von 35,6 % erreichten. Den deutlichsten Hexokinase-Effekt zeigte im Vergleich der beiden *gin*-Mutanten dabei *gin2-1*. Bei dieser Mutante wichen die Q_{PK} von Glucose und Mannose stark von der Kontrolle ab, während sich *gin2-2* nur bei 6 mM Mannose deutlich von der Kontrolle unterschied (Q_{PK} 2,4). Beide Mutanten wurden jedoch von 6 mM Fructose ebenso in der Keimung gehemmt, wie die Wildtypen, was die ermittelten Q_{PK} -Werte von jeweils 1 belegen.

Wie bereits für Col-0 gezeigt, führte die Zugabe von 3-OMG bzw. 6-DOG zum Saccharose-Medium auch bei Ler und den beiden *gin*-Mutanten zu keiner veränderten Pollenkeimung. Beide Mutanten verhielten sich wie die Wildtypen. Aber auch nach Applikation von 2DOG unterschied sich die Pollenkeimungsfähigkeit der Mutanten nicht von den korrespondierenden Wildtypen, wie der Q_{PK} -Wert zeigt. 2DOG führte somit auch in den *gin*-Mutanten zu einer Inhibition der Pollenkeimung (Abbildung 2-47).

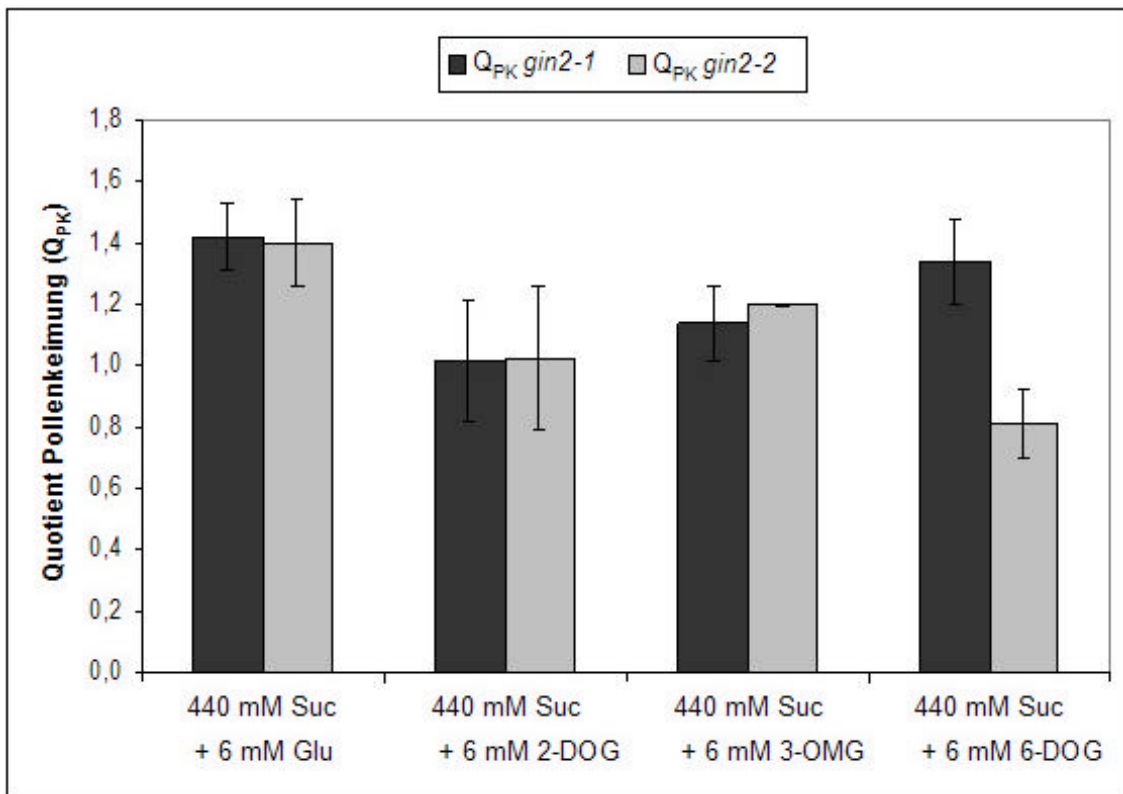


Abbildung 2-47: Einfluss der untersuchten Glucose-Analoga unter 440 mM Saccharose (Suc) auf die Pollenkeimungsquotienten (Q_{PK}) der Mutanten *gin2-1* und *gin2-2*.

2.4.1.2 Beteiligung Hexokinase-unabhängiger Signalwege während der Pollenkeimung

Hexokinasen weisen eine deutlich geringere Affinität zu Fructose und Galactose auf, als gegenüber Glucose und Mannose. Da diese Hexosen die Saccharose-vermittelte Pollenkeimung auch bei den *gin*-Mutanten inhibieren wurde untersucht, ob Mannoheptulose diese Inhibition verringern kann. Die Verabreichung von 100 mM des Hexokinase-Inhibitors bewirkte nur eine geringfügige Erhöhung der Pollenkeimungsrate unter 6 mM Fructose und 1F-Fructose von 36,5 auf 40,5 % bzw. von 41,7 auf 44,5 %. Ein Einfluss von Mannoheptulose auf die Galactose-vermittelte Inhibition wurde jedoch nicht festgestellt (Abbildung 2-42).

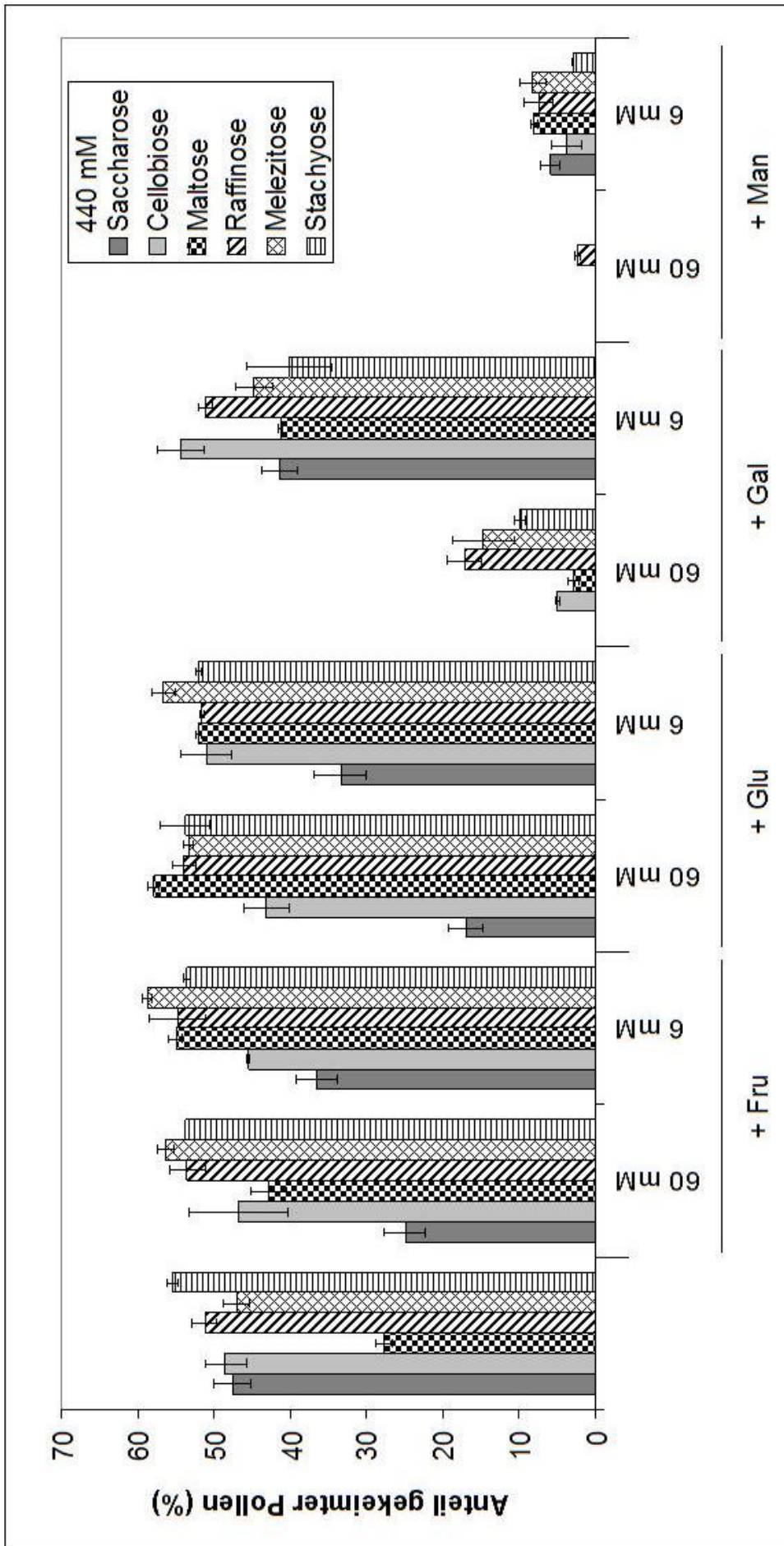


Abbildung 2.48. Vergleich des inhibierenden Potentials verschiedener Hexosen und Glucose-Analoga auf die von unterschiedlichen Di- und Oligosacchariden unterstützte Pollenkeimung.

Da auch Cellobiose, Maltose und die Oligosaccharide Raffinose, Melezitose und Stachyose die Pollenkeimung ohne Zugabe von Saccharose unterstützten, wurde die Inhibierung dieser nicht-Saccharose-vermittelten Pollenkeimung (440 mM) durch je 6 mM Fructose, Glucose, Galactose, Mannose (Abbildung 2-48) sowie der Glucose-Analoga (Daten nicht gezeigt) an Col-0-Pollen untersucht und mit dem Einfluss auf die Saccharose-vermittelte Pollenkeimung verglichen. Während die Zugabe von 60 bzw. 6 mM Fructose, Glucose und Galactose die Pollenkeimungsfähigkeit der Saccharose-vermittelten Keimung inhibierte, zeigten diese Hexosen keine Beeinflussung der Pollenkeimungsrate in Anwesenheit von 440 mM Cellobiose, Maltose oder der verwendeten Oligosaccharide. Im Gegensatz dazu bewirkten Mannose und 2DOG eine deutliche Hemmung der Pollenkeimungsrate sowohl in der Saccharose-, als auch in der nicht-Saccharose-vermittelten Pollenkeimung, während die nicht-phosphorylierbaren Glucose-Analoga 3-OMG und 6-DOG keinen Einfluss auf die Keimungsrate ausübten.

2.4.1.3 Zucker-abhängige Induktion blasenartiger Strukturen

Im Rahmen der Pollenkeimungsexperimente fiel, neben der Beeinflussung der Pollenkeimungsrate durch die unterschiedlichen Kohlenhydratquellen, auch eine phänotypisch strukturelle Veränderung der Pollen nach dem Quellvorgang auf. Bereits 1 Stunde nach Beginn des Pollenkeimungsexperiments zeigten die Pollen, je nach verwendetem Zucker, neben der Bildung von Pollenschläuchen auch eine unterschiedlich große Anzahl blasenartiger Strukturen (Abbildung 2-49 und Tabelle 2-9). Diese Blasen entwickelten sich jedoch nicht weiter. So konnte zu keiner Zeit beobachtet werden, dass sich aus den Blasen Pollenschläuche entwickelten. Pollen auf Saccharose-haltigem Medium entwickelten, neben zahlreichen Pollenschläuchen, auch einzelne Blasen. Diese Blasenbildung trat auch an Pollen auf, die bereits einen Pollenschlauch gebildet hatten. Auch auf Medien mit den Saccharose-Bausteinen Fructose und Glucose wurde eine sehr starke Blasenbildung beobachtet (Abbildung 2-49 B und C).

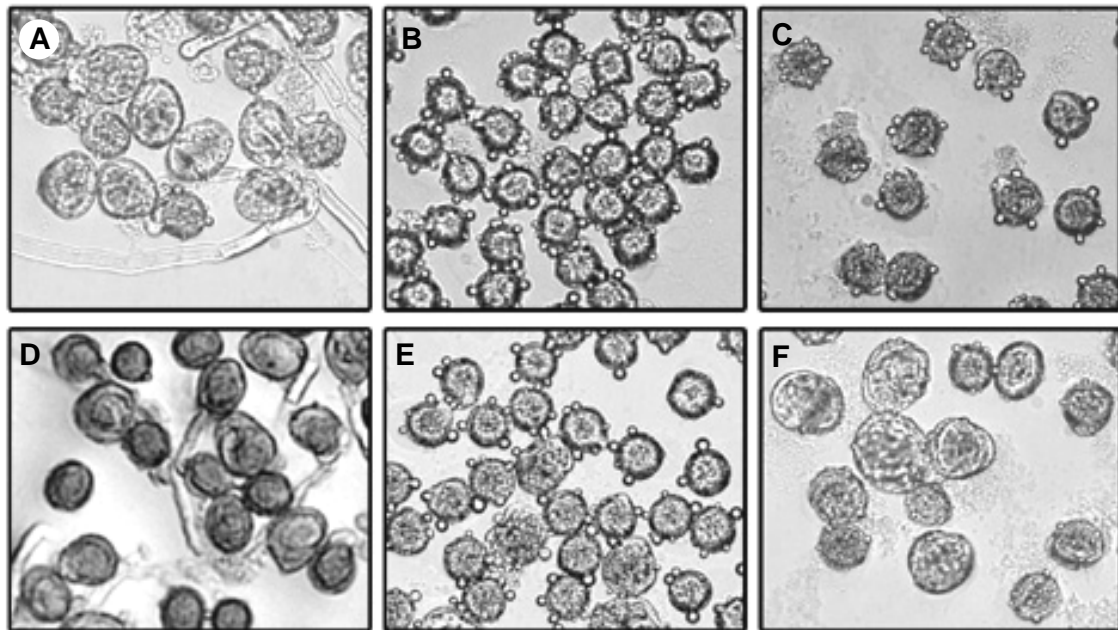


Abbildung 2-49: Einfluss verschiedener Kohlenhydrate auf die Ausbildung blasenartiger Strukturen an Pollen von Col-0 während der Pollenkeimung auf Medien mit je 440 mM: Saccharose (A), Fructose (B), Glucose (C), Cellobiose (D), Mannitol (E) und Negativkontrolle ohne Kohlenhydrate (F).

Die Blasenbildung wurde vor allem durch Einfachzucker im Pollenkeimungsmedium gefördert, während die untersuchten Di- und Oligosaccharide, mit Ausnahme von GPM und Palatinose, nur zu einer schwachen Blasenbildung führten (Tabelle 2-9). Die Osmolarität der verwendeten Medien als Ursache dieses Phänomens konnte ausgeschlossen werden, da zwar auch bei der Verwendung von Mannitol bzw. Sorbitol eine sehr starke Blasenbildung beobachtet, bei der Verwendung der Kohlenhydrate Cellobiose, Melezitose, Turanose und Sucralose jedoch keinerlei Blasenbildung nachgewiesen wurde. Während die Pollen auf Cellobiose und Melezitose zu hohen Prozentzahlen auskeimten, führte Sucralose zu einer vollständigen Inhibierung der Pollenschlauchbildung. Eine starke Blasenbildung geht daher immer mit einer stark verminderten Pollenschlauchbildung einher. Umgekehrt zeigt das Beispiel Sucralose, dass eine stark verminderte Pollenschlauchbildung nicht automatisch zur Blasenbildung führt. Weiterhin wurde beobachtet, dass sich die Blasenbildung reduzierte, wenn z. B. die Pollen auf Medium mit 440 mM Saccharose und 60 mM Fructose bzw. 6 mM Fructose inkubiert wurden. Je niedriger die Konzentration des blaseninduzierenden Zuckers in Anwesenheit von Saccharose gewählt wurde, desto weniger Blasen bildeten sich. Bei Zugabe eines Zuckers, der die Blasenbildung hemmte, wurde diese gegenüber dem reinen Saccharose-Medium weiter reduziert. Diese Reduktion erfolgte ebenfalls konzentrationsabhängig, d. h. bei 60 mM wurden stärkere Effekte beobachtet

als bei 6 mM. Dieser Einfluss konnte bei allen untersuchten Kohlenhydraten beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

Tabelle 2-9: Vergleich der Pollenkeimungsfähigkeit und der Blasenbildung während der Pollenkeimung auf verschiedenen Kohlenhydratquellen.

Zucker	440 mM		Zucker	Struktur	440 mM	
	Pollen-keimung	Blasen-bildung			Pollen-keimung	Blasen-bildung
H ₂ O	0	b	Disaccharide			
Monosaccharide			Trehalose	(α -D-Glc-(1 \rightarrow 1)- α -D-Glc)	+	b
Fructose	0	bbb	GPM	(α -D-Glc-(1 \rightarrow 1)-D-mannitol)	0	bb
Galactose	0	bb	Saccharose	(α -D-Glc-(1 \rightarrow 2)- β -D-Fru)	+++	b
Glucose	+	bb	Turanose	(α -D-Glc-(1 \rightarrow 3)- β -D-Fru)	+	0
Mannitol	0	bbb	Maltose	(α -D-Glc-(1 \rightarrow 4)- α -D-Glc)	++	b
Mannose	0	bb	Maltitol	(α -D-Glc-(1 \rightarrow 4)-D-sorbitol)	0	b
Sorbitol	0	bbb	Cellobiose	(β -D-Glc-(1 \rightarrow 4)-D- α -Glc)	+++	0
Sorbose	0	bbb	Lactose	(β -D-Gal-(1 \rightarrow 4)- β -D-Glc)	+	b
1F-Fru*	0	0	Lactulose	(β -D-Gal-(1 \rightarrow 4)- β -D-Fru)	0	b
			Leucrose	(α -D-Glc-(1 \rightarrow 5)- β -D-Fru)	+	b
			Melibiose	(α -D-Gal-(1 \rightarrow 6)-D-Glc)	+	0
			Palatinose	(α -D-Glc-(1 \rightarrow 6)- β -D-Fru)	0	bbb
			GPS	(α -D-Glc-(1 \rightarrow 6)-D-sorbitol)	0	b
			Sucralose	(1,6-Dichlor-1,6-dideoxy- β -D-Fru-4-chlor-4-deoxy- α -D-Gal)	0	0
			DAF III	α -D-Fru β -D-Fru 1,2':2,3'-Dianhydrid	0	0
			DCS	6-Chloro-6-deoxy-D-Glc- α -(1 \rightarrow 2)-6-chloro-6-deoxy-D- β -Fru	0	b

Pollenkeimung: +++ = sehr gut (= 40 %), ++ = gut (20 % - 40 %), + = schwach (= 20 %), 0 = keine Keimung;
 Blasenbildung: bbb = sehr stark (bis 12 Blasen/Pollen), bb = mittel (bis 6 Blasen/Pollen), b = schwach (bis 3 Blasen/Pollen), 0 = keine Blasenbildung;
 *höchste untersuchte Konzentration 60 mM (in 440 mM Saccharose).

Oligosaccharide			
Melezitose	(a-D-Glc-(1→3)-β-D-Fru-(2→1)-a-D-Glc)	+++	0
Raffinose	(a-D-Gal-(1→6)-a-D-Glc-(1→2)-β-D-Fru)	+++	b
Stachyose	(a-D-Gal-(1→6)-a-D-Gal-(1→6)-a-D-Glc-(1→2)-β-D-Fru)	+++	b

Zur genaueren Aufklärung der blasenartigen Strukturen wurden elektronenmikroskopische Aufnahmen der Pollen angefertigt. Dabei wurden Pollen verglichen, die entweder 20 Stunden auf 440 mM Saccharose (gute Pollenkeimung, kaum Blasenbildung) oder auf 440 mM Fructose (keine Pollenkeimung, starke Blasenbildung) inkubiert wurden (Abbildung 2-50 B – D). Während dehydrierter, reifer Pollen eine längliche Form und 3 Keimfalten aufwies (Abbildung 2-50 A) waren die Pollen auf den verschiedenen Pollenkeimungsmedien rehydriert und von runder Gestalt. An den Pollen auf Fructose-Medium waren deutliche Ausstülpungen zu erkennen, die aus den Keimfalten herausragten (Abbildung 2-50 C+D). Auch bei einigen Pollen auf Kontrollmedium mit Pollenschlauchbildung aus einer Keimfalte wurden Ausstülpungen aus den übrigen Keimfalten beobachtet (Abbildung 2-50 B).

Bei einer 12.000-fachen Vergrößerung der Pollen wurde deutlich, dass die blasenartigen Strukturen direkt aus den Keimfalten hervortreten und vermutlich aus Intine bestehen (Abbildung 2-50 D). Die transmissionselektronenmikroskopische Analyse des Querschnittes eines derartigen Pollenkorns (Abbildung 2-50 E) wies im Innern der Blasenregion Einschlüsse in großer Anzahl nach.

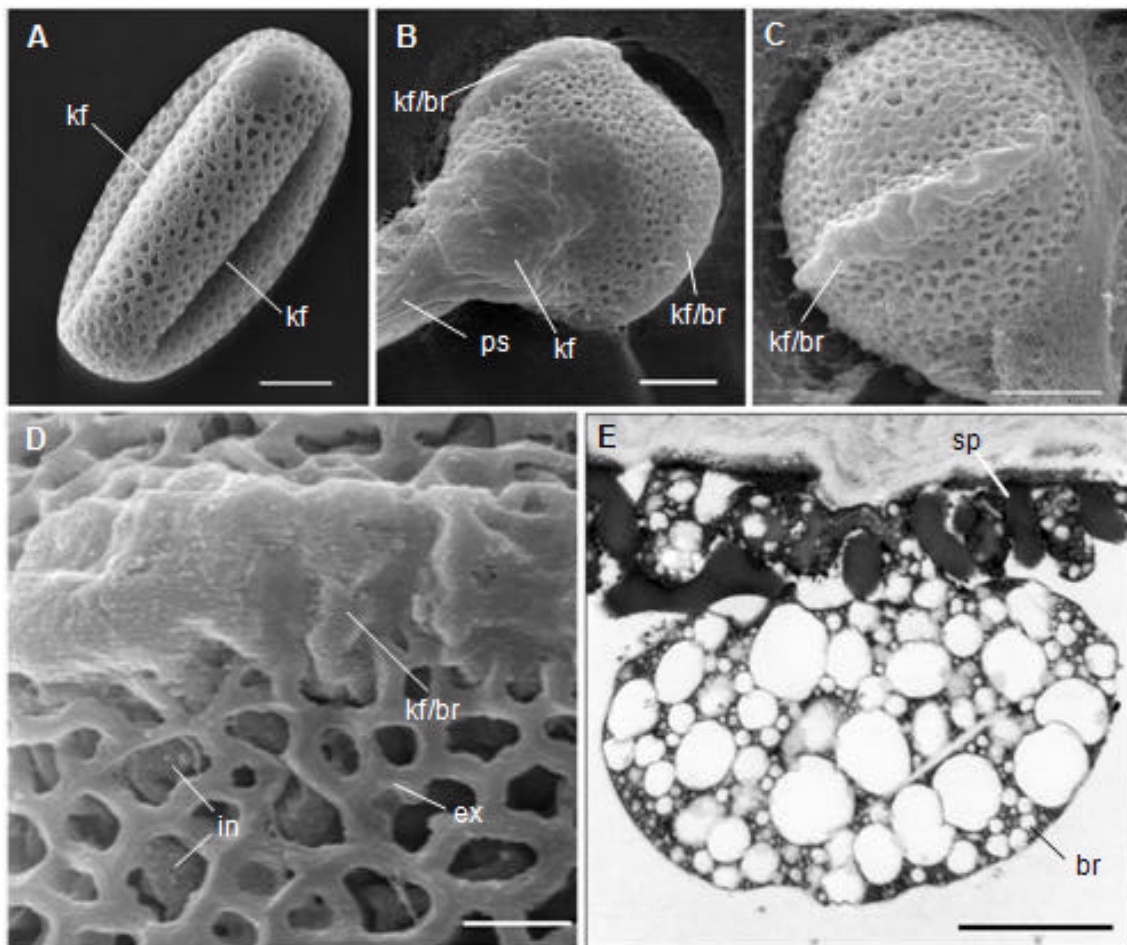


Abbildung 2-50: Raster- (A – D) und transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen (E) verschiedener *Arabidopsis*-Pollen. Reifer, dehydrierter Pollen (A), gekeimter Pollen mit Pollenschlauch auf Medium mit 440 mM Saccharose (B), Pollen auf 440 mM Fructose mit Blasenbildung (C), Detailaufnahme der Blasenregion eines Pollens auf Fructose-Medium (D), Querschnitt durch die Blasenregion mit zahlreichen Einschlüssen (E). br = Blasenregion, ex = Exine, in = Intine, kf = Keimfalte, ps = Pollenschlauch, sp = Sporopollenin. Größenstandards: A – C: 5 μ m, D + E: 1 μ m.

2.4.2 *Nicotiana tabacum*

Im Rahmen verschiedener Experimente wurde auch die Pollenkeimung von *N. tabacum* 'SR1' unter dem Einfluss verschiedener Kohlenhydratquellen untersucht. Die Experimente wurden nach 4.4.2 durchgeführt. Als Positivkontrolle diente hierbei die Pollenkeimung unter 290 mM Saccharose. Je nach Versuch schwankte bei allen Varianten die Pollenkeimung zwischen 25 und 50 %. Die Verwendung unterschiedlicher Kohlenhydrate als Energiequelle beeinflusste die Anzahl keimender Pollen nicht. Im Gegensatz dazu konnte aber eine Beeinflussung des Pollenschlauchlängenwachstums durch verschiedene Zucker nachgewiesen werden (Abbildung 2-51). So wuchsen in 290 mM Saccharose 33 % aller Pollenschläuche zu einer Größe zwischen

100 und 200 μm während die Pollenschläuche in 555 mM Glucose zu 58 % mit nur 50 μm oder weniger deutlich kürzer waren. Dabei unterschied sich das Pollenschlauchwachstum mit Glucose als Energiequelle nicht von der osmotischen Kontrolle mit 555 mM Mannitol (Abbildung 2-52 A, B, F). Das Vorhandensein von 6 mM Fructose im Glucose-Medium führte zu einer Vergrößerung der Pollenschlauchlängen, während 6 mM des Disaccharids Palatinose keinen Einfluss auf die Glucose-vermittelte Inhibierung des Pollenschlauchwachstums zeigte (Abbildung 2-52 C und D). Daneben konnten auch 6 mM Turanose und Raffinose keine Verlängerung der gebildeten Pollenschläuche bewirken (Daten nicht gezeigt).

Um zu untersuchen, ob die Erkennung der Fructose im Medium von dessen anomerer Struktur abhing, wurde die Pollenkeimung unter Verwendung von 1F-Fructose untersucht. Im Gegensatz zu Fructose konnten 6 mM 1F-Fru die Glucose-vermittelte Inhibition des Pollenschlauchlängenwachstums nicht abschwächen (Abbildung 2-52 E).

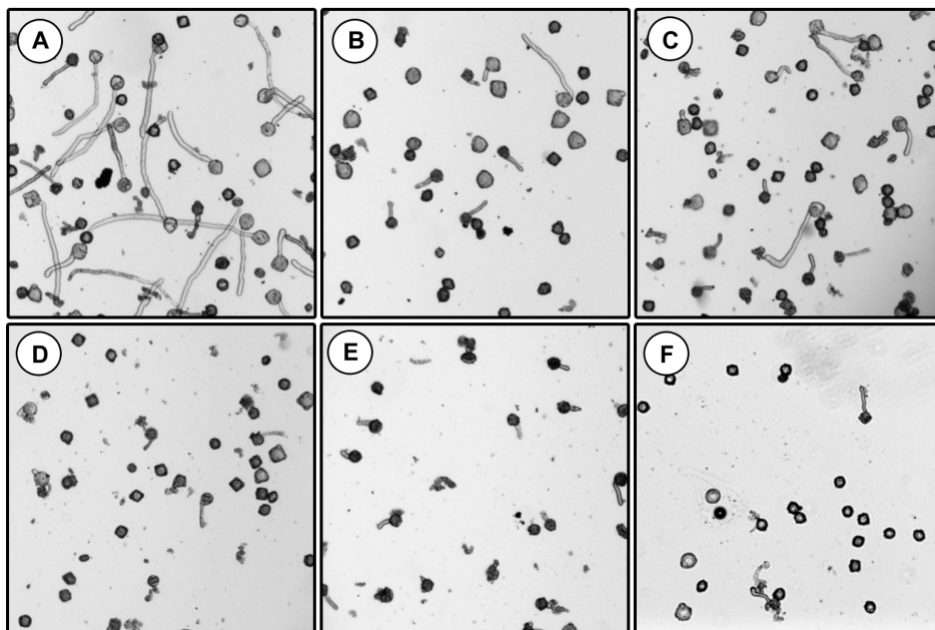


Abbildung 2-51: Einfluss verschiedener Kohlenhydrate auf das Längenwachstum der Pollenschläuche von *N. tabacum* 'SR1': 290 mM Saccharose (A), 555 mM Glucose (B), je 555 mM Glucose plus je 6 mM: Fructose (C), 1F-Fructose (D), Palatinose (E); 555 mM Mannitol (F).

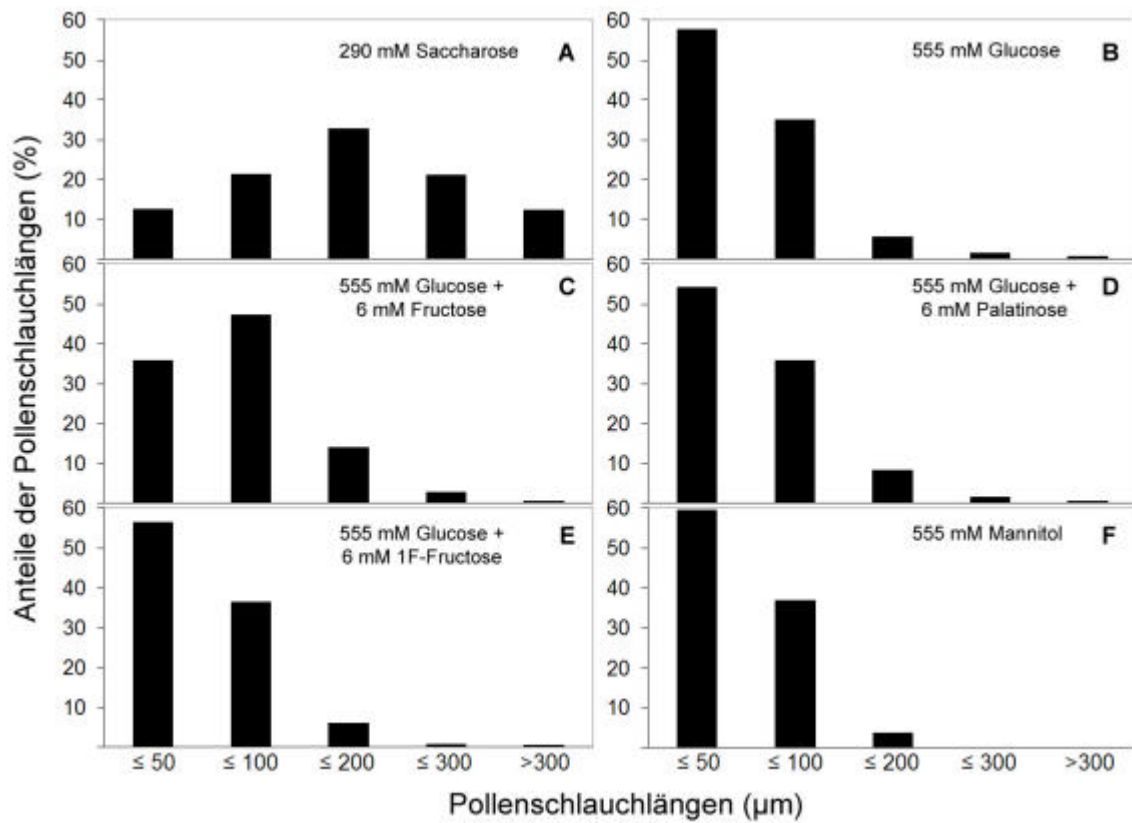


Abbildung 2-52: Beeinflussung des Pollenschlauchlängenwachstums von *N. tabacum* 'SR1' durch verschiedene Kohlenhydrate.

3 Diskussion

3.1 Die Aktivität der Promotoren *Nin88* und *AtcwINV2* ist im heterologen System eingeschränkt

Im Hinblick auf eine breite Anwendung der gentechnologisch erzeugten männlichen Sterilität abseits der untersuchten Modellorganismen ist es von besonderer Bedeutung, die bereits vorhandenen und als gewebespezifisch identifizierten Promotoren (*Nin88* und *AtcwINV2*) auch in anderen Pflanzenarten zu testen, um gegebenenfalls aufwändige Promotorklonierungen im jeweiligen System umgehen zu können. Um die Übertragbarkeit über Familiengrenzen hinweg zu untersuchen, wurden die antheren- und pollenspezifischen Promotoren *Nin88* (*N. tabacum*, Goetz *et al.*, 2001) und *AtcwINV2* (*A. thaliana*) erstmalig im Rahmen dieser Arbeit anhand von Reporterexperimenten in das jeweilige heterologe System transferiert.

Wie bereits von Goetz *et al.* (2001) für *Nin88* in Tabak beschrieben, wurde auch für den Promotor *AtcwINV2* in *Arabidopsis* eine starke, streng gewebe-spezifische Aktivität nachgewiesen, die sich auf Antheren und Pollen beschränkt. Im heterologen System ist zwar die Spezifität erhalten, jedoch die Aktivität der Promotoren stark eingeschränkt, wie GUS-Färbungen von Blüten und Pollen (Abbildung 2-2 und 2-3) bzw. quantifizierende GUS-Analysen belegten (Abbildungen 2-4 und 2-5).

Dabei zeigte sich, dass die erzeugten transgenen *Arabidopsis*-Linien mit dem heterologen Promotor *Nin88* (AT32) maximal 0,9 % des GUS-Aktivitätsniveaus der *Arabidopsis*-Reporterpflanzen mit dem *AtcwINV2*-Promotor (AT37) erreichen. In Tabak zeigt hingegen der *Nin88*-Promotor eine stärkere Expression, während der *Arabidopsis*-Promotor bei der Mehrzahl der erzeugten Linien (NT123) eine deutlich schwächere Expression vermittelt und nur einzelne Linien das Expressionsniveau der *Nin88*-Reporterpflanzen (NT19, NT40) erzielen.

Der Aktivitätsverlust beider Promotoren im heterologen System ist dabei höchstwahrscheinlich auf die geringe verwandtschaftliche Nähe beider Pflanzenfamilien zurückzuführen. In zahlreichen Untersuchungen konnte zwar gezeigt werden, dass verschiedenste Promotoren (aus mono- und dikotylen Pflanzen) in heterologen Systemen ihre räumliche und zeitliche Aktivität beibehalten (Bäumlein *et al.*, 1991; Takaiwa *et al.*, 1991; Hamilton *et al.*, 1992; Pauls *et al.*, 1994; Tsuchiya *et al.*, 1994; Yamada *et al.*, 1997). Jedoch wurden solche Promotorstudien meist dazu genutzt, um

mittels verschiedener Promotorfragmente *cis*-Elemente in den Sequenzen zu identifizieren, weshalb vergleichende Untersuchungen zur Aktivität im homo- und heterologen System nicht vorliegen. Reporterstudien zu verschiedenen samen- und antherenspezifischen Promotoren zeigen aber, dass sich auch die Promotorspezifität im heterologen System verändern kann. So werden samenspezifische Promotoren aus Mais und Raps in Tabak auch in Antheren und Pollen aktiv (Gallusci *et al.*, 1994; Stålberg *et al.*, 1998), während der *Gt3*-Promoter aus Reis in *Arabidopsis* nicht mehr nur samenspezifisch bleibt (Leisy *et al.*, 1989). Aber auch die Aktivität blüten-spezifischer Promotoren aus *B. campestris* unterscheidet sich nach der Übertragung in Tabak, während die Spezifität in der verwandten Modellpflanze *A. thaliana* erhalten bleibt (Sato *et al.*, 1991; Xu *et al.*, 1993). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass in den entsprechenden Pflanzenorganen ein unterschiedliches Set an Transkriptionsfaktoren vorhanden ist und nicht alle *cis*-Elemente fremder Promotoren erkannt werden (Weising *et al.*, 1988; Stålberg *et al.*, 1998). Der Aktivitätsverlust der Promotoren *Nin88* und *AtcwINV2* könnte deshalb durch eine ungenügende Erkennung spezifischer *cis*-Elemente in den Promotoren verursacht sein, bzw. durch das Binden transkriptionshemmender Faktoren an bestimmte Promotorsequenzen.

Das unterschiedliche Niveau der *GUS*-Expression in den *AtcwINV2*- bzw. *Nin88*-*Arabidopsis*- und Tabak-Reporterlinien steht höchstwahrscheinlich in direktem Zusammenhang mit der Anzahl der inserierten Reporter-Kopien im Genom der Pflanzen. Dieser Zusammenhang ist jedoch nicht vollständig linear und wird möglicherweise durch Positionseffekte im Genom beeinflusst bzw. durch eine Veränderung der strukturellen Organisation des Transgens (Rai *et al.*, 2007). Derartige Effekte wurden von Peach und Velten (1991) nachgewiesen, indem die Inaktivierung einzelner Genloci dem genomischen und chromosomalen Kontext zugeordnet werden konnte. Eine Integration des Transgens in hoch repetitive oder stark methylierte Bereiche führt zu einer Inaktivierung des Gens, da die Eigenschaften der Umgebung auf die inserierte DNA übertragen werden (Koncz *et al.*, 1989; Pröls und Meyer, 1992; van Blokland *et al.*, 1994). Dieser als *position effect variegation* (PEV) beschriebene Prozess determiniert dabei die Expressionsstärke eines (Trans-)Gens in Abhängigkeit seiner Nachbarschaft zu Euchromatin oder Heterochromatin. PEV wurde an *Drosophila melanogaster* untersucht und detailliert beschrieben (Henikoff, 1990; Karpén, 1994; Schotta *et al.*, 2003), aber auch in Pflanzen wurden derartige Effekte nachgewiesen (Cerutti *et al.*, 1997; Meyer, 2000; Shen, 2001; Springer *et al.*, 2003; Lippman *et al.*, 2004). Das relativ geringe *GUS*-Aktivitätsniveau in einigen Reporterlinien mit einer erhöhten Kopienzahl im Genom (z. B. AT32/2-5, AT37-2 und AT40-1-1) könnte an *silencing*-Effekten liegen, die gerade bei sehr hohen Kopienzahlen zu einer reduzierten

Transkriptmenge und damit zu einer verringerten Aktivität führen (Schubert *et al.*, 2004).

Die beobachtete geringe Beeinflussung der Pollenkeimungsfähigkeit in den *Arabidopsis*-Linien AT30 (*Nin88::Nin88-AS*) und AT31 (*Nin88::NtCIF*) kann aufgrund der vergleichenden Promotoranalyse mit Hilfe der Reporterlinien durch die geringe Aktivität des *Nin88*-Promotors in *Arabidopsis* erklärt werden. An keiner der zahlreichen transgenen Pflanzen wurde eine phänotypische Veränderung des Blühverhaltens und der Samenbildung nachgewiesen und auch die Analyse ausgewählter Pflanzen wies nur eine geringfügige Beeinträchtigung der Pollenkeimungsfähigkeit nach (Abbildung 2-7 und 2-10). Zudem kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Homologie der cw-INV-Sequenzen von *Nin88* und *AtcwINV2* mit 61 % zu gering ist, um in den Pflanzen der Linie AT30 eine effektive RNA-Interferenz durch das *Nin88-Antisense*-Konstrukt zu bewirken. Die *NtCIF*-vermittelte Inhibierung der cw-INV-Aktivität in den Antheren der AT31-Linien führte nur bei der Pflanze AT31-6 zu einem deutlichen Rückgang der Pollenkeimungsfähigkeit von 52 % auf 25 %. Jedoch führte die Expression dieses Invertase-Inhibitors unter der Kontrolle des stärkeren, endogenen Promotors *AtcwINV2* (AT41) zu einer wesentlich geringeren Beeinflussung der Pollenkeimungsfähigkeit, bei einer doppelt so großen Kopienzahl des Konstrukts im Genom. Es muß deshalb davon ausgegangen werden, dass Positionseffekte bzw. die Beeinträchtigung pollenkeimungsrelevanter Gene durch die Insertion des Transgens für die geringere Keimungsfähigkeit der AT31-6-Pollen verantwortlich sind.

Die Analyse der antheren- und pollenspezifischen Promotoren *Nin88* und *AtcwINV2* im homo- und heterologen System hat gezeigt, dass für die Generierung transgener männlich steriler Pflanzen nicht bedenkenlos auf bereits vorhandene Promotorsequenzen zurückgegriffen werden kann. Um eine starke Inaktivierung der Invertaseaktivität in Antheren und Pollen zu gewährleisten, sind daher stets geeignete Promotoren aus den Zielpflanzen zu isolieren. Weitere Untersuchungen müssen zeigen, ob diese Promotoren zumindest in nah verwandeten Pflanzenarten der gleichen Familie eingesetzt werden können.

3.2 RNA_i- und Invertase-Inhibitor-vermittelte Hemmung der extrazellulären Invertaseaktivität in Antheren und Pollen von *Arabidopsis* führt zu männlicher Sterilität

Im Hinblick auf eine korrekte und umfassende Pollenanalyse der transgenen Pflanzen wurden die einzelnen Primärtransformanten während der Blütezeit zunächst nur einem optischen Vorscreening unterzogen, da in ersten Pollenkeimungsanalysen ein Einfluss des Blütenalters auf die Pollenkeimung beobachtet wurde. Während dies bereits 1995 von Hülkamp *et al.* festgestellt wurde, beobachteten Johnson-Brousseau und McCormick (2004) zudem eine Abhängigkeit der Keimungsrate von der entsprechenden Anthere einer einzelnen Blüte. Um ausreichend Blütenmaterial der gleichen Altersstufe untersuchen zu können, wurden deshalb die Pollenanalysen in der T2-Generation durchgeführt. Im Vorscreening zeigten die einzelnen Pflanzen zum Teil deutliche Unterschiede hinsichtlich der Schotenbildung. So konnten 11 Linien der Transformation AT34 (*AtcwINV2::AtcwINV2-AS*), 3 Linien der Transformation AT33 (*AtcwINV2::AtC/VIF2+6AA*), sowie jeweils 5 Linien der Transformationen AT40 (*AtcwINV2::AtC/VIF2*) und AT41 (*AtcwINV2::NtCIF*) als eingeschränkt fertil identifiziert werden. Einzelne Pflanzen mit besonders starker Reduktion des Samenansatzes zeigten zudem eine deutlich verlängerte Blütenhaltbarkeit, vermutlich ausgelöst durch die ausgebliebene Bestäubung der Griffel (Stead, 1992; van Doorn, 1997). Um diese Linien mit stark verminderter Pollenfertilität zu erhalten, wurden sie mit Wildtyp-Pollen (Col-0) bestäubt.

Die Pollenkeimungsanalyse der T2-Generation ergab einen Zusammenhang von Pollenkeimungsfähigkeit und der Kopienzahl der übertragenen Antisense-Konstrukte (Abbildung 2-14). Während Linien mit nur einer Insertion einen geringen Rückgang der Pollenkeimungsfähigkeit zeigten, keimten bei Pflanzen mit 3 inserierten Kopien nur noch etwa 12 % aller Pollen aus. Diese Pflanzen bildeten jedoch noch immer Samen durch Selbstbestäubung aus. Ein Zusammenhang zwischen Kopienzahl und zu erzielendem Phänotyp ist aus Untersuchungen von Schubert *et al.* (2004) bekannt, in denen nachwiesen wurde, dass die RNA-Interferenz deutlich gesteigert wird, wenn die Transkriptmenge des Transgens einen Gen-spezifischen Grenzwert überschreitet. Eine vollständige Sterilität der Pflanzen wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit bei einem Schwellenwert von unter 10 % keimfähiger Pollen beobachtet, der durch Insertion von 4 Kopien in der Linie AT34/2-44 erreicht wurde.

Eine Ausnahme stellte die Linie AT34/2-8 dar. Obwohl nur 1 Kopie des übertragenen Antisense-Konstrukts nachgewiesen wurde, spaltete diese Linie in der T2-Generation in eine fertile (AT34/2-8F) und eine sterile (AT34/2-8S) Gruppe auf. So ist es denkbar,

dass sich bei diesem Teil der Nachkommenschaft von AT34/2-8 das Transgen im Genom reorganisiert hat, wie es bereits bei transgenen Reispflanzen nachgewiesen wurde (Rai *et al.*, 2007). Auf diese Weise könnten für die Pollenkeimung wichtige Gensequenzen zerstört worden sein. Möglicherweise handelt es sich bei der sterilen Gruppe um homozygote Pflanzen, während die fertilen Pflanzen heterozygot sind und durch die meiotische Teilung während der Pollenentwicklung Wildtyp-Pollen ausbilden. Aufgrund begrenzter Saatgutmengen konnte diese These durch Spaltungsanalysen der Nachkommenschaft jedoch nicht überprüft werden. Allerdings unterstützt die Analyse der Reporterpflanzen diese Beobachtung. So wurde in zahlreichen *Arabidopsis*- und Tabak-Linien (AT32, AT37, NT19, NT40, NT119, NT123) eine Aufspaltung der Pollenpopulation in Wildtyp-Pollen und GUS-exprimierende Pollen beobachtet, während bei einigen Linien keine Unterschiede hinsichtlich der GUS-Färbung in den Pollen nachgewiesen wurden. Southern-Analysen der Linien AT32 und AT37 ergaben, dass eine Aufspaltung der Pollenpopulation bei Pflanzen mit nur einer Insertionsstelle auftrat, während Pollen aus Linien mit Mehrfachinsertionen gleichmäßig gefärbt waren. Es muss deshalb davon ausgegangen werden, dass die Genloci der übertragenen Reporter-kassette während der Meiose auf verschiedene haploide Pollen verteilt werden, so dass die entstehende Pollenpopulation aufspaltet und auch nicht transgene Pollen gebildet werden. Dies würde erklären, warum die Pollenkeimungsfähigkeit mit der Kopienzahl der inserierten Konstrukte abnimmt, neben einer damit verbundenen Steigerung der RNA-Interferenz. Zur effektiven Induktion der männlichen Sterilität sind somit, neben homozygoten Linien, Pflanzen mit Mehrfachinsertionen notwendig.

Im Vergleich zu den Antisense-Pflanzen (AT34) zeigten die Invertase-Inhibitor-exprimierenden Pflanzen (AT33, AT40, AT41) eine geringere Beeinflussung der Pollenkeimungsfähigkeit. Ein Zusammenhang zwischen Fertilität und Kopienzahl des Transgens konnte ebenso nicht nachgewiesen werden. Unabhängig von der Anzahl des übertragenen Konstrukts variierte der Anteil gekeimter Pollen der einzelnen Linien sehr stark (Abbildung 2-20). Während die Pollenkeimungsfähigkeit der Linien AT33 und AT40 zwischen 50 % und 6 % schwankte, führte die antherenspezifische Expression des Invertase-Inhibitors *NtCIF* nur zu einer Reduktion der Pollkeimungsrate auf 37 – 32 %. Sie wurde damit bei weitem nicht so stark gehemmt wie durch die Expression des endogenen Inhibitors *AtC/VIF2*. Die Verwendung orthologer Inhibitoren zur Beeinflussung der Invertase-Aktivität in den Antheren von *A. thaliana* erscheint somit ungeeignet. Möglicherweise führt der strukturelle Unterschied der Invertase *AtcwINV2* im Vergleich zu Tabak-cw-INV zu veränderten Protein-Interaktionen und somit zu einer suboptimalen Inhibierung der cw-INV-Aktivität in *Arabidopsis* (Greiner *et al.*,

1998), während im homologen System *N. tabacum* eine starke Hemmung der cw-INV-Aktivität und deutlichere phänotypische Veränderungen zu beobachten waren (Goetz, 2001). Ähnlich wie die Linie AT34/2-8 spalteten auch die Nachkommen der Pflanzen AT40/2-1 und AT40/2-6 in der T2-Generation in fertile und in der Pollenkeimungsfähigkeit beeinträchtigte Individuen auf. Spaltungsanalysen der Nachkommen einzelner Pflanzen dieser Gruppen sollten aufklären, ob die Mitglieder der sterilen Gruppen eine höhere Kopienzahl des Transgens im Genom tragen. Dabei stellte sich heraus, dass sich die Spaltungsverhältnisse der Nachkommen deutlich voneinander unterscheiden (Tabelle 2-5). Während 1:0-Spaltungen auf die Homozygotie mindestens 1 Genlocus hinweisen, könnten die übrigen Spaltungen auf die Kopplung einzelner Genkopien deuten, da durch Southern-Analyse für AT40/2-1 3 Kopien, bzw. für AT40/2-6 4 Kopien des übertragenen Konstrukts nachgewiesen wurden.

Bei der Analyse der Antisense- und Inhibitor-Pflanzen wurden, neben Pollen normaler Größe, auch deutlich kleinere und deformierte Pollen beobachtet. Phänotypisch waren sie vergleichbar mit deformierten Pollen in *N. tabacum*, hervorgerufen durch antheren- bzw. pollenspezifische Hemmung der cw-INV Nin88. Diese veränderten Pollen wiesen, im Vergleich zum Wildtyp, eine deutliche Reduktion intrazellulären Materials auf (Goetz *et al.*, 2001). Wie bereits in Tabak konnten die deformierten Pollen auch in *Arabidopsis* keine Pollenschläuche ausbilden. Der Anteil an deformierten Pollen an der Gesamtpollenanzahl nahm zwar tendenziell bei gleichzeitigem Rückgang der Pollenkeimungsfähigkeit zu, jedoch konnte auch bei Linien mit einer hohen Keimungsfähigkeit ein erhöhter Anteil deformierter Pollen nachgewiesen werden (AT33/2-22, AT34/2-5, AT40/2-4, AT41-13).

Als Ursache für die Pollendeformationen kommen verschiedene Aspekte in Betracht. Zunächst wurden auch in Wildtyp-Pflanzen deformierte Pollen beobachtet und auch in den untersuchten Reporterpflanzen wurden zum Teil erhöhte Anteile deformierter Pollen gefunden (Abbildung 2-6), obwohl weder die Anzahl der inserierten Reporterstrukture, noch die Intensität der *GUS*-Expression die Pollenkeimung und -entwicklung in diesen Linien beeinflusste. Weder bei den Antisense- noch bei den Invertase-Inhibitor-exprimierenden Pflanzen wurde ein Zusammenhang zwischen Kopienanzahl des Transgens im Genom der Pflanzen und der Anzahl der deformierten Pollen deutlich, so dass die Anzahl deformierter Pollen höchstwahrscheinlich nicht durch die Aktivität des Transgens bedingt wird. Es ist hingegen denkbar, dass der Anteil an deformierten Pollen von der Insertionsstelle des übertragenen Konstrukts im Genom der Pflanze abhängt. So könnten für die Pollenentwicklung wichtige Gene durch die Insertion zerstört oder in ihrer Aktivität verändert worden sein. In zahlreichen Studien wurde nachgewiesen, dass die Ausschaltung eines einzelnen, wichtigen Gens

zu Beeinträchtigungen in der Pollenentwicklung führen kann (Park *et al.*, 2002; McCormick, 2004; Niewiadomski *et al.*, 2005; Takeda *et al.*, 2006; Schijlen *et al.*, 2007; Schnurr *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2007).

3.3 Analyse der Invertasen-Familien aus *Brassica napus* und *Nicotiana tabacum*

Als Vorarbeiten für eine spätere Übertragung der transgen induzierbaren männlichen Sterilität, durch Hemmung der cw-INV-Aktivität in Antheren und Pollen, wurde die Invertasen-Familie aus *B. napus* kloniert. Es wurden insgesamt 9 verschiedene Gensequenzen identifiziert, die aufgrund ihrer Sequenzhomologien den entsprechend orthologen Genen aus *Arabidopsis* (Tabelle 2-6) zugeteilt wurden. Die Expressionsanalyse der identifizierten Invertasen bestätigte die Zuordnung der *B. napus*-Sequenzen zu den jeweils homologen Invertasen aus *Arabidopsis*. Somit konnte, wie bereits aufgrund der Homologie erwartet, *BncwINV2* als antheren- bzw. pollenspezifisches Ortholog zu *AtcwINV2* (aus *Arabidopsis*) und *Nin88* (aus Tabak) identifiziert werden.

Aufgrund ihrer Ähnlichkeit wurden den beiden Genen *AtcwINV2* und *AtcwINV3* aus *Arabidopsis* jeweils 2 geringfügig verschiedene Sequenzen aus *B. napus* zugeordnet. Diese Untergruppen (*BncwINV2a/b* bzw. *BncwINV3a/b*) unterscheiden sich jeweils geringfügig in ihrer Basensequenz, was möglicherweise auf die amphidiploiden Eigenschaften von *B. napus* zurückzuführen ist, da Raps die beiden Genome der Eltern (*B. oleracea* und *B. rapa*) beinhaltet. Aufgrund der nahen Verwandtschaft beider Elternarten sind nur geringe Unterschiede in der Sequenz der entsprechenden Gene zu erwarten. Es ist anzunehmen, dass jeweils ein homologes Gen eines Elternteils außer Funktion gesetzt wird, um einen störungsfreien Ablauf der Prozesse in der Zelle zu ermöglichen. Diese These wird gestützt von der Beobachtung, dass die beiden Invertasen *BncwINV2b* und *BncwINV3b* eine starke Reduzierung bzw. vollständige Inaktivierung der Expression zeigen, im Vergleich zu *BncwINV2a* und *-3a*. Während der Klonierung konnten außerdem weder *BncwINV1* noch *BncwINV2b* und *BncwINV6* über cDNA amplifiziert werden, was bereits auf eine reduzierte Expression dieser Invertasen in den Antheren hinwies. Das Auftreten von Kreuzhybridisierungen während der Expressionsanalyse der homologen Invertasesegruppen ist mit einer Homologie von 85 % nicht sehr wahrscheinlich. Außerdem wäre sonst ein vergleichbares Expressionsprofil der Untergruppen in den Northern-Analysen zu erwarten gewesen.

Aus *N. tabacum* waren bereits 4 Invertasen bekannt, jedoch gab es Hinweise, die auf eine Beteiligung (extrazellulärer) Invertasen bei der Pollenschlauchleitung im Durchlassgewebe hindeuteten, die vermutlich eine strukturelle Ähnlichkeit zu *Nin88* aufweisen (Roitsch, unveröffentlichte Daten). Zur Erfassung noch unbekannter Invertasen in *N. tabacum* wurde auch aus dieser Pflanzenart die gesamte Invertasen-Familie kloniert und hinsichtlich ihrer gewebespezifischen Expression überprüft. Neben den bereits bekannten Invertasen wurden auf diesem Weg 4 weitere putative Invertase-Sequenzen identifiziert: *Nin11*, *Nin21*, *Nin52* und *Nin63* (Tabelle 2-7). Mittels Northern-Analysen wurde die Expression der Gene in verschiedenen Geweben untersucht. Dabei zeigte sich eine weitgehend ubiquitäre Aktivität der vac-INV *Nt-VI*, während die Expression der übrigen Invertasen auf bestimmte Gewebe beschränkt ist. So wurden z. B. nur in Blättern Transkripte von *Nin52* und *Nin63* nachgewiesen.

Über vergleichende Northern-Analysen aus Antheren, Pollenschläuchen und Griffeln kann jedoch keine klare Aussage darüber getroffen werden, ob während des Pollenschlauchwachstums im Griffelgewebe selbst die Expression einer cw-INV spezifisch induziert wird. Immunolokalisationsexperimente mit polyklonalen Antikörpern gegen *Nin88* zeigten zwar, daß im Griffel ein Proteinsignal den einwachsenden Pollenschläuchen vorausläuft, jedoch wurde mittels *in situ*-Hybridisierungen nur in den Pollenschläuchen selbst eine *Nin88*-Expression nachgewiesen, aber nicht im Griffelgewebe (Roitsch, unveröffentlichte Daten). Neben *Nin88* werden jedoch auch *Nin77* und *Ntßfruc1* sowohl in Pollen und Pollenschläuchen, als auch in bestäubten Griffeln exprimiert, wobei das Signal für *Nin77* in der Northern-Analyse möglicherweise durch Kreuzhybridisierung mit *Nin88* hervorgerufen wird (Roitsch, pers. Mitteilung). Aber auch *Nt-VI* wird in Griffeln exprimiert, so daß weiterführende *in situ*-Analysen notwendig waren, um den Expressionsort dieser Invertasen im Griffelgewebe zu lokalisieren. Dieser wurde für die beiden Invertasen *Nin11* und *Nin21* aufgeklärt. Es zeigte sich, dass beide Gene sehr stark spezifisch im Durchlassgewebe exprimiert werden, was auf eine wichtige Beteiligung der Invertasen am Pollenschlauchwachstum durch das Griffelgewebe hinweist.

Der Vergleich der neu klonierten Invertasen mit Sequenzen anderer Gene aus der Gruppe der Invertasen verschiedener Pflanzenarten zeigt deutliche Homologien und die phylogenetische Verwandtschaft der Gene untereinander auf. So gruppieren die unterschiedlichen Invertasen-Arten deutlich getrennt voneinander, wobei die Unterschiede zwischen den cyt-INV's und den sauren Invertasen größer sind, als zwischen cw- und vac-INV's selbst (Abbildung 3-1). Dies lässt sich darauf zurückführen,

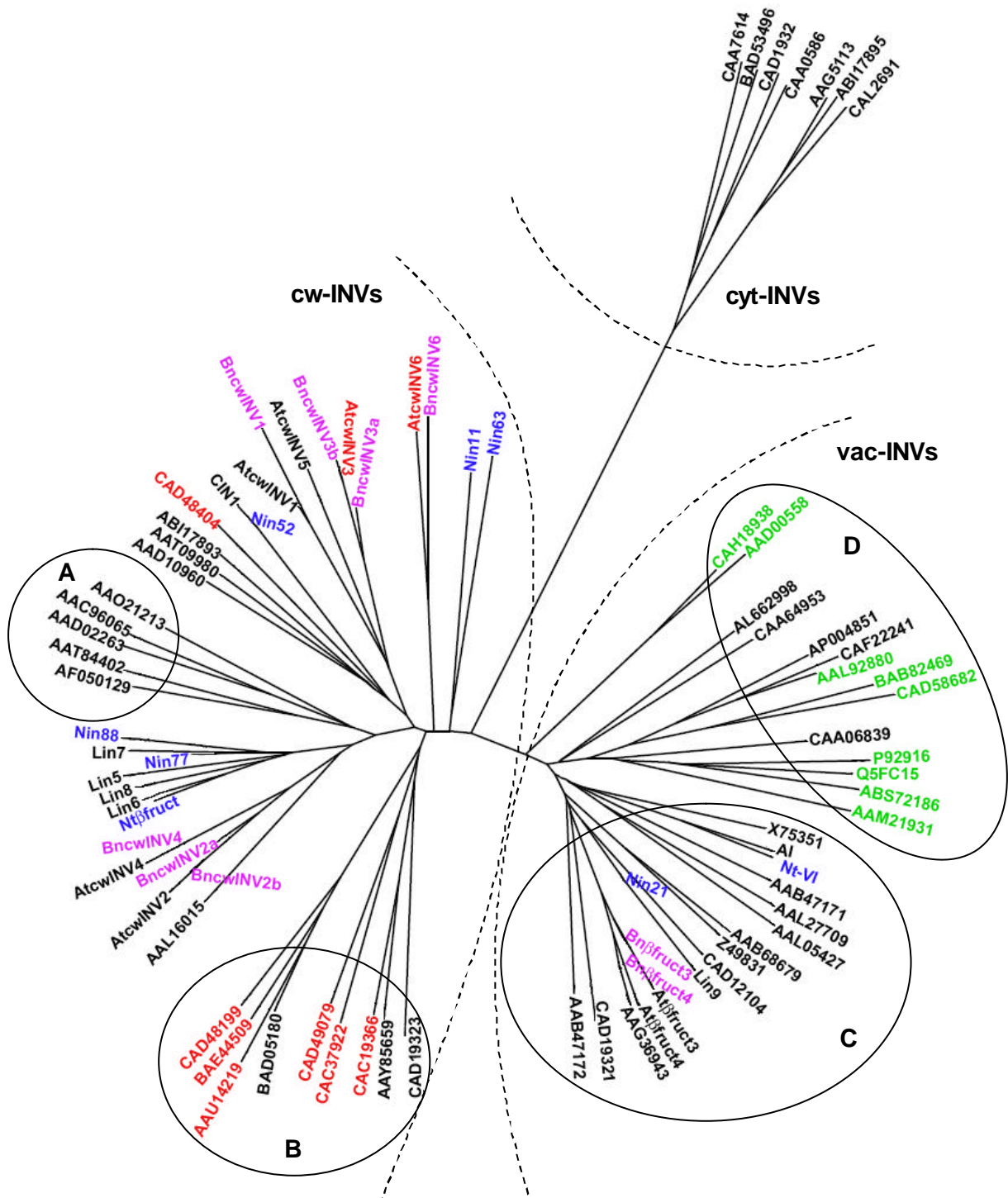


Abbildung 3-1: Phylogenetische Beziehung zwischen Invertasen, Fructanexohydrolasen und Fructosyltransferasen verschiedener Pflanzenarten und den neu klonierten Sequenzen von *B. napus* (violett) und *N. tabacum* (blau). Gruppe (A) enthält cw-INVs monokotyle Pflanzen, während Gruppe (B) überwiegend Fructanexohydrolasen beinhaltet (rot). Gruppe (C) enthält ausschließlich vac-INVs und Gruppe (D) überwiegend Fructosyltransferasen (grün). Zur Darstellung verwandtschaftlicher Beziehungen sind nur einzelne Gene namentlich benannt: *Arabidopsis*: *AtcwINV1* (At3g13790), *AtcwINV2* (At3g52600), *AtcwINV3* (At1g55120), *AtcwINV4* (At2g36190), *AtcwINV5* (At3g13784), *AtcwINV6* (At5g11920), *Atβfruct3* (At1g62660), *Atβfruct4* (At1g12240), *CIN1* (*C. rubrum*, X81792), *L. esculentum*: *AI* (AAB30874), *Lin5* (AAO45697), *Lin6* (AAM28823), *Lin7* (AAO45698), *Lin8* (AAM28822), *Lin9* (CAJ19056), *N. tabacum*: *Nin88* (AF376773), *Nt-VI* (CAC83577), *Ntβfruct* (CAA57428).

dass der Ursprung der cyt-INV's vermutlich in Cyanobakterien liegt (Vargas *et al.*, 2003), weshalb diese Invertasenform nicht auf das Ursprungsgen der cw- und vac-INV's zurückgeführt werden kann. Diese These wird untermauert von der Beobachtung, dass die Proteinsequenzen der cyt-INV's aus Cyanobakterien in phylogenetischen Analysen mit den Sequenzen der pflanzlichen cyt-INV's gruppieren (Daten nicht gezeigt).

Die neu klonierten Sequenzen aus *B. napus* und *N. tabacum* weisen die höchste Homologie zu Proteinen aus *A. thaliana* bzw. *L. esculentum* auf, da diese Pflanzenarten der jeweils gleichen Familie angehören. Die putativen cw-INV's *Nin11*, *Nin63*, *BncwINV3a*, *BncwINV3b* sowie *BncwINV6* nehmen dabei eine Sonderstellung ein. Im Gegensatz zu anderen cw-INV's weisen diese einen deutlich niedrigeren *pl* auf. Für die entsprechenden Gene aus *Arabidopsis*, *AtcwINV3* und *AtcwINV6*, wiesen de Connick *et al.* (2005) nach, dass es sich nicht um Invertasen sondern um FEHs mit unterschiedlicher Substratspezifität handelt. Auch in *B. vulgaris* und *C. intybus* wurden FEHs identifiziert, die sich auf Sequenzebene von den cw-INV's kaum unterscheiden und durch einen niedrigen *pl* auszeichnen (van den Ende *et al.*, 2000 und 2003). Fructane dienen in 15 % der *Angiospermeae* neben ihrer Funktion als Energiespeicher auch der Osmoregulation (Hendry, 1993). FEHs sind dabei an der Modifizierung der gebildeten Fructane während der Synthese-Phase (van den Ende *et al.*, 2003a) sowie an deren Abbau nach Stresseinwirkung, wie z. B. Kälte (Michiels *et al.*, 2004; Kawakami *et al.*, 2005), Trockenheit (Yang *et al.*, 2004) oder Verwundung (Asega und Carvalho, 2004) beteiligt. In Pflanzen, die keine Fructane akkumulieren (*A. thaliana*, *B. vulgaris*, *N. tabacum*), könnten die FEHs an der Pathogenabwehr beteiligt sein, indem sie Levant-haltige Schleimstoffe abbauen, die verschiedene pathogene Bakterien (*Erwinia*, *Pseudomonas*) umgeben (Hettwer *et al.*, 1995; Bereswill *et al.*, 1997). Untersuchungen an Levansucrase-defizienten Stämmen von *Erwinia amylovora* zeigten in diesem Zusammenhang eine verringerte Virulenz dieser Bakterien (Bereswill *et al.*, 1997). Zudem wird eine Beteiligung dieser FEHs an der Interaktion mit Symbionten und Fructan-produzierenden endophytischen Bakterien diskutiert (van den Ende *et al.*, 2004). Es ist daher nicht auszuschließen, dass es sich bei den Sequenzen aus Tabak (*Nin11*, *Nin63*) und Raps (*BncwINV3a/b*, *BncwINV6*) ebenfalls um FEHs handelt. Vermutlich besitzen diese Proteine 6-FEH- (Levanase) bzw. 6&1-FEH-Aktivität, da alle 1-FEHs (Inulinasen) im phylogenetischen Stammbaum gemeinsam gruppieren. So könnte *BncwINV3a* durch seine ubiquitäre Expression an der Pathogenabwehr in den meisten Geweben beteiligt sein, während *Nin11* spezifisch das stark zuckerhaltige Durchlassgewebe vor einer Besiedlung durch pathogene Bakterien schützen könnte. Die Ursache der großen Sequenzhomologie zwischen cw-INV's und

FEHs wurde von Le Roy *et al.* (2007) nachgewiesen. Sie zeigten, dass der Austausch einer einzigen Aminosäure in *Atcw/INV1* ausreicht, um die Invertase-Funktion dieses Enzyms in eine FEH-Funktion zu verwandeln. Im Gegensatz dazu stammen die Fructan-aufbauenden Enzyme (Fructan:Fructan-Fructosyltransferase (FFT), Saccharose: Saccharose-Fructosyltransferase (SST)) aus der Gruppe der vac-INV's, worauf die phylogenetische Analyse hinweist (Abbildung 3-1). Zudem zeigten Ritsema *et al.* (2006), dass der Austausch einzelner Aminosäuren in einer vac-INV die Aktivität von Hydrolyse zu Transglycosylierung verändert und somit zur Synthese von Fructanen führt.

3.4 Die griffelspezifische Expression des Invertase-Inhibitors *NtCIF* ist ohne Relevanz für Pollenkeimung und Pollenschlauchwachstum

Der Prozess von Pollenkeimung und Pollenschlauchwachstum erfordert ein hohes Maß an Interaktion zwischen männlichem und weiblichem Gewebe. Um eine schnelle und effektive Befruchtung sicherzustellen, müssen die Pollenschläuche auf ihrem Weg zu den Ovarien geleitet werden. Dies beginnt bereits während der Pollenkeimung auf der Narbe über die Ausbildung eines H₂O-Gradienten (Lush *et al.*, 1998). In der Narbe übernehmen Plantacyanine die chemotaktische Leitung der Pollenschläuche (Kim *et al.*, 2003; Dong *et al.*, 2005) und andere narbenspezifische Proteine interagieren mit Rezeptorkinasen der Pollenschläuche (Tang *et al.*, 2004; Kaothien *et al.* 2005). Hydroxyprolinreiche Glycoproteine (Arabinogalactan-Proteine (AGPs)) wurden in allen Teilen des Griffels nachgewiesen. Ihre chemotaktischen und wachstumsfördernden Eigenschaften auf Pollenschläuche wurden *in vitro* gezeigt (Cheung *et al.*, 1995, 1996, 2000; Qin *et al.*, 2007). Prado *et al.* zeigten 2004, dass Stickstoffmonoxid an der Wachstumsregulation von Pollenschläuchen beteiligt ist. Palanivelu *et al.* (2003) wiesen neben fördernden Eigenschaften von γ -Aminobuttersäure (GABA) auf Pollenschläuche einen Konzentrationsanstieg von GABA entlang der Wuchsrichtung von Pollenschläuchen nach, während von den Synergiden ebenfalls Lockstoffe abgegeben werden, die vermutlich proteinogener Natur sind (Higashiyama *et al.*, 2001; McCormick und Yang, 2005). Aber auch die Pollenschläuche selbst nehmen aktiv daran teil, den Weg zu den Eizellen zu finden. So identifizierten von Besser *et al.* (2006) ein spermazellspezifisches Protein, das für eine korrekte Pollenschlauchleitung und Befruchtung in *Arabidopsis* notwendig ist.

Die AGPs nehmen in diesem Zusammenhang eine Sonderstellung ein. Je nach AGP-Klasse handelt es sich dabei um zum Teil hochgradig glycosylierte Proteine mit einem Anteil des Kohlenhydratgehalts von über 90 % an der Gesamtmasse des Proteins. Dabei sind meist Galactose, Arabinose und Glucose mit dem Proteinrückgrat verknüpft (Wu *et al.*, 2001; Seifert und Roberts, 2007). Von der Narbe zu den Ovarien verläuft dabei in *N. tabacum* ein Gradient hinsichtlich der Glycosylierung der AGPs – mit einer Zunahme des Zuckeranteils in Wuchsrichtung der Pollenschläuche. Die Zuckerreste der AGPs werden dabei von den Pollenschläuchen abgespalten (Wu *et al.*, 1995). Dies lässt, neben einer nutritiven Funktion dieser Proteinklasse, auch eine Beeinflussung von physiologischen Prozessen innerhalb der Pollenschläuche sowie der Pollenschlauchleitung über das Zucker-Signaling vermuten, da bereits *in vitro*-Studien von Reger *et al.* (1992) zeigten, dass ein Glucosegradient das Wachstum von Pollenschläuchen beeinflusst. Dieser wurde generiert durch Invertasen, die im Griffelgewebe aktiv sind und Saccharose des Keimungsmediums aufspalteten.

Zur näheren Untersuchung einer möglichen Beteiligung von Invertasen an der Pollenschlauchleitung im Griffelgewebe von Tabak wurden transgene Tabakpflanzen generiert, die durch eine griffelspezifische Expression des Invertase-Inhibitors *NtCIF* und einer damit verbundenen Hemmung der cw-INV-Aktivität im Gewebe und an den hindurchwachsenden Pollenschläuchen zu einer Verringerung eines putativen Zucker-Signals und metabolisierbarer Hexosen während des Pollenschlauchwachstums führen sollten. Durch narben- bzw. durchlassgewebespezifische Expression von *NtCIF* sollte der Einfluss auf Pollenkeimung bzw. Pollenschlauchwachstum getrennt beobachtet werden.

Die analysierten Reporterlinien (NT117) zeigten eine gewebespezifische Aktivität des Promotors *STIG1* im Narbengewebe. In vollentwickelten Griffeln des Blütenstadiums 12 wurde in den NT117-Linien jedoch nur eine relativ geringe Promotoraktivität detektiert. Analysen früherer Blütenstadien (Abbildung 2-30) zeigten eine nachlassende Aktivität des *STIG1*-Promotors im Laufe der Griffelentwicklung. Diese Beobachtungen bestätigen frühere Untersuchungen von Goldman *et al.* (1994). Trotz Kenntnis dieser nachlassenden Aktivität wurde der Promotor für weitergehende Untersuchungen des Pollenschlauchwachstums *in situ* verwendet, da keine alternativen Promotoren mit diesem spezifischen Expressionsmuster bekannt waren. So zeigte die Promotoranalyse des "*S-locus-related gene 1*" aus *B. oleracea* neben einer narben- auch eine pollenspezifische Aktivität (Hackett *et al.*, 1996), welche bei einer spezifischen Expression des Invertase-Inhibitors *NtCIF* möglicherweise zu unerwünschten Komplikationen geführt hätte. Bei zahlreichen anderen Promotoren, die eine Expression in der Narbe vermitteln, war eine unerwünschte Expression in anderen

Gewebe bekannt und zudem keine Sequenz verfügbar (Atkinson *et al.*, 1993; Gasser *et al.*, 1989; McInnis *et al.*, 2005; Otsu *et al.*, 2004; Simpson *et al.*, 1996; Tang *et al.*, 1994).

In situ-Pollenschlauchanalysen der transgenen Linie NT118 (*STIG1::NtCIF*) ergaben keinerlei Veränderung der Pollenkeimung und des Pollenschlauchwachstums im Griffelgewebe im Vergleich zum Wildtyp (Abbildung 2-31). Die Pollen aller Pflanzen keimten sehr zahlreich auf den Narben aus und wuchsen zielgerichtet durch das Narben- und Durchlassgewebe Richtung Fruchtknoten. Eine Störung der Pollenschlauchleitung wurde bei keiner Pflanze beobachtet. Das Auftreten einzelner, fehlgeleiteter Pollenschläuche konnte auf die Präparation der Narbenschnitte zurückgeführt werden. Das unveränderte Pollenschlauchwachstum der Linie NT118 könnte daran liegen, dass der Promotor im voll ausgebildeten Griffel zur Zeit der Bestäubung nur noch eingeschränkt aktiv ist und dadurch nur sehr wenig *NtCIF* produziert wird. Zudem stellt die frühe Wachstumsphase bicellularer Pollen (wie *N. tabacum*) durch die Narbe eine Phase des autotrophen Wachstums dar, die weitgehend autonom von umgebenden Faktoren abläuft (Stephenson *et al.*, 2003). Während dieser Phase werden primär interne Energiespeicher genutzt, was zu einem geringeren Bedarf an Invertaseaktivität führt. Eine Zunahme der Invertaseaktivität in Pollenschläuchen im Verlauf der Pollenkeimung wurde bereits von Götz (2001) nachgewiesen.

Die untersuchten Linien der Transformation NT119 (*SK2::GUS*) wiesen, je nach Pflanze, eine unterschiedlich starke Aktivität des *SK2*-Promotors im Durchlassgewebe auf (Abbildung 2-32). Untersuchungen der Pollen zeigten ebenfalls eine Aktivität des *SK2*-Promotors und bestätigten frühere Analysen von Ficker *et al.* (1997), bei denen neben der griffelspezifischen *GUS*-Expression eine Aktivität des Promotors in Pollen und Pollenschläuchen nachgewiesen wurde (Abbildung 2-33). Da sich trotz der nachgewiesenen Aktivität des *SK2*-Promotors im Durchlassgewebe keine Veränderung des Pollenschlauchwachstums durch Expression von *NtCIF* erzielen ließ, wurden weitergehende Experimente durchgeführt. Ein Nachweis der Invertaseaktivität war mangels ausreichender Menge an Pflanzenmaterial nicht möglich. Deshalb wurden Northern-Analysen durchgeführt, um die Expression von *NtCIF* im Gewebe zu überprüfen. Diese war im Griffelgewebe im Vergleich zum Wildtyp deutlich erhöht, während sich *NtCIF*-RNA ansonsten nur noch in geringer Konzentration in Blattmaterial nachweisen ließ (Abbildungen 2-35 bis 2-39). Dies gilt für beide verwendete Promotoren (*SK2-3* und *Sat-SK2-7*, aus der Sorte 'Saturna'). Im Gegensatz dazu wurde in diesen Linien, und im Wildtyp, die Expression des Invertase-Inhibitors *NtVIF* vor allem im Wurzelgewebe und auch in Stängeln nachgewiesen.

Entgegen der Detektion einer erhöhten *GUS*-Expression durch den *SK2*-Promotor in Pollen und Pollenschläuchen konnte keine Erhöhung der *NtCIF*-Transkriptmenge in *in vitro* gekeimten Pollenschläuchen festgestellt werden. Dies könnte daran liegen, dass *GUS* relativ stabil ist und nur langsam abgebaut wird, was zu einer Akkumulation des *GUS*-Proteins in Pollen und Pollenschläuchen geführt haben könnte. Nach der Bestäubung wurde jedoch in den Griffeln einiger Pflanzen (NT121-1-4, NT122-1-35, NT122-2-2) ein Anstieg der Transkriptmenge detektiert. Dies ist wahrscheinlich auf die höheren natürlichen Keimungsraten auf der Narbe, im Vergleich zu den *in vitro* Keimungsbedingungen, und damit einer höheren RNA-Menge zu erklären.

Die Analyse der in den Blüten exprimierten Invertasen zeigt, dass im Griffel während des Pollenschlauchwachstums sowohl von väterlicher als auch von mütterlicher Seite eine sehr hohe Invertase-Aktivität vorliegt, hervorgerufen durch die Expression der Invertasen *Nin11*, *Nin21*, *Nin77*, *Nin88*, *Nt-VI* und *Ntβfruc1* (Abbildung 2-26). Für den Invertase-Inhibitor *NtCIF* ist bekannt, dass bei der Bestimmung der Invertase-Aktivität *in vitro* ein molares Mengenverhältnis von Inhibitor : Invertase = 10 : 1 vorliegen muss, um eine effektive Reduzierung der Invertase-Aktivität zu erreichen (Bonfig, unveröffentlichte Daten). Im Griffelgewebe der transgenen NT121- und NT122-Linien liegt jedoch ein Transkriptverhältnis von *NtCIF* : cwINVs = 1 : 3,5 vor, im Bezug auf die Gesamt-Transkriptmenge aller exprimierten Invertasen sogar von 1 : 5,5. Aufgrund dieser Ergebnisse ist davon auszugehen, dass das Verhältnis von Invertase-Inhibitor zu cw-INV nicht ausreicht, um im Durchlassgewebe die Invertase-Aktivität zu erniedrigen und dadurch das Pollenschlauchwachstum zu beeinflussen. Zudem ist die Spezifität des Inhibitors *NtCIF* noch nicht endgültig geklärt. So wurde gezeigt, dass *NtCIF* sowohl cw- als auch vac-INVs-Aktivität zu inhibieren vermag, während *NtVIF* spezifisch gegen vac-INVs zu wirken scheint (Rausch und Greiner, 2004). Weiterhin konnte bis jetzt die Lokalisation des *NtCIF*-Proteins *in vivo* nicht genau spezifiziert werden. Es kann daher nicht abgeschätzt werden, ob cw-INVs oder vac-INVs das primäre Ziel dieses Inhibitors sind. Außerdem wurde eine Substrat-Protektion der cw-INVs gegenüber einer *NtCIF*-vermittelten Erniedrigung der Invertase-Aktivität beschrieben (Weil *et al.*, 1994; Sander *et al.*, 1996; Bate *et al.*, 2004). Weil *et al.* (1994) beobachteten zudem einen deutlichen Rückgang der Inhibitor-Wirkung durch divalente Kationen, insbesondere Ca^{2+} . Bereits 2 mM Ca^{2+} führten bei Anwesenheit von *NtCIF* zu einer Erhöhung der Invertase-Aktivität um ca. 50 %. Da auch für das Pollenschlauchwachstum Ca^{2+} sehr wichtig ist, könnte die Ca^{2+} -Konzentration im Umfeld der Pollenschläuche die Interaktion von Invertasen und *NtCIF* beeinflussen, obgleich sich die Ca^{2+} -Konzentrationen an der Pollenschlauchspitze nur im μM -Bereich bewegen (Taylor und Hepler, 1997). Aufgrund nicht verfügbarer Antikörper gegen *NtCIF* konnte

die Inhibitor-Proteinmenge im Griffelgewebe nicht nachgewiesen werden. Es ist daher nicht auszuschließen, daß ein Abbau des exprimierten Inhibitors bzw. posttranskriptionelle Modifikationen am Protein selbst einen Einfluss auf die Inhibitor-Kapazität ausüben könnten.

3.5 Pollenkeimung und Pollenschlauchwachstum von *A. thaliana* und *N. tabacum* als Instrumente zum Verständnis des Zucker-Signaling in Pflanzen

Neben ihrer Funktion als Energiespeicher dienen Kohlenhydrate auch als Signalmoleküle zur Steuerung zahlreicher Prozesse in der Zelle. Bislang sind 5 verschiedene Signaling-Wege bekannt, die vermutlich unabhängig voneinander Zucker außerhalb oder innerhalb der Zelle identifizieren und als Antwort auf dieses Signal zum Teil direkt in die Regulation von Genen eingreifen können (1.3). Dieser Prozess ist in der Pflanze mit der Regulation durch Phytohormone eng vernetzt, was eine genaue Charakterisierung der einzelnen Signaling-Wege erschwert. Untersuchungen zur Aufklärung des Zucker-Signaling wurden bislang zu einem großen Teil im Rahmen von Samenkeimungsversuchen durchgeführt. Dazu wurden Samen auf Medien mit verschiedenen Kohlenhydratquellen ausgelegt und deren Keimverhalten verglichen. Mittels Transkriptionsanalyse wurde zudem die Expression verschiedener Gene unter dem Einfluss der Zucker analysiert. In *A. thaliana* wurden auf diese Weise Mutanten identifiziert, die gegenüber verschiedenen Kohlenhydraten eine Hyper- oder Hyposensitivität zeigen. Die Identifikation der mutierten Gene erlaubte somit einen Rückschluß auf deren Beteiligung am Signalingprozeß der Kohlenhydrate. Die Untersuchung von Organen oder ganzen Pflanzen erschwert jedoch die Betrachtung der Reaktionen in einzelnen Zellen, da jeweils die Signale vieler Zellen gemittelt werden und zudem in kompletten Pflanzen (Keimlingen) starke Hormonsignale generiert werden.

Pollenschläuche zählen zu den am schnellsten wachsenden Pflanzenzellen. Für dieses rasche Wachstum sind große Mengen an Energie nötig, die in Form von Kohlenhydraten apoplastisch zur Verfügung gestellt wird. Eine genaue Erkennung der vorliegenden Zucker ist für die Regulation der Wachstumsprozesse deshalb unerlässlich. Als Einzelzellen können Pollenschläuche zudem unabhängig von einem Gewebeverband kultiviert werden, was eine Interaktion mit Phytohormonsignalen minimiert. Aus vorhergehenden Untersuchungen war bereits bekannt, dass Pollen von

N. tabacum auf Glucose-haltigem Medium zwar auskeimen, das anschließende Wachstum der Pollenschläuche jedoch unterbleibt, während unter dem Einfluss von Saccharose eine normale Pollenschlauchbildung erfolgte (Goetz, 2001). Stadler *et al.* fanden 1999 heraus, dass Pollen von *Arabidopsis* unter dem Einfluss von Saccharose keimen, während weder Glucose noch Fructose im Medium zu einer Pollenkeimung führten und auch Tsukamoto und Matsubara (1968) sowie Chiang (1974) wiesen einen fördernden Effekt von Disacchariden auf die Keimung verschiedener Pollen nach. Zu einer genaueren Analyse wurden deshalb verschiedene Zucker als Kohlenhydratquelle für Pollenkeimungsanalysen an den beiden Modellpflanzen *A. thaliana* und *N. tabacum* verwendet. Während der Untersuchungen zeigte sich, dass beide Pflanzen unterschiedlich auf die verabreichten Zucker reagierten. Während bei *Arabidopsis* eine Beeinflussung der Pollenkeimungsfähigkeit zu beobachten war, zeigte sich bei *N. tabacum* ein Einfluss der verfügbaren Kohlenhydrate auf das Längenwachstum der Pollenschläuche.

3.5.1 Beteiligung Hexokinase-abhängiger und -unabhängiger Signalwege am Zucker-Signaling während der Pollenkeimung von *Arabidopsis*

Hexose-vermittelte Hemmung der Pollenkeimung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde nachgewiesen, dass von den untersuchten Hexosen (Glucose, Fructose, Galactose, Mannose, Mannitol, Sorbose, Sorbitol) lediglich Glucose in der Lage ist, als alleinige Kohlenstoffquelle die Pollenkeimung schwach zu unterstützen (4,2 %). Osmotische Effekte sind dabei auszuschließen, da 440 mM Saccharose zu einer starken Pollenkeimung führten, im Gegensatz zur Keimung auf 440 mM Mannitol oder Sorbitol. Sogar bei Anwesenheit von 440 mM Saccharose im Medium führten die Hexosen Fructose, Glucose, Galactose und Mannose bei einer Konzentration von nur 6 mM zu einer Reduzierung der Pollenkeimungsfähigkeit, so dass von einer Hemmwirkung der Hexosen auf die Pollenkeimung auszugehen ist. Die stärkste Hemmung wurde dabei unter dem Einfluss von Mannose beobachtet. Eine Verabreichung äquimolarer Konzentrationen von Glucose und Fructose, wie sie nach einer vollständigen Hydrolyse der Saccharose durch cw-INV's vorliegen könnte, führte ebenfalls zu einer sehr starken Hemmung der Pollenkeimung (Daten nicht gezeigt).

Die untersuchten Di- und Oligosaccharide beeinflussten die Saccharose-vermittelte Pollenkeimung in einer Konzentration von 6 mM nicht. Die alleinige Verabreichung von Cellobiose, Maltose, Raffinose, Melezitose und Stachyose führte zu Pollenkeimungs-

raten, die auch mit Saccharose erzielt wurden, während die Pollenkeimung von Trehalose, Lactose, Leucrose und Melibiose kaum unterstützt wurde. Eine Verringerung der Konzentration dieser Zucker in Gegenwart von Saccharose beeinträchtigte die Pollenkeimung jedoch nicht. Dies bedeutet, dass die mangelnde Unterstützung der Keimung durch manche Disaccharide (bei alleiniger Verabreichung) nicht durch eine Inhibition verursacht wird, als vielmehr durch eine ungenügende Verstoffwechselung, im Gegensatz zu den untersuchten Hexosen. In diesem Zusammenhang scheint die Verknüpfungsart der Saccharide Einfluss auf die Pollenkeimung zu haben. Die 1→2 und 1→4-verknüpften Glucodisaccharide Maltose und Cellobiose fördern die Pollenkeimung, während der Austausch einer Glucoseeinheit mit Galactose, wie in Lactose, zu einer drastischen Verringerung der Pollenkeimung führt. Auch andersartig verknüpfte Moleküle, sowie die nicht-metabolisierbare Dichlorosaccharose und die Saccharose-Isomere Turanose und Palatinose unterstützen den Keimungsvorgang kaum.

Der fördernde Effekt der Disaccharide Maltose und Cellobiose, sowie der untersuchten Oligosaccharide ist erstaunlich. Während bereits bekannt ist, dass die $\alpha(1\rightarrow4)$ -verknüpfte Maltose von verschiedenen Saccharosetransportern in *Arabidopsis* als Substrat akzeptiert wird (Sauer und Stolz, 1994; Schulze *et al.*, 2000; Sivitz *et al.*, 2007) wurden bislang keine Transporter identifiziert, die das $\beta(1\rightarrow4)$ -verknüpfte Isomer Cellobiose oder glycosylierte Saccharosen transportieren. An Pollen von *Lilium* wurde jedoch bereits beobachtet, dass diese gut unter Saccharose, Maltose und Cellobiose keimen und diese Disaccharide auch aufnehmen (Rosen, 1968; Deshusses *et al.*, 1981).

Die Hemmung der Saccharose-vermittelten Pollenkeimung durch Glucose und Mannose ist Hexokinase-abhängig

Auf eine Beteiligung der Hexokinase an der Monosaccharid-spezifischen Hemmwirkung wiesen Untersuchungen unter dem Einsatz des Hexokinase-Inhibitors Mannoheptulose hin: Der 16,7fache molare Überschuss an Mannoheptulose (100 mM) bewirkte eine vollständige Aufhebung der Glucose-vermittelten Inhibition der Pollenkeimungsrate bei einer Konzentration von 6 mM und auch die Mannose-vermittelte Inhibition wurde deutlich abgeschwächt. Bereits Pego *et al.* (1999) konnten die Mannose-abhängige Hemmung der Samenkeimung von *Arabidopsis* nur durch einen 10 – 20fach höheren molaren Überschuss von Mannoheptulose gegenüber Mannose aufheben, was auf eine geringere Affinität der Hexokinase für Mannoheptulose hindeutet. Dies wurde bestätigt von Experimenten, in denen ein

1,7facher molarer Überschuss von Mannoheptulose über Glucose nur zu einer sehr geringen Verbesserung der Pollenkeimungsrate führte (Daten nicht gezeigt).

Ein Einfluss der Hexokinase an der Monosaccharid-spezifischen Hemmwirkung wurde zudem durch Untersuchungen mit Glucose-Analoga belegt: Nur das von der Hexokinase phosphorylierbare Analogon 2-DOG führte zu einer starken Hemmung der Pollenkeimung, während 3-OMG und 6-DOG, die in der Zelle nicht weiterverarbeitet werden, keinen Effekt auf die Pollenkeimung ausübten. L-Glucose, das nicht in die Zelle transportiert wird, führte ebenfalls zu keiner Repression der Pollenkeimung.

Die Analysen der Hexokinase-Mutanten *gin2-1* und *gin2-2* (Moore *et al.*, 2003) belegten die Beteiligung an der Hexokinase-vermittelten Inhibition der Pollenkeimung durch Glucose und Mannose. Dabei zeigte sich, dass die Pollen von *gin2-1* unter Glucose-Einfluss geringfügig besser keimten als der Wildtyp, während Mannose zu einer 7-fach besseren Pollenkeimung der Mutante führte. Im Gegensatz dazu unterschied sich die durch 2-DOG vermittelte Inhibition der Mutanten jedoch nicht von den korrespondierenden Wildtypen. Dies könnte durch einen zusätzlichen, Hexokinase-unabhängigen Signaling-Weg verursacht werden. So beschrieben Kojima *et al.* (2007) eine zuckerabhängige Regulation der Ribosomensynthese. Während Saccharose und Glucose zu einer starken Induktion führten, konnten weder Mannitol noch 2-DOG eine Ribosomensynthese bewirken. Der Rückgang der Pollenkeimungsfähigkeit könnte zudem durch zelltoxische Effekte des 2-DOG hervorgerufen werden. So akkumuliert 2-DOG-6-Phosphat in der Zelle und blockiert die Glycolyse durch Inhibition der Phosphoglucose-Isomerase. Es hemmt zudem die Proteinsynthese und führt zu einer Veränderung der Protein-Glycosylierung. Außerdem führt die Anreicherung mit 2-DOG-6-Phosphat zu einem ATP-Rückgang in der Zelle (Kunze *et al.*, 2001; Kang und Hwang, 2006). Dzyubinskaya *et al.* (2006) beobachteten überdies eine Auslösung der Apoptose in Schließzellen von *Arabidopsis* nach Inkubation in 10 mM 2-DOG.

Beteiligung Hexokinase-unabhängiger Signalingwege bei der Pollenkeimung

Es war überraschend, dass die Zugabe von Glucose, Galactose oder Fructose zu 440 mM Cellobiose, Maltose oder Oligosacchariden die Pollenkeimungsrate nicht beeinflusste, während die Kombination dieser Hexosen mit 440 mM Saccharose eine Inhibition der Pollenkeimung zur Folge hatte. Dabei ist nicht anzunehmen, dass ein Vorhandensein von Cellobiose, Maltose oder Oligosacchariden generell inhibierend wirkende Signale der Hexokinase und anderer Zucker-Sensoren aufhebt, was zu einem Anstieg der Pollenkeimungsrate führen würde, da 2-DOG und Mannose auch in

diesen Systemen die Pollenkeimung inhibieren. Die Mannose-vermittelte Inhibition in Gegenwart von Cellobiose, Maltose und den Oligosacchariden kann dabei auch durch die Verwendung des Hexokinase-Inhibitors Mannoheptulose abgeschwächt werden (bis zu 7-fache Erhöhung der Pollenkeimungsrate; Daten nicht gezeigt). Dies bedeutet, dass die Hexokinase auch in Gegenwart der nicht-Saccharose Di- und Oligosaccharide am Zucker-Signaling beteiligt ist. Vielmehr scheint die räumliche Struktur dieser Hexosen eine wichtige Rolle in der nicht-Saccharose-vermittelten Förderung der Pollenkeimung zu spielen. So besitzen Mannose und 2-DOG auf der α -Seite deutlich weniger OH-Gruppen als Fructose, Glucose oder Galactose, weshalb diese Hexosen deutlich stärkere hydrophobe Interaktionen mit Proteinen eingehen können (Fernández, pers. Mitteilung; Hitz *et al.*, 1986; Abbildung 3-2). So ist es denkbar, dass z. B. Cellobiose die Bindung der Hexosen an Kinasen verhindert, weswegen keine Signale generiert werden, welche die Pollenkeimung inhibieren. Mannose und 2-DOG könnten jedoch aufgrund ihrer Struktur viel stärker an die Hexokinase binden, weshalb z. B. Cellobiose die Mannose- und 2DOG-vermittelte Inhibition der Pollenkeimung nicht unterdrücken kann. Es ist ebenfalls nicht auszuschliessen, dass ein nicht-Saccharose-spezifisches Signal von der Pflanze generiert wird, welches mit den Signalen anderer Zucker-Sensoren interagiert. Möglicherweise sind auch bislang unidentifizierte spezifische Transportproteine in diesen Signalingprozess involviert.

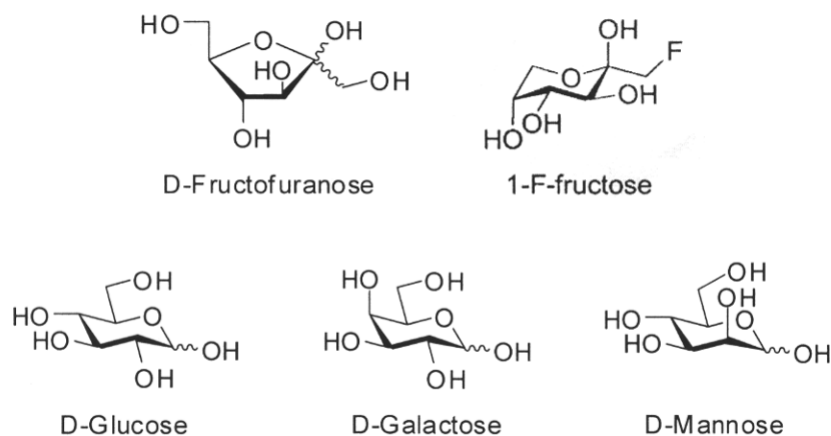


Abbildung 3-2: Anomere Strukturen verschiedener Hexosen.

Da zwar Hexosen durch cw-INV's und Glucosidasen während der Pollenkeimung produziert und mittels Hexosetransporter-Proteinen in den Pollenschlauch transportiert werden aber keine Keimung auf Monosaccharid-haltigem Medium erfolgt, ist davon auszugehen, dass ein Hexokinase-unabhängiges Zucker-Signaling für eine erfolgreiche Pollenkeimung erforderlich ist. Die Beobachtung, dass Fructose sowohl

bei den Wildtypen, als auch bei den *gin*-Mutanten zu einer Hemmung der Pollenkeimung führte, bestärkt die Vermutung, dass Fructokinasen am Zucker-Signaling beteiligt sind (Pego und Smeeckens, 2000). Die Bedeutung dieser Kinasen für die Pollenentwicklung verdeutlichten Untersuchungen von Karni und Aloni (2002), die in Pollen von Paprika einen starken Anstieg der Fructokinase-Aktivität zum Ende der Pollenentwicklung nachwiesen, während die Hexokinase-Aktivität unverändert niedrig blieb und auch in Pollen von *Lilium* konnte der größte Teil der Hexosekinase-Aktivität auf Fructokinase zurückgeführt werden (Nakamura *et al.*, 1991), während German *et al.* (2002) die gewebespezifische Expression einer Fructokinase in Pollen von Tomaten nachwiesen.

Bei der Erkennung der Fructose, sowohl als Hexose als auch im Disaccharid, scheint die anomere Struktur eine wichtige Rolle zu spielen. So liegt Fructose in wässriger Lösung in Furanose- und Pyranoseform vor. 1F-Fru nimmt in Lösung zu 80 % die β -Pyranoseform ein (Fernández, pers. Mitteilung; Abbildung 3-2). In Saccharose, Saccharose-Mehrfachzuckern, Palatinose und DAF III ist die Fructose in der Furanoseform fixiert, wobei der Fructoseanteil in Dichlorosaccharose und Leucrose als Pyranoseform vorliegt. Während 6 mM Fructose zu einer Inhibierung der Pollenkeimung führen, bewirkt die Zugabe von 6 mM DAF III, Dichlorosaccharose, Leucrose, Palatinose oder Turanose zum Keimungsmedium keine Veränderung der Pollenkeimungsfähigkeit. Da von Palatinose und Turanose bekannt ist, dass sie nicht metabolisiert werden lässt sich daraus schließen, dass in der Zelle freie Fructose erkannt wird und spezifische Reaktionen auslöst, während die gebundenen Fructosemoleküle keine spezifischen Signale erzeugen.

Prinzipiell kann Fructose von Hexokinasen und Fructokinasen erkannt werden. Beide Enzyme katalysieren die Umwandlung von Fructose in Fructose-6-Phosphat, was notwendigerweise die Furanoseform voraussetzt. In diesem Zusammenhang wiesen Myers und Matheson (1994) in *G. triacanthos* eine Fructokinase nach, die spezifisch nur die Furanoseform der Fructose als Substrat akzeptierte. Da die Affinität der Hexokinasen für Fructose um bis zu 1000fach geringer ist als gegenüber Glucose und Mannose (Claeyssen und Rivoal, 2007), sind Fructokinasen höchstwahrscheinlich für den Hauptanteil des Fructose-Metabolismus (und –Signalings) verantwortlich. Diese Vermutung wird auch von den Daten der Mannoheptulose-Experimente gestützt. Die Tatsache, dass die Fructose-vermittelte Inhibition der Pollenkeimung von Mannoheptulose nur teilweise wiederhergestellt werden konnte (von 36,5 auf 40,5 %) weist darauf hin dass Fructose nur zu einem geringen Teil von Hexokinasen erkannt wird (Abbildung 33). Fructokinasen scheinen demnach für die verbleibenden 7 %

Unterschied in der Pollenkeimungsrate verantwortlich zu sein, im Vergleich zu Pollen die auf Medium ohne Fructose keimen.

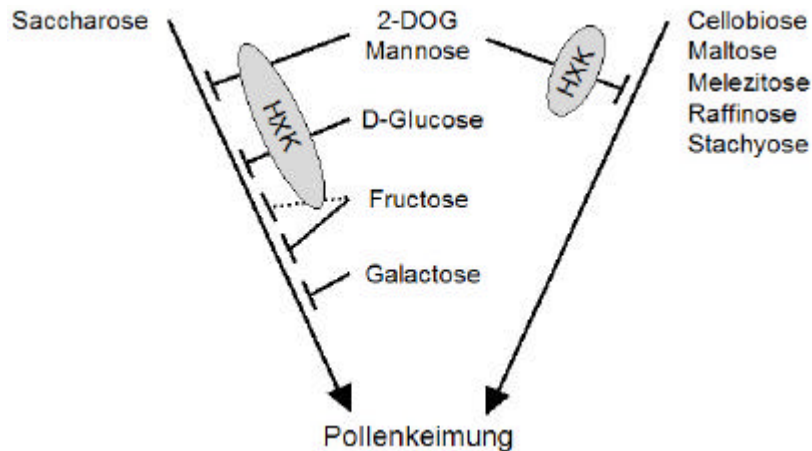


Abbildung 3-3: Schematische Darstellung des Einflusses verschiedener Hexosen auf die von unterschiedlichen Di- und Oligosacchariden unterstützte Pollenkeimung. Mannose, 2-DOG und Glucose inhibieren die Pollenkeimung über einen Hexokinase (HXK)-vermittelten Signalweg, während Fructose nur teilweise über den HXK-Weg erkannt wird. Die Galactose-vermittelte Hemmung erfolgt HXK-unabhängig.

Die Inhibition durch 6 mM 1F-Fructose fiel um ca. 10 % schwächer aus, verglichen mit der Keimung auf 6 mM Fructose, was auf die strukturelle Veränderung durch Einfügen der Fluorogruppe und der daraus resultierenden Modifikation des Verhältnisses von Furanose- zu Pyranoseform. Es wurde nachgewiesen, dass 1F-Fructose von Hexokinasen phosphoryliert werden kann, wenn auch mit einer deutlich geringeren Affinität als Fructose selbst (Haradahira *et al.*, 1995). Der Nachweis einer nur geringfügig erhöhten Pollenkeimungsrate unter 6 mM 1F-Fructose bei gleichzeitiger Verabreichung von Mannoheptulose beweist, dass Hexokinasen auch am Signaling von 1F-Fructose beteiligt sind. Bei einer Konzentration von 60 mM bewirkt 1F-Fructose eine vollständige Hemmung der Pollenkeimung, während Fructose nur zu einer Reduzierung der Keimungsrate auf ca. 50 % des Wertes in 440 mM Saccharose führt. Die Ursache liegt vermutlich in der Akkumulation von 1F-Fructose-6-Phosphat mit ähnlichen Auswirkungen wie bereits für 2-DOG diskutiert.

Der inhibierende Effekt von Galactose ist nicht Hexokinase-vermittelt (Abbildung 3-3), da Galactose nicht von Hexokinasen metabolisiert wird (Gonzali *et al.*, 2002). Dies wird auch von der Beobachtung unterstützt, dass Mannoheptulose keinen Einfluss auf die Galactose-inhibierte Pollenkeimung zeigte (Abbildung 2-42). Daraus kann gefolgert werden, dass höchstwahrscheinlich Galactokinasen am Galactose-Signaling beteiligt sind (Sherson *et al.*, 2003; Blöchl *et al.*, 2007). Die Existenz dieser Enzymklasse im Pflanzenreich wurde bereits in *Vicia faba* und *Arabidopsis* nachgewiesen (Dey, 1983; Kaplan *et al.*, 1997).

Hexose-vermittelte Ausbildung blasenartiger Strukturen an rehydrierten Pollen

Bei der Durchführung der Pollenkeimungsexperimente an *A. thaliana* fiel die Ausbildung blasenartiger Strukturen an den Pollenkörnern auf. Je nach verwendeter Kohlenhydratquelle variierten Größe und Anzahl der Blasen pro Pollenkorn, wobei die Verwendung von Monosacchariden zu einer sehr starken Blasenbildung führte. Es besteht ein Zusammenhang zwischen Pollenkeimung und Blasenbildung, da bei starker Blasenbildung kein Auskeimen erfolgte. Jedoch zeigten Pollen mit schwacher oder fehlender Blasenbildung, je nach Zucker, unterschiedliche Pollenkeimungsraten. Möglicherweise führt die Abwesenheit (di-)saccharidspezifischer Signale zu einem Abbruch der Pollenschlauchentwicklung, nachdem die Initiation der Keimung durch interne Energiespeicher unterstützt wurde.

Da im Lichtmikroskop der Ursprung der Blasen nicht identifiziert werden konnte, wurden die Pollen im Rasterelektronenmikroskop analysiert. Dabei zeigte sich, dass die Blasen wahrscheinlich aus Membranausstülpungen (Intine) bestanden, die aus den Keimfalten herausragten. Die transmissionselektronenmikroskopischen Aufnahmen belegten, dass die Blasen zahlreiche Einschlüsse aufwiesen. Van Aelst *et al.* (1993) zeigten, dass Pollen von *A. thaliana* nach der Rehydrierung im vegetativen Plasma zahlreiche Vakuolen bilden. Die Menge der Einschlüsse in den Membranausstülpungen erinnert dabei sehr stark an die zahlreichen, unterschiedlich großen Vesikel im Bereich der Pollenschlauchspitze ("*clear zone*"), die mit Polysacchariden gefüllt sind und für die Neusynthese der Zellwand während des schnellen Wachstums erforderlich sind (Cresti *et al.*, 1977; Mascarenhas, 1993; Lennon und Lord, 2000; Derksen *et al.*, 2002). Wie in der *clear zone* sind auch in den untersuchten Blasenstrukturen keinerlei Organellen zu finden. Allerdings wurde keine Exozytose der putativen Vesikel beobachtet, die als Voraussetzung für eine aktive Zellwandneusynthese angesehen wird. Es ist deshalb nicht auszuschließen, dass die Membranausstülpungen die Anfangsphase des Pollenschlauchwachstums darstellen, das in diesem frühen Stadium durch zuckerabhängige Inhibierung der Exocytose arretiert ist. Verschiedene Untereinheiten des pflanzlichen Exocyst-Komplexes, der an der Zielführung sekretorischer Vesikel zu bestimmten Regionen der Plasmamembran beteiligt ist, werden sehr stark in reifen Pollenkörnern exprimiert (Cole *et al.*, 2005; Synek *et al.*, 2006). *In silico* Expressionsanalysen wiesen zudem auf eine zuckerabhängige Regulierung hin, wobei *Exo70H3* (At3g09530) durch Saccharose induziert und von Glucose und Mannitol reprimiert zu werden scheint (Daten nicht gezeigt). Die Behandlung mit diesen Hexosen löste bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimenten eine starke Blasenbildung aus. Die Tatsache, dass eine sehr starke Verdünnung der inhibierenden Zuckerkonzentration das Pollenschlauchwachstum nicht

wiederherstellen kann (Daten nicht gezeigt) weist zudem darauf hin, dass die zuckerabhängige Inhibition der Pollenkeimung in zentrale Prozesse dieses physiologischen Vorgangs eingreift.

Bei den blasenartigen Strukturen könnte es sich jedoch auch um austretenden Pollenkitt handeln, da die zahlreichen Einschlüsse an Lipidtröpfchen innerhalb des Pollenkitts erinnern, der nach dem Kontakt mit der Narbe teilweise austritt und einen Übergang zwischen Pollen und Narbengewebe darstellt (Preuss *et al.*, 1993; Zinkl *et al.*, 1999). Ein möglicher Einfluss der Kohlenhydratverfügbarkeit auf den Pollenkittaustritt ist jedoch unklar.

Vergleichende Analysen mit keimenden Pollen auf Saccharose-Medium sollten Hinweise dahingehend liefern, ob sich die Membranausstülpungen von frühen Phasen des Pollenschlauchwachstums unterscheiden. Im Verlauf dieser Arbeit war es nicht möglich, auskeimende Pollen auf Saccharose-Medium elektronenmikroskopisch zu untersuchen, da die Keimung bereits sehr schnell und unsynchronisiert abläuft und die Pollen nach Inkubationszeiten von etwa 60 Minuten nicht auf dem Pollenkeimungsmedium haften, was den Verlust großer Pollenmengen im Verlauf der Fixierung und Probenaufbereitung bedeutet.

Während die Verwendung von Monosacchariden zu einer sehr starken Blasenbildung führte, reagierten die Pollen je nach Disaccharid unterschiedlich. Palatinose und GPM führte zu starker Blasenbildung, bei der Inkubation in Saccharose oder Maltose waren hingegen nur vereinzelte Blasen sichtbar. Bei Verabreichung von Cellobiose, Turanose oder Sucralose erfolgte jedoch keine Ausbildung blasenartiger Strukturen.

Die Ursache für das unterschiedliche Vermögen der verschiedenen Disaccharide, die Blasenbildung zu hemmen, ist unklar. Im Gegensatz zur Pollenkeimung scheint die Verknüpfungsart der Saccharide keinen Einfluss auf die Blasenbildung auszuüben.

3.5.2 Einfluss der Kohlenhydratquelle auf das Pollenschlauchwachstum von *Nicotiana tabacum*

Glucose-vermittelte Hemmung des Pollenschlauchwachstums

Im Gegensatz zu *Arabidopsis* hemmte Glucose im Medium die Pollenkeimung von *N. tabacum* nicht, sondern führte zu einer deutlichen Reduzierung des Pollenschlauchwachstums. Während die Pollenschläuche unter Saccharose-Einfluss nach 2,5 Stunden größtenteils 100 µm und länger waren, führte eine Inkubation mit Glucose hauptsächlich zu angekeimten Pollen, deren Pollenschläuche zu einem Anteil

von etwa 60 % nicht länger waren als 50 μm . Anders als bei *Arabidopsis* wurden bei Tabak keine blasenartigen Strukturen beobachtet. Da Tabak-Pollen auch in Gegenwart von Glucose und anderen Monosacchariden auskeimen, wird vermutlich das Blasenstadium übergangen. Osmotische Effekte als Ursache konnten ausgeschlossen werden, da 555 mM Saccharose zu einer normalen Pollenkeimung führten, im Gegensatz zu 555 mM Mannitol. Auch Mannose führte zu einer starken Inhibierung des Pollenschlauchwachstums (Daten nicht gezeigt). Eine Behandlung mit Mannoheptulose, zur Inhibierung der Hexokinase, ergab keine eindeutigen Ergebnisse. Vermutlich war eine Konzentration von 100 mM des Hexokinase-Inhibitors im Vergleich zu 555 mM Glucose zu gering, um eine effektive Hemmung herbeizuführen (S. 116 – 117).

Lemoine *et al.* identifizierten 1999 das pollenspezifische Saccharose-Transportprotein NtSUT3. Dies ließ darauf schließen, dass die Saccharose während der Entwicklung der Pollenschläuche nicht vollständig von cw-INV's gespalten und über Hexosetransporter in die Zelle aufgenommen wird. Im Rahmen von Konkurrenzexperimenten konnte Goetz (2001) nachweisen, dass 40 % des aufgenommenen Kohlenstoffs in Tabak-Pollenschläuchen auf eine intakte Inkorporation von Saccharose zurückzuführen ist. Eine Steigerung der cw-INV-Aktivität während der Pollenkeimung (Goetz, 2001) deutet zudem darauf hin, dass zu Beginn des Pollenschlauchwachstums Kohlenstoff in Form von Saccharose aufgenommen wird und erst zu einem späteren Zeitpunkt, während des starken Pollenschlauchwachstums, Hexosen präferiert werden. Dies deckt sich mit der Beobachtung, dass in binucleaten Pollen (wie in *N. tabacum*) die Teilung des generativen Kern in die beiden Spermkerne erst nach der Auskeimung erfolgt und einen Übergang von autotrophem zu heterotrophem Wachstum darstellt (Lemoine *et al.*, 1999).

Förderung des Pollenschlauchwachstums durch Fructose

Neben Saccharose führte die Beigabe von 6 mM Fructose zu 555 mM Glucose im Keimungsmedium zu einer deutlichen Verlängerung der Pollenschläuche. Freie Fructose liegt im Medium sowohl in Furanose- als auch in Pyranoseform vor. Um den Einfluss der Molekülstruktur der Fructose zu untersuchen, wurde das Glucose-haltige Keimungsmedium mit 6 mM 1F-Fru versetzt. Dies liegt in wässriger Lösung zu 80 % in β -Pyranoseform vor (S. 119). Es zeigte sich, dass sich die Verteilung der Pollenschlauchlängen bei Zugabe des synthetischen Moleküls 1F-Fru nicht von der Glucose-Kontrolle unterschied. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass der Einfluss der

Fructose auf das Längenwachstum der Pollenschläuche auf die Furanoseform zurückzuführen ist.

In den Disacchariden Saccharose, Palatinose und Turanose ist die Furanoseform fixiert. Während die Beigabe von 6 mM Saccharose zu 555 mM Glucose zu einer Verlängerung der Pollenschläuche führte, wurde dieser Effekt mit Palatinose und Turanose jedoch nicht erzielt. Da diese beiden Saccharose-Isomere in der Pflanze nicht metabolisiert werden, lässt diese Diskrepanz der Pollenschlauchlängen im Vergleich zur Beigabe von Saccharose vermuten, dass nicht der Fructose-Anteil im intakten Disaccharid-Molekül erkannt wird, sondern erst nach der Spaltung durch Freisetzung der Fructose-Moleküle. Es ist jedoch ebenfalls nicht auszuschließen, dass die Saccharide selbst von den Pflanzenzellen identifiziert werden und spezifische Reaktionen auslösen.

Zudem wird die Fructokinase als möglicher zusätzlicher Sensor zur Hexokinase diskutiert (Gupta und Kaur, 2005). Durch die Analyse Zucker-insensitiver mig-Mutanten in *Arabidopsis* wurde eine Mutante identifiziert, die hinsichtlich einer spezifischen Fructokinase-Aktivität defizient war (Pego und Smeeckens, 2000). Die Relevanz der Fructokinasen während der Pollenkeimung wird durch den Nachweis einer antheren- und pollenspezifischen Fructokinase in *L. esculentum* bestärkt (German *et al.*, 2002) und auch die Analyse der Kinaseaktivitäten in Pollen von *Lilium* zeigte, dass ein Großteil der Aktivität auf Fructokinasen zurückzuführen ist (Nakamura *et al.*, 1991).

Die Hemmung des Pollenschlauchwachstums durch 555 mM Glucose könnte jedoch auch eine physiologische Ursache haben. Tadege und Kuhlemeier wiesen 1997 eine starke, glucose-induzierbare Ethanolproduktion in Antheren und Pollen von *N. tabacum* nach. Diese aerobe Gärung trägt vermutlich zur Sicherstellung des gesteigerten Energiebedarfs während der Pollenentwicklung und der Pollenkeimung bei, indem Acetyl-CoA aus Pyruvat zur Verfügung gestellt wird. Unter den Versuchsbedingungen wurden über 50 % der Glucose vergärt und auch Mellema *et al.* (2002) zeigten, dass mindestens 20 % der aufgenommenen Saccharose von Pollenschläuchen vergärt wurden. Vor allem der Aldehyddehydrogenase kommt dabei eine wichtige Stellung zu, da sie den giftigen Acetaldehyd in Acetat umwandelt (op den Camp und Kuhlemeier, 1997). 50 mM Glucose führten dabei zu einem sehr starken Anstieg der Ethanolproduktion. Unter den gewählten Versuchsbedingungen (555 mM Glucose) für die Pollenkeimungsanalysen könnte dabei die Ethanol- bzw. Acetaldehydkonzentration einen toxischen Wert überschritten haben, zumal Scott *et al.* (1995) feststellten, dass Microsporen von Gerste unter 40 mM Saccharose abstarben, verursacht durch einen starken Anstieg der Ethanolkonzentration. Diese Beobachtungen wurden bestärkt durch die Analyse eines Restorer-Gens, das für die Aufhebung der cytoplasmatischen

männlichen Sterilität in Mais benötigt wird. Dabei handelt es sich um eine putative Aldehyddehydrogenase, die möglicherweise in die Detoxifizierung des durch aerobe Gärung entstandenen Acetaldehyds während der Pollenentwicklung involviert ist (Cui *et al.*, 1996; Schnable und Wise, 1998).

3.6 Ausblick

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die männliche Fertilität transgener *Arabidopsis*-Pflanzen durch Beeinflussung der cw-INV-Aktivität mittels Antisense-Technologie und durch Expression proteinogener Invertase-Inhibitoren (mit schwächeren Effekten) herabgesetzt werden kann. Um dieses System für den Bereich der Biosicherheit transgener Pflanzen sowie für die Hybridzüchtung praktisch nutzen zu können, muss die transgen vermittelte männliche Sterilität wieder aufgehoben werden können, um eine Vermehrung dieser Pflanzen über Saatgut zu ermöglichen. Zur Wiederherstellung der männlichen Fertilität eignen sich Invertasen, die nicht durch die übertragenen Antisense-Mechanismen und die Expression der proteinogenen Invertase-Inhibitoren beeinflusst werden können. Denkbar sind in diesem Zusammenhang Invertasen aus sehr weit entfernt verwandten Pflanzenarten bzw. auch aus Hefe, wie z. B. die *Suc2* (von Schaewen *et al.*, 1990). Als weitere Möglichkeit kann auch die spezifische Expression eines Saccharose-Transporters in Betracht gezogen werden, um vermehrt Saccharose aus dem Apoplasten in die Pollen bzw. Pollenschläuche aufzunehmen, welche dann von intrazellulären Invertasen bzw. Saccharose-Synthasen gespalten werden kann.

Zur gezielten Wiederherstellung der Fertilität sollten chemisch induzierbare Promotoren eingesetzt werden, um möglichst einfach auch großflächige Pflanzenbestände (z. B. im Feldanbau) behandeln zu können. Dabei erscheint eine Nutzung von Ergosterol-, Dexamethason- oder Ecdyson-induzierbaren Promotoren als sinnvoll (Übersicht in: Zuo und Chua, 2000; Padidam, 2003). Es ist auch die Nutzung pflanzeigener Promotoren möglich, wie z. B. der Brassinosteroid-induzierbare Promotor *Lin6* (Goetz *et al.*, 2000). Eine derartige Hormonbehandlung würde als Nebeneffekt gleichzeitig das Pflanzenwachstum positiv beeinflussen. Für die sichere Nutzung eines dieser Systeme muss jedoch eine möglichst geringe basale Aktivität des verwendeten Promotors sichergestellt sein.

Die Expression des proteinogenen Invertase-Inhibitors *NtCIF* in der Narbe bzw. im Durchlassgewebe von *N. tabacum* bewirkte keine Veränderung des Pollenschlauchwachstums in diesen Geweben, was vermutlich auf eine unzureichende Inhibierung der

cw-INV-Aktivität zurückzuführen ist. Die Expressionsdaten der im Rahmen dieser Arbeit identifizierten Invertasefamilie zeigen, dass zahlreiche Invertasen in diesen Geweben aktiv sind. Zur effektiven Herabsetzung der Invertaseaktivität im Griffelgewebe sollte deshalb auf die Antisense-Technologie bzw. RNA-Interferenz zurückgegriffen werden. Dabei empfiehlt es sich, gleichzeitig mehrere Invertasen (*Nin11*, *Nin21*, *Nt-VI*) zu inaktivieren, wie von Abbott *et al.* (2002), Miki *et al.* (2005) oder Pawloski *et al.* (2006) beschrieben. Mit Hilfe der streng gewebespezifischen Promotoren *STIG1* und *SK2* ist es zudem möglich, die Beteiligung verschiedenster Faktoren am Pollenschlauchwachstum und der Pollenschlauchleitung *in vivo* zu untersuchen. So kann durch die Expression von Synthasen oder Oxidasen im Griffelgewebe der Einfluss endogener Hormonlevel (z. B. Auxin, Cytokinin, Gibberellin, Ethylen) auf das Pollenschlauchwachstum untersucht werden. So zeigten Proels *et al.* (2006) bereits *in vitro*, dass die pollenspezifische Expression einer Gibberellinoxidase zu einer Behinderung der Pollenkeimung führt. Außerdem könnte die Expression von Galactosidasen sowie die spezifische RNA_i gegen Arabinogalactanproteine im Griffelgewebe Rückschlüsse auf deren Beteiligung an der Ernährung und Leitung der Pollenschläuche zulassen.

Mittels der *Arabidopsis*-Pollenkeimungsanalysen von Wildtyp- und *gin*-Pollen wurde nachgewiesen, dass neben der Hexokinase noch weitere, Hexokinase-unabhängige Signalwege am Zucker-Signaling in der Pflanze beteiligt sind. Während Hexosen über den Hexokinaseweg zu einer Inhibition der Pollenkeimung führen, bewirken verschiedene Disaccharide eine Förderung der Pollenkeimung. Um die Beteiligung Hexokinase-unabhängiger Signalwege aufzuklären ist es sinnvoll, die Pollenkeimung anderer Mutanten zu untersuchen (Übersicht in: Pego *et al.*, 2000; Gibson, 2005). Dabei ist die Analyse der nicht-Saccharose-vermittelten Aufhebung der Fructose-, Glucose- und Galactose-bedingten Inhibition der Pollenkeimung in diesem Zusammenhang von besonderem Interesse. Der Verwendung chemisch modifizierter Kohlenhydrate kommt dabei eine große Bedeutung zu, da mit Hilfe dieser Substanzen zudem die Bedeutung der Kohlenhydratstruktur auf die Auslösung von Zuckersignalen aufgeklärt werden kann. Durch den Einsatz C6-substituierter Fructose bzw. C1-substituierter Galactose könnte zudem indirekt der Einfluss von Fructo- und Galactokinasen am Zucker-Signaling untersucht werden. Diese modifizierten Hexosen könnten die Zuckererkennung behindern, da sie die notwendige Phosphorylierung an C6- bzw. C1-Position verhindern.

Zur weiteren Untersuchung der zuckerabhängigen Ausbildung von Blasenstrukturen an rehydrierten Pollen empfiehlt es sich, das Anfangsstadium des Saccharose-vermittelten Pollenschlauchwachstums elektronenmikroskopisch mit den Blasen-

strukturen zu vergleichen um abzuklären, ob die Blasen das Frühstadium des Pollenschlauchwachstums darstellen. Eine Beteiligung des Exocystkomplex-Proteins Exo70H3 an der putativen zuckerabhängigen Inhibierung der Exocytose kann überprüft werden, indem die Expression dieses Proteins über RNAi oder Antisense-Technologie herabgesetzt und der Pollenphänotyp dieser transgenen Pflanzen analysiert wird. Ferner sollten die *in silico* Expressionsdaten von *Exo70H3* zur zuckerabhängigen Regulation über Northern-Analysen oder RT-PCR verifiziert werden.

4 Materialien und Methoden

4.1 Materialien

4.1.1 Chemikalien und Enzyme

Die verwendeten Chemikalien und Kits wurden, soweit nicht anders vermerkt, von folgenden Firmen bezogen: Amersham (Buckinghamshire, UK), AppliChem (Darmstadt), Diagonal (Münster), Macherey-Nagel (Düren), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg), Sigma-Aldrich (Taufkirchen).

DNA-Polymerase (*Taq*) wurde von der Firma Se genetic (Borken) und alle weiteren verwendeten Enzyme von Fermentas (St. Leon-Roth) bezogen.

Die Kohlenhydrate Glucopyranosylmannitol (GPM), Glucopyranosylsorbitol (GPS) und Palatinose wurden freundlicherweise von der Südzucker AG (Mannheim) zur Verfügung gestellt.

Die chemisch synthetisierten Kohlenhydrate 1-Fluoro-1-deoxy-D-fructose (1F-Fru), 6,6'-Dichloro-6,6'-dideoxysaccharose (DCS) sowie α -D-Fructofuranose- β -D-fructofuranose 1,2':2,3'-dianhydrid (DAF III) wurden von Prof. Fernández (Sevilla, Spanien) zur Verfügung gestellt.

4.1.2 Nährmedien und Phytohormone

MS-Fertigmedium (MS 222), sowie die Phytohormone 6-Benzylaminopurin (BAP), Kinetin, Naphtylessigsäure (NAA) und das Antibiotikum Ticarcillin wurden von der Firma Duchefa (Haarlem, NL) bezogen.

Bakterienmedien:

Agrobakterien-

Testmedium 10 g Lactose, 1 g Hefeextrakt, 20 g Bacto-Agar

LB-Medium 10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 10 g NaCl → pH 7,0
für Festmedium 15 g/l Bacto-Agar (Antibiotika: 100 mg/l)

SOB-Medium 20 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 0,5 g NaCl → pH 7,0

SOC-Medium SOB-Medium + 20 mM Glucose

YEB-Medium	5 g Beefextrakt, 5 g Pepton, 1 g Hefeextrakt, 5 g Saccharose, 0,5 g MgSO ₄ → pH 7,2 (Antibiotika: 100 mg/l)
MinA-Salz (5x)	52,5 g K ₂ HPO ₄ , 22,5 g KH ₂ PO ₄ , 5 g (NH ₄) ₂ SO ₄ , 2,5 g Na-Citrat
Agrobakterien-Minimalmedium	10 ml MinA-Salz (5x), 40 ml H ₂ O, 50 µl 20 % MgSO ₄ , 500 µl 20% Glucose, 5 µM Acetosyringon, 100 mg/l Kanamycin
G-Medium	4,4 g MS 222, 10 g Glucose → pH 5,5; nach Autoklavieren Zugabe von: 1 mg/l 2,4-D, 0,01 mg/l GA ₃ , 1 mg/l Kinetin, 5 µM Acetosyringon

Pflanzenmedien:

NB-Medium	4,4 g MS 222, 20 g Saccharose, 3 g Gelerite → pH 5,8; nach Autoklavieren Zugabe von: 0,2 mg/l NAA, 1 mg/l BAP, 1 ml 5 µM Acetosyringon
MG-Medium	4,4 g MS 222, 20 g Saccharose, 3 g Gelerite → pH 5,7; nach Autoklavieren Zugabe von: 0,2 mg/l NAA, 1 mg/l BAP, 50 mg/l Kanamycin, 160 mg/l Ticarcillin
Pollenkeimungsmedium <i>Arabidopsis</i> (2x)	0,8 mM CaCl ₂ , 0,8 mM H ₃ BO ₃ , 2 % Low Melt Agarose
Pollenkeimungsmedium Tabak (2x)	3,2 mM H ₃ BO ₃ , 2,6 mM Ca(NO ₃) ₂ , 1,6 mM MgSO ₄ , 2 mM KNO ₃
SRR-Medium	4,4 g MS 222, 10 g Saccharose, 3 g Gelerite → pH 5,7; nach Autoklavieren Zugabe von: 50 mg/l Kanamycin, 160 mg/l Ticarcillin

Alle Medien (außer Pollenkeimungsmedien) wurden bei 121 °C und 2 bar für 30 min autoklaviert. Hitzeempfindliche Komponenten, wie z. B. Antibiotika, wurden sterilfiltriert und nach dem Abkühlen der Medien in den entsprechenden Konzentrationen zugefügt.

4.1.3 Puffer und Lösungen

Benedicts-Reagenz	173 g Na-Citrat + 100 g Na ₂ CO ₃ in 700 ml H ₂ O lösen, 17,2 g CuSO ₄ in 200 ml H ₂ O lösen → beide Lösungen → ad 1 l
Blockierungslösung	10 % Blocking Reagent in 100 mM Maleinsäure, 150 mM NaCl → pH 7,5; H ₂ O _{DEPC}
BS	2 % BSA in PBT
CIA	Chloroform:Isoamylalkohol = 24: 1
Denhardts (50x)	1 % PVP K 30, 1 % BSA, 1 % Ficoll 400
DNA-Extraktionspuffer	100 mM Tris (pH 8,0), 50 mM EDTA (pH 8,0), 500 mM NaCl, 1,5 % SDS, 1 % β-Mercapto-ethanol
Fixierlösung	5 % Formaldehyd, 80 mM EGTA, 10 % DMSO, 0,1 % Tween 20 in PBS
GUS-Assaypuffer	GUS-Extraktionspuffer, 2 mM 4-MUG
GUS-Extraktionspuffer	50 mM Na-Phosphat-Puffer (pH 7,0), 10 mM EDTA, 0,1 % Triton X-100, 0,1 % Na-Laurylsarcosin, 10 mM β-Mercaptoethanol
GUS-Färbelösung	10 mg X-Gluc (gelöst in 100 µl DMF) in 20 ml 50 mM NaP _i (pH 7,0)
H ₂ O _{DEPC}	0,1 % DEPC → üN, RT → autoklavieren
HB	5x SSC, 0,1 % Laurylsarcosin, 0,02 % SDS, 2 % Blockierungslösung, 50 % Formamid
N2	100 mM Tris, 15 % EtOH, 900 mM KCl → mit H ₃ PO ₄ einstellen auf pH 6,3
N3	100 mM Tris, 15 % EtOH, 1,15 M KCl → mit H ₃ PO ₄ einstellen auf pH 6,3
N5	100 mM Tris, 15 % EtOH, 1 M KCl → mit H ₃ PO ₄ einstellen auf pH 8,5
Northern-Hybridisierungslösung	50 % Formamid, 5x SSC, 5x Denhardts, 0,1 % SDS, 5 mM EDTA, 100 µg/ml DNA aus Lachssperma

NTE	500 mM NaCl, 1 mM Tris, 1 mM EDTA → pH 7,5; H ₂ O _{DEPC}
Nuclei-Puffer	0,3 M Saccharose, 10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 1 mM EDTA
P1	10 mM Tris (pH 8,0), 5 mM EDTA (pH 8,0)
P2	200 mM NaOH, 1 % SDS
P3	5 M NaAc → pH 4,8
PBS	7,9 g/l NaCl, 0,2 g/l KCl, 1,15 g/l Na ₂ HPO ₄ , 0,2 g/l KH ₂ PO ₄ , → pH 7,2; H ₂ O _{DEPC}
PBT	0,1 % Tween 20 in PBS
PL1	100 mM NaAc, 50 mM EDTA, 500 mM NaCl, 2 % PVP, 1,4 % SDS
Puffer 3	100 mM Tris, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl ₂ → pH 9,5
RNA-Denaturierungspuffer	4 M Guanidiumthiocyanat, 25 mM Natriumcitrat, 0,5 % N-Lauryl-Sarcosin, 0,7 % β-Mercapto-ethanol
RNA-Ladepuffer	76 µl 5x RNA-Running Buffer, 126 µl Formaldehyd, 378 µl Formamid, 76 µl 10x DNA-Ladepuffer, 5 µl Ethidiumbromid (5mg/ml)
RNA-Running Buffer (5x)	200 mM MOPS, 50 mM NaAc, 5 mM EDTA, 0,1 % DEPC → pH 7,0
Saures Phenol	Phenol bei 60 – 70 °C auftauen, Zugabe 2 Vol H ₂ O und 0,1 % 8-Hydroxychinolin → ün, H ₂ O-Phase verwerfen und erneut mit H ₂ O ausschütteln
SSC (20x)	3 M NaCl, 300 mM Na-Citrat → pH 7,0
TB	55 mM MnCl ₂ , 15 mM CaCl ₂ , 250 mM KCl, 10 mM PIPES → pH 6,7
TBE (5x)	54 g Tris, 27,5 g H ₃ BO ₃ , 20 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0) → pH 8,3

4.1.4 Verwendete Organismen

4.1.4.1 Bakterien

Escherichia coli DH5a:

E. coli DH5a wurden für alle Klonierungsarbeiten verwendet. Die Kultivierung erfolgte entweder auf LB-Agarplatten im Wärmeschrank oder in LB-Flüssigmedium im Schüttler bei 37 °C.

Agrobacterium tumefaciens LBA4404:

A. tumefaciens LBA4404 wurden sowohl für die 'Floral dip'-Transformation von *A. thaliana* verwendet (4.2.2.1) als auch für die Transformation von *N. tabacum* (4.2.2.2). Die Kultivierung der Bakterien erfolgte entweder in YEB-Flüssigmedium im Wasserbadschüttler, oder auf LB-Agarplatten bei 28 °C im Wärmeschrank.

4.1.4.2 Pflanzen

Arabidopsis thaliana:

Folgende Wildtypen und Mutanten wurden im Rahmen dieser Arbeit verwendet:

Col-0	Wildtyp 'Columbia'
Ler	Wildtyp 'Landsberg <i>erecta</i> '
<i>gin2-1</i>	' <i>glucose insensitive 2-1</i> ', Ler-Hintergrund
<i>gin2-2</i>	' <i>glucose insensitive 2-2</i> ', Col-0-Hintergrund

Brassica napus:

Zur Extraktion von genomischer DNA und RNA aus verschiedenen Geweben von Raps wurde *B. napus* cv. 'Drakhar' verwendet.

Nicotiana tabacum:

Im Rahmen dieser Arbeit wurden für die Tabak-Analysen *N. tabacum* cv. 'SR1' sowie 'SNN' verwendet.

4.1.5 Computerprogramme, Webseiten

Adobe Photoshop 6 (Adobe Systems, San Jose, USA)

AgnesRootsMeter (Grzegorz Zysko, Würzburg)

Microsoft Office 2007 (Microsoft Corporation, Redmond, USA)

Vector NTI 10 (Invitrogen, Carlsbad, USA)

<http://bioinfo.genopole-toulouse.prd.fr/multalin/multalin.html>

<http://iubio.bio.indiana.edu/treeapp/treeprint-form.html>

<http://www.arabidopsis.org/>

<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

<http://www.scripps.edu/~cdputnam/protcalc.html>

<https://www.genevestigator.ethz.ch/>

4.2 Methoden

4.2.1 Pflanzenanzucht

4.2.1.1 *Arabidopsis thaliana*

Das Wachstum der Pflanzen erfolgte in Klimakammern unter Kurztagbedingungen (9 h Licht und 15 h Dunkelheit) bei einer Temperatur von 22°C am Tag, bzw. 18 °C in der Nacht. 2 Wochen nach der Aussaat wurden die Keimlinge einzeln in Töpfe pikiert (7 cm Durchmesser) und bis zur Blüte weiterkultiviert. Die Induktion der Blütenbildung vor und nach Transformationen erfolgte in Langtagbedingungen (16 h Licht, 8 h Dunkelheit). Zur Samenernte wurden die Blütenstände, nach dem Umfärben der ersten Schoten auf gelb-braun, in Papiertüten gesteckt. Die Pflanzen wurden anschließend noch 2 Wochen gegossen. Nach dem Eintrocknen der Pflanzen wurden die Samen geerntet und mittels eines Siebes von anderen Pflanzenteilen gereinigt. In Reaktionsgefäße abgefüllt wurden die Samen bei 4 °C dunkel gelagert.

Samen von heterozygoten, transgenen Pflanzen wurde steril in Petrischalen auf MS-Medium mit den erforderlichen Antibiotika zur Selektion ausgesät. Die Keimlinge

wurden für 2 – 3 Wochen unter Kurztagbedingungen kultiviert und anschließend in Substrat pikiert.

4.2.1.2 *Brassica napus*

Aussaat und Kultur der Raps-Pflanzen erfolgte im Gewächshaus des Julius-von-Sachs-Instituts bei 22 °C Tages- und 18 °C Nachttemperatur unter Zusatzlicht (12 h mittels Natrium-Hochdruckdampflampen).

4.2.1.3 *Nicotiana tabacum*

Die Aussaat und Weiterkultur der Tabak-Pflanzen erfolgte ebenfalls im Gewächshaus des Julius-von-Sachs-Instituts bei 22 °C Tages- und 18 °C Nachttemperatur unter Zusatzlicht (12 h mittels Natrium-Hochdruckdampflampen). Zur Samengewinnung wurden die braun gefärbten Samenkapseln abgeschnitten und durch Sieben von Verunreinigungen befreit. Die Samen wurden in Kunststoffröhrchen abgefüllt und kühl und trocken gelagert.

Zur Gewinnung von sterilem Blattmaterial für Agrobakterien-vermittelten Gentransfer wurden Samen von *N. tabacum* oberflächensterilisiert und auf MS-Medium steril ausgesät. Zur Erhaltung der Pflanzen wurden Sprossstücke mit mindestens einem Nodium in Weckgläsern mit MS-Medium subkultiviert.

Samen von heterozygoten, transgenen Pflanzen wurde steril auf MS-Medium mit den erforderlichen Antibiotika in Weckgläsern ausgelegt und unter Langtagbedingungen kultiviert. Nach 2 – 3 Wochen wurden die selektierten Keimlinge ins Gewächshaus überführt und weiterkultiviert.

4.2.2 Herstellung transgener Pflanzen

4.2.2.1 *Arabidopsis thaliana*

Die Erzeugung transgener *A. thaliana* erfolgte nach der "Floral Dip"-Methode von Clough und Bent (1998). Dazu wurden blühende Pflanzen mit möglichst vielen Knospen angezogen und evtl. bereits vorhandene Schoten entfernt, um die Anzahl an nicht-transgenen Samen zu verringern. Agrobakterien wurden in 200 ml YEB-Medium üN angezogen und bei 8.000 rpm 15 min in der Kühlzentrifuge abgeerntet. Die Bakterien wurden in 5 % Saccharose-Lösung resuspendiert und auf eine OD₆₀₀ von 0,8

eingestellt. Nach Zugabe von 500 µl/l Silwet L-77 (Lehle Seeds, USA) wurden die Blütenstände von *A. thaliana* vollständig für ca. 10 s in die Bakteriensuspension getaucht. Anschließend wurden die benetzten Blütenstände in Frischhaltefolie eingeschlagen, um ein Austrocknen zu verhindern. Die Pflanzen wurden dunkel bei Raumtemperatur üN gelagert. Am nächsten Tag wurde die Folie vorsichtig entfernt und die Pflanzen zur Samenproduktion normal im Langtag weiterkultiviert.

Nach dem Abreifen wurden die Samen gesiebt, um Verunreinigungen durch Pflanzenreste zu entfernen und zur Selektion der transgenen Pflanzen auf MS-Medium mit Kanamycin steril ausgelegt. Dazu wurden die Samen in einem Reaktionsgefäß zunächst 90 s mit 70 % EtOH behandelt und anschließend für 15 min mit 1,2 %iger Natriumhypochlorit-Lösung (enthält 0,1 % Tween 20) geschüttelt. Zur Entfernung des Hypochlorits nach der Oberflächensterilisation wurden die Samen 3x mit sterilem H₂O gewaschen. Um das Sedimentieren der Samen zu beschleunigen, wurden diese zwischen den Waschsritten jeweils für 10 s bei 8.000 rpm zentrifugiert. Die sterilisierten Samen wurden mit einer Impföse auf den MS-Platten verteilt und üN bei 4 °C gelagert. Das Auskeimen der Samen erfolgte bei 21°C im Langtag. Nach erfolgter Selektion der transgenen Pflanzen wurden diese zunächst auf eine frische MS-Platte mit Antibiotikum umgesetzt und etwa 3 Wochen nach der Aussaat in Töpfe pikiert und im Kurztag weiterkultiviert.

Zur Bestimmung der Spaltungsverhältnisse in der T2-Generation der transgenen Pflanzen wurden die Samen steril auf MS-Platten mit Antibiotikum einzeln ausgelegt. Nach 2 – 3 Wochen wurde das Spaltungsverhältnis durch Auszählen der resistenten und nicht-resistenten Pflanzen ermittelt und der χ^2 -Wert nach folgender Formel berechnet:

$$\frac{(\text{Anz. res. Pfl. (real)} - \text{Anz. res. Pfl. (erw.)})^2}{\text{Anz. res. Pfl. (erw.)}} + \frac{(\text{Anz. nicht res. Pfl. (real)} - \text{Anz. nicht res. Pfl. (erw.)})^2}{\text{Anz. nicht res. Pfl. (erw.)}}$$

Betrag der Wert für $\chi^2 < 3,8$ war das ermittelte Spaltungsverhältnis von der Hypothese nicht signifikant verschieden.

4.2.2.2 *Nicotiana tabacum*

Zur Herstellung transgener Tabak-Pflanzen wurde von den zu nutzenden Agrobakterien eine Vorkultur angelegt. Dazu wurden die Bakterien in 5 ml YEB-Medium mit Kanamycin angeimpft und bei 28 °C üN schüttelnd inkubiert. Am nächsten Tag wurden 1 – 2 ml der Vorkultur in 50 ml Agro-Minimalmedium mit Kanamycin überführt und diese Hauptkultur für 24 h weiterinkubiert. Die Agrobakterien wurden

anschließend 5 min bei 4.300 x g abgeerntet und in ca. 20 ml G-Medium bis zur $OD_{600} = 0,2$ resuspendiert.

Von sterilen, *in-vitro* vermehrten Tabakpflanzen wurden Blattstücke von etwa 1 cm² Größe geschnitten und in der Bakteriensuspension inkubiert. Nach dem Abtrocknen der Blattstücke auf sterilem Filterpapier wurden die Blattexplantate auf NB-Medium aufgelegt und für 2 Tage halbdunkel bei 24 °C mit den Agrobakterien kokultiviert. Zur Kallusinduktion wurden die Explantate auf MG-Medium umgesetzt. Alle 7 – 10 Tage wurde das Blattgewebe auf frisches Medium umgesetzt. Nach erfolgter Sprossbildung wurden die ca. 1 cm großen Sprosse auf SRR-Medium umgesetzt, um die Wurzelbildung anzuregen. Etwa 2 Wochen später wurden die bewurzelten Sprosse in Töpfe pikiert und im Gewächshaus weiterkultiviert.

4.3 Molekularbiologische Methoden

4.3.1 Isolierung von Nukleinsäuren

4.3.1.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Plasmid-Minipräparation:

2 ml einer Übernachtskultur von *E. coli* wurden 5 min bei 13.000 rpm abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 150 µl P1 resuspendiert. Nach Zugabe von 150 µl P2 wurde vorsichtig gemischt und bei Raumtemperatur 5 min inkubiert. Anschließend wurden 150 µl P3 zugegeben und nach dem Mischen für 5 min auf Eis gelagert. Nach einem 10minütigen Zentrifugationsschritt bei 13.000 rpm und 4 °C wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und 600 µl Roti-Phenol sowie 100 µl Chloroform zugegeben und gevortext. Nach 2 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde 5 min bei 13.000 rpm zentrifugiert und die obere, wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Nach Fällung der DNA mit 600 µl Isopropanol wurde die Plasmid-DNA 15 min bei 14.000 rpm (4 °C) zentrifugiert, mit 500 µl 70 % EtOH gewaschen und nach dem Trocknen in 40 µl H₂O (enthält 0,4 µl RNase A (10 mg/ml)) gelöst.

Plasmid-Midipräparation:

Die Präparation größerer Mengen qualitativ hochreiner Plasmid-DNA aus *E. coli* erfolgte nach Herstellerangaben des MIDI-Kits Nucleo-Bond[®]-PC 100 (Macherey-Nagel). Die Plasmid-DNA wurde standardmäßig in einem Volumen von 100 µl von der Säule eluiert.

4.3.1.2 Gewinnung genomischer DNA aus Pflanzenmaterial

Standard-Methode

Zur DNA-Isolierung wurden 100 mg Blattmaterial geerntet, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und gemörsert. Nach Zugabe von 1 ml DNA-Extraktionspuffer wurde das Probenmaterial bis zum vollständigen Auftauen gevortext. Nach ca. 60 min Inkubation bei 65 °C wurden 300 µl 3 M KAc zugegeben und nach vorsichtigem Mischen für mindestens 10 min auf Eis gelagert. Nach dem Zentrifugieren bei 14.000 rpm (10 min, 4 °C) wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und je 400 µl Roti-Phenol und 400 µl CIA zugegeben. Nach vorsichtigem Mischen wurde für 5 min bei 12.000 rpm abzentrifugiert. Die DNA im wässrigen Überstand wurde mit 500 µl Isopropanol gefällt und bei 14.000 rpm 10 min (4°C) zentrifugiert. Nach Entfernen des Überstandes wurde die DNA mit 500 µl 70 % EtOH gewaschen und nach dem Trocknen in 50 µl 10 mM Tris (pH 8) und 0,5 µl RNase A (10 mg/ml) resuspendiert.

Extraktion aus polysaccharidhaltigem Pflanzenmaterial

Zur Gewinnung von DNA aus stark polysaccharidhaltigen Pflanzenmaterialien (z. B. ältere Blätter) wurde die Standard-Methode modifiziert (nach Crowley *et al.*, 2003):

Nach der Inkubation des Pflanzenmaterials im Extraktionspuffer bei 65 °C erfolgte ein Abkühlen der Probe für mindestens 10 min auf Eis. Nach Zugabe von Roti-Phenol und CIA wurde (wie im Standard-Protokoll) zentrifugiert und der wässrige Überstand zu je 500 µl auf neue Reaktionsgefäße aufgeteilt. Nach Zugabe von 150 µl 5 M NaCl (verhindert ein Ausfällen der Polysaccharide) und 1 Vol. Isopropanol wurde die DNA für 1 – 2 h auf Eis gefällt und anschließend 15 min bei 14.000 rpm (4 °C) zentrifugiert. Nach dem Waschen mit 70 % EtOH und dem Trocknen der DNA wurde diese in je 25 µl 10 mM Tris (enthält 0,25 µl RNase A (10 mg/ml)) resuspendiert.

DNA-Isolierung aus Zellkernen

Die Gewinnung hochreiner Zellkern-DNA erfolgt nach Pröls *et al.* (2003). Dazu wurden 5 ml gemörsertes Blattmaterial mit 20 ml Nuclei-Puffer versetzt und auf Eis aufgetaut. Nach dem zusätzlichen Homogenisieren im Ultraturrax wurde die Suspension durch 2 Lagen sterilem Miracloth filtriert. Der Durchfluss wurde für 10 min bei 4.000 rpm abzentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet in 3 ml PL1 resuspendiert. Anschließend erfolgte eine Proteinase-Behandlung durch Zugabe von 75 µl Proteinase K (20 mg/ml) für 30 min bei 56 °C. Zur Entfernung der RNA wurde die Probe mit 50 µl RNase A (10 mg/ml) versetzt und 20 min bei 45 °C inkubiert. Nach

Zufügen von 250 µl 5 M KAc (pH 5,3) wurde 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend 20 min bei 15.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 22,5 ml N2 verdünnt und auf eine mit 3 ml N2 äquilibrierte Säule ("NucleoBond", Macherey und Nagel, Düren) gegeben. Im Anschluss wurde die Säule 3-mal mit je 6 ml N3 gewaschen und die DNA mit 4-mal je 3 ml N5 (45 °C) eluiert. Nach dem Fällen der DNA mit 5,6 ml Isopropanol für 10 min wurde bei 10.000 rpm 25 min zentrifugiert. Die DNA wurde mit 1 ml 70 % EtOH gewaschen und nach dem Trocknen in 100 µl TE aufgenommen und bei 4 °C üN gelöst.

4.3.1.3 Präparation von Gesamt-RNA aus Pflanzenmaterial

Das geerntete und in flüssigem Stickstoff schockgefrorene Pflanzenmaterial wurde gemörsert und jeweils ca. 100 mg in ein Reaktionsgefäß abgefüllt. Zu dem gefrorenen Material wurden 500 µl RNA-Denaturierungspuffer, 50 µl 2 M NaAc und 500 µl saures Phenol pipettiert und bis zum Auftauen der Proben gevortext. Nach einer 15minütigen Inkubation bei RT wurden 100 µl CIA zugegeben und nach kurzem Vortexen weitere 10 min bei RT inkubiert. Nach 10minütigem Zentrifugieren bei 13.000 rpm wurde die obere Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 500 µl CIA gemischt. Die Phasen wurden 5 min bei 10.000 rpm getrennt. Die RNA in der oberen, wässrigen Phase wurde mit 500 µl Isopropanol für mindestens 2 Stunden bei -20 °C gefällt. Anschließend wurde die gefällte RNA bei 13.000 rpm 30 min (4 °C) abzentrifugiert, mit 500 µl 85 % EtOH gewaschen und nach dem Trocknen in 20 – 40 µl H₂O_{DEPC} aufgenommen. Nach einer Inkubation von 30 min auf Eis wurde die RNA für 20 min bei 65 °C gelöst. Nach photometrischer Bestimmung der RNA-Konzentration bei 260 nm wurden die RNA-Proben bei -20 °C gelagert.

Präparation von Pollenschlauch-RNA aus *N. tabacum*:

Zur Extraktion von Pollenschlauch-RNA wurden Tabak-Pollen mit den entsprechenden Medien versetzt (4.4.2) und 4 h bei 26 °C inkubiert. Die Pollenschlauch-Suspension aus 2 Reaktionsgefäßen wurde vereinigt und 1 min bei 8.000 rpm abzentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurden die Pollenschläuche in 500 µl RNA-Denaturierungslösung, 50 µl 2 M NaAc und 500 µl saurem Phenol aufgenommen, mit sterilen Glaskügelchen versetzt und zum Aufschluß 25 min stark gevortext. Nach anschließender 15minütiger Inkubation bei RT wurde die Aufreinigung nach dem Protokoll zur Präparation von Gesamt-RNA fortgeführt (s. o.).

4.3.2 Herstellung von cDNA aus isolierter RNA

Zur Amplifikation codierender DNA-Sequenzen wurde, vor der Vervielfältigung durch die PCR, komplementäre DNA (cDNA) aus isolierter Gesamt-RNA (4.3.1.3) hergestellt. Dabei wurde nach der Anleitung des Herstellers des "RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit" (Fermentas, St. Leon-Roth) vorgegangen.

4.3.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die spezifische Amplifikation von DNA-Fragmenten für die Klonierung von Gensequenzen und der Nachweis von transgenen Pflanzen erfolgten mittels PCR. Als Template dienten sowohl Plasmid-DNA, als auch genomische DNA aus Pflanzen und mittels reverser Transkriptase synthetisierte cDNA (4.3.2). Durch die Verwendung modifizierter Primer war es möglich, an die amplifizierten DNA-Sequenzen Restriktionsstellen einzufügen. Als Polymerasen dienten sowohl *Taq*-Polymerase aus *Thermus aquaticus*, sowie eine Mischung aus *Taq*-Polymerase und *Pfu*-Polymerase (aus *Pyrococcus furiosus*). Diese verfügt über eine 3' – 5' Exonucleaseaktivität und kann falsch eingebaute Nucleotide aus der Sequenz entfernen. Durch die Beigabe von *Taq* wird eine, im Vergleich zu *Pfu*, erhöhte Prozessivität gewährleistet.

<u>Reaktionsansatz <i>Taq</i>-Polymerase:</u>		<u>Reaktionsansatz <i>Taq-Pfu</i>-Polymerase:</u>	
10x Puffer	2,5 µl	10x Puffer	2,5 µl
dNTP-Mix (je 10 mM)	1 µl	dNTP-Mix (je 10 mM)	1 µl
Primer 1 (10 pmol)	1 µl	Primer 1 (10 pmol)	1 µl
Primer 2 (10 pmol)	1 µl	Primer 2 (10 pmol)	1 µl
Template	1 – 100 ng	Template	1 – 100 ng
Taq (0,5 U/µl)	1 µl	Enzym-Mix (5U/µl)	1 µl
H ₂ O	ad 25µl	H ₂ O	ad 25 µl

Bei Verwendung von genomischer DNA wurde die MgCl₂-Konzentration von 1,5 mM (gewährleistet durch die spezifischen Puffer) auf 2 mM erhöht.

PCR-Programm:

Anfangsdenaturierung	3 min	94 °C	
Denaturierung	45 s	94 °C	} 35x
Annealing	45 s	48 – 58 °C	
Elongation	30 s – 1,5 min	72 °C	
Finale Extension	5 min	72 °C	

Bei Verwendung des *Taq-Pfu*-Gemisches wurde die Polymerisationszeit um 50 % verlängert.

Verwendete Primer:

Primername	Sequenz (5' → 3')	Restriktions-schnittstelle
11-Anf-Rev	GAG AGA ATT GTT GTA GAA CCT G	
21-Anf-Rev	GTA AAA TGG TTG CGG ATC	
Atcwinh-1	CTG <u>AGG TAC</u> CTC GAG CCT GAA ATG GCT TCT TCT C	<u>Acc65I</u> , XhoI
Atcwinh-2neu	CTG <u>ATC TAG</u> AGG GCC CTC ATT CAA CAA GGC GAT C	<u>XbaI</u> , ApaI
Ath2CW-Ex3-F	CTG AGC TCG GAG TTT ACC ATC TCT TCT ACC	SacI
Ath2CW-Ex3-R	TAG TCG ACC TTG GCG TCA GAG CAC ATG	SacI
Ath2CW-Prom-F	CGA AGC TTG TAA ATA TGG GGA AGA TAC	HindIII
Ath2CW-Prom-R	ATG TCG ACT GGT GCA AGA GAA CTC TAT G	SacI
Ath2-P2-F	CTT ATT TTA GCG TGA GAT TAG G	
Gus-R	AAA GAC TTC GCG CTG ATA CCA	

NPK18	GTT GCA CTT CGT TTG TCC GAA AGC	
NPS13	GAG TTT CTG TCA AAT TAA GTC C	
nptII-F	CCC ATG GTT GAA CAA GAT GG	
nptII-R	AGA AGA ACT CGT CAA GAA GG	
Ntcwinh-F	CTC <u>CTC GAG</u> GTC GAC ATG AAG AAT TTG ATT TTC	<i>Xho</i> I, <i>Sa</i> I
Ntcwinh-F2	GCC TCT AGA ATG AAG AAT TTG ATT TTC	<i>Xba</i> I
Ntcwinh-R	GTT <u>GGA TCC</u> GAG CTC TCA CAA TAA ATT TCT GAC	<i>Bam</i> HI, <i>Sac</i> I
OIN3	CCT TCA CYT NTT YTA YCA RTA YAA YCC	
OIN4	CCT TTC RWA RAA RGT YTT DGW WGC GTA	
PRIMER_KON1-F	TAY CAY YTN TTY TAY CA	
PRIMER_KON3-F	GAY CCV WCV ACN GCN TGG	
PRIMER_KON4-R	TCR WAR AAN GWY TTN GAN GC	
PRIMER_KON5-R	ANY TCB HBV AYN GGC CA	
RTN1	GGA GTC TAT CAT CTA TTC TAC	
SK2-Pr-F	GTC AAC TAT CAA CAA ATG AAA G	
SK2-Pr-F2	CAA ACA CAC CTA ACA AGT CAT AC	
SK2-Pr-R	CCA TCT AGA TTT GTT AAG TTT C	<i>Xba</i> I
SP6	ATT TAG GTG ACA CTA TAG AAT AC	
Stig1-Pr-F	CTT GTC GAC GCT GTA TAT GTT TGC AGA TG	<i>Sa</i> I
Stig1-Pr-R	AGG TCT AGA AAT TTG ATA CTG GTG GTT TC	<i>Xba</i> I
T7	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG	

Die Primer wurden bezogen von Biomers (Ulm), Metabion (Martinsried) und Roth (Karlsruhe).

4.3.4 Restriktion von DNA

Zur Umklonierung von DNA-Sequenzen, zur Sondenherstellung für die Northern-Blot-Analyse und zum Nachweis übertragener DNA in transgenen Pflanzen durch Southern-Blot-Analyse wurde DNA durch TypII-Restriktions-endonukleasen an spezifischen, meist palindromischen Erkennungssequenzen hydrolysiert.

Reaktionsansatz:

10x Reaktionspuffer	2,5 – 3 µl
DNA	0,5 – 15 µg
Enzym (10 U/µl)	0,5 – 2 µl
H ₂ O	ad 25 – 30 µl

Die Inkubationszeit der einzelnen Reaktionsansätze betrug 2 – 3 h, oder üN, im jeweiligen Temperaturoptimum der eingesetzten Enzyme.

4.3.5 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

Um die Religation linearisierter Vektor-DNA ohne Einbau von DNA-Fragmenten bei Ligations-Reaktionen zu verhindern, wurden 5'-endständige Phosphatreste enzymatisch durch Einsatz der *Calf-Intestine-Alkaline-Phosphatase* (CIAP) entfernt. Restriktionsansätze wurden direkt nach der Behandlung mit den entsprechenden Restriktionsansätzen mit CIAP inkubiert. Dazu wurde die DNA zur Dephosphorylierung 15 min bei 37 °C inkubiert und nach 15 min bei 65 °C und erneuter Zugabe von 1 µl CIAP erneut 15 min bei 37 °C belassen. Anschließend wurden die DNA-Fragmente über Agarosegelelektrophorese aufgetrennt (4.3.6.1) und die benötigten Fragmente aus dem Gel eluiert (4.3.7).

Reaktionsansatz:

10x Reaktionspuffer	3 – 5 µl
DNA	0,5 – 15 µg
CIAP	1 µl
H ₂ O	ad 30 – 50 µl

4.3.6 Auftrennung von Nukleinsäuren im Agarosegel

4.3.6.1 DNA-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten nach PCR-Reaktionen oder der Hydrolyse von DNA durch Restriktionsendonukleasen erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese. Je nach Fragmentgröße der DNA wurden Gele mit 0,8 – 2 % (w/v) Agarose in 1x TBE verwendet. Zur Herstellung wurde Agarose mit 1x TBE-Puffer versetzt und durch Erhitzen in der Mikrowelle gelöst. Nach Abkühlen auf ca. 60 °C wurden 7,5 µl Ethidiumbromid (5 mg/ml) zugegeben und das Gel in einen Gelträger gegossen. Nach Erkalten des Gels wurde dies in die Laufkammer mit 1x TBE gelegt und mit den DNA-Proben beladen. Diese wurden vorher mit 1/10 Volumen 10x DNA-Ladepuffer versetzt, um die Proben-dichte zu erhöhen und die Lauffront zu markieren. Bei 100 – 120 V wurden die DNA-Fragmente für 45 – 90 min im elektrischen Feld aufgetrennt und anschließend unter UV-Licht betrachtet.

4.3.6.2 RNA-Gelelektrophorese

Zur elektrophoretischen Auftrennung der Gesamt-RNA wurden denaturierende Agarosegele verwendet. Für ein 1,2 %iges Gel wurden 1,2 g Agarose in 62,5 ml H₂O durch Erhitzen gelöst. Nach dem Abkühlen auf ca. 60 °C wurden 20 ml 5x RNA-Running Buffer und 17,5 ml 37 % Formaldehyd zugegeben. Nach dem Mischen wurde die Agaroselösung in einen Gelträger gegossen. Jeweils 15 µg RNA wurden mit 15 µl RNA-Ladepuffer versetzt, 10 min auf 65 °C erhitzt und nach dem Abkühlen auf Eis auf das Gel geladen. Die Elektrophorese erfolgte in 1x RNA-Running Buffer bei 80 V für 2 Stunden.

4.3.7 Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Zur Klonierung von DNA-Sequenzen bzw. zur Herstellung von DNA-Sonden für Northern- und Southern-Analysen wurden DNA-Fragmente der entsprechenden Größe mit einem Skalpell unter UV-Licht aus den Agarosegelen ausgeschnitten. Die Elution der DNA erfolgte nach Herstellerangaben mit dem Kit NucleoSpin Extract II (Macherey und Nagel) in einem Endvolumen von 15 – 30 µl.

4.3.8 Ligation von DNA-Fragmenten

Unter Verwendung der T4-Ligase wurden freie 3'-OH-Enden mit 5'-Phosphatenden restringierter DNA-Fragmente kovalent verbunden.

Reaktionsansatz:

10x T4-Puffer	1 µl
Vektor-DNA	50 ng
DNA-Fragment	3x molare Masse der Vektor-DNA
T4-Ligase	1µl
H ₂ O	ad 10 µl

Die Ligationsreaktion wurde entweder 2 h bei 22 °C oder ün bei 14 °C durchgeführt. Der komplette Ligationsansatz wurde für die Transformation in *E. coli* (4.3.10.1) verwendet.

4.3.9 Herstellung kompetenter Bakterien

Um erfolgreich Klonierungs- und Expressionsplasmide in Bakterien einzuschleusen, mussten diese vorher chemisch kompetent gemacht werden.

4.3.9.1 *Escherichia coli*

Für alle Klonierungsarbeiten wurden im Rahmen dieser Arbeit *E. coli* vom Typ DH5a verwendet. Zunächst wurde eine Bakterienkolonie in 25 ml LB-Medium angeimpft und in einem 250 ml Kolben 7 h bei 37 °C geschüttelt. Aus dieser Starterkultur wurden 4 ml Bakteriensuspension entnommen und damit 250 ml SOB-Medium inokuliert. Die Kultur wurde ün bei 18 °C geschüttelt. Am nächsten Tag wurde die Kultur nach Erreichen einer OD₆₀₀ = 0,55 für 10 min auf Eis gestellt und anschließend bei 2500 x g 10 min bei 4 °C abgeerntet. Nach Abnehmen des Überstandes wurden die Bakterien in 80 ml eiskaltem TB vorsichtig resuspendiert. Nach erneutem Zentrifugieren, unter den gleichen Bedingungen, wurde der Überstand verworfen und die Zellen in 20 ml eiskaltem TB erneut resuspendiert. Nach Zugabe von 1,5 ml DMSO wurden die Bakterien 10 min auf Eis belassen und schließlich in vorgekühlte Reaktionsgefäße zu je 100 µl aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

4.3.9.2 *Agrobacterium tumefaciens*

Zur Herstellung chemisch kompetenter Agrobakterien wurde eine einzelne Bakterienkolonie in 3 ml YEB-Medium angeimpft und üN bei 28 °C geschüttelt. Am nächsten Tag wurden 100 ml YEB-Medium mit 1 ml der Übernachtskultur angeimpft und unter den gleichen Bedingungen inkubiert. Nach 4 h wurden die Bakterien bei 4 °C 20 min bei 5.000 rpm geerntet. Das Pellet wurde in 5 ml eiskaltem TE-Puffer resuspendiert und erneut 10 min bei 5.000 rpm zentrifugiert. Die Bakterien wurden nun in 10 ml kaltem YEB vorsichtig resuspendiert und mit 1,4 ml 87 % Glycerin versetzt. Aliquots von je 200 µl Suspension wurden in vorgekühlte Reaktionsgefäße abgefüllt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

4.3.10 Transformation von Bakterien

4.3.10.1 *Escherichia coli*

Ein 100 µl Aliquot kompetenter Bakterien wurde auf Eis aufgetaut und mit 10 µl Ligationsansatz (4.3.8) versetzt. Nach vorsichtigem Mischen wurde 30 min auf Eis inkubiert. Die Aufnahme der DNA in die Bakterienzellen erfolgte durch Hitzeschockbehandlung bei 42 °C für 90 s. Nach 2 min Abkühlen auf Eis wurden die Bakterien mit 900 µl SOC versetzt und schüttelnd 60 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien auf LB-Platten mit den erforderlichen Antibiotika zur Selektion ausplattiert und 12 – 16 Stunden bei 37 °C inkubiert. Der Nachweis, dass die gewünschte DNA-Sequenz im Plasmid der Bakterien enthalten war, wurde über PCR-vermitteltes Colony-Screening (4.3.11.1) oder über Mini-Präparation der Plasmid-DNA (4.3.1.1) und anschließender Restriktion mit geeigneten Enzymen (4.3.4) geführt.

4.3.10.2 *Agrobacterium tumefaciens*

Kompetente Agrobakterien wurden auf Eis aufgetaut, mit 1,5 µg Plasmid-DNA einer Midi-Präparation (4.3.1.1) vermischt und 5 min auf Eis belassen. Anschließend wurden die Bakterien für 5 min in flüssigem Stickstoff eingefroren und danach 5 min bei 37 °C Hitzeschock-behandelt. Nach 2 min Abkühlen auf Eis wurden 800 µl LB-Medium zugegeben und die Bakterien für 3 Stunden bei 28 °C leicht schüttelnd inkubiert. Schließlich wurden die Agrobakterien auf LB-Platten mit den erforderlichen Antibiotika ausplattiert und für 2 – 3 Tage bei 28 °C selektiert. Zum Nachweis der erfolgreichen Transformation wurden ein PCR-basiertes Colony-Screening, sowie ein spezifischer Farbnachweis auf Agrobakterien durchgeführt (4.3.11.2).

4.3.11 Identifizierung transformierter Bakterien

4.3.11.1 Colony-Screening von *E. coli*

Zur Untersuchung der auf den Selektionsplatten gewachsenen Bakterien-kolonien wurde eine PCR durchgeführt. Dazu wurde eine einzelne Kolonie mit einem sterilen Zahnstocher aufgenommen und in ein Reaktionsgefäß mit vorgelegtem PCR-Reaktionsgemisch getaucht. Anschließend wurden die verbliebenen Bakterien auf dem Zahnstocher auf einer neuen LB-Platte als Backup ausgestrichen und bei 37 °C inkubiert. Die verwendeten Primerpaare waren von der nachzuweisenden DNA-Sequenz abhängig. Der Ablauf des PCR-Programms erfolgte nach 4.3.3.

Reaktionsansatz:

10x Puffer	2,5 µl
dNTP-Mix (je 10 mM)	1 µl
Primer 1 (10 pmol)	1 µl
Primer 2 (10 pmol)	1 µl
Taq (0,5 U/µl)	1 µl
H ₂ O	ad 25µl

4.3.11.2 Colony-Screening von *Agrobacterium tumefaciens*

Aufgrund der spezifischen Eigenschaften der Agrobakterien konnten diese nicht direkt für eine PCR-Reaktion verwendet werden. Stattdessen wurden Einzelkolonien in 3 ml YEB-Medium üN bei 28 °C angezogen. 500 µl Bakteriensuspension wurden in Reaktionsgefäßen bei 7.500 rpm 5 min (4°C) abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Bakterien-Pellet mit 500 µl H₂O gewaschen. Nach erneutem Zentrifugieren unter den gleichen Bedingungen wurde das Pellet in 500 µl H₂O resuspendiert und die Bakterien 10 min bei 95 °C aufgeschlossen. Nach 5 min Abkühlung auf Eis wurde das Bakterienlysat bei 10.000 rpm (4 °C) für 15 min zentrifugiert und der klare Überstand anschließend in ein neues Gefäß überführt. Das klare Bakterienlysat wurde direkt für die PCR nach folgendem Schema eingesetzt:

Reaktionsansatz:

10x Puffer	2,5 µl
dNTP-Mix (je 10 mM)	1 µl
Primer 1 (10 pmol)	1 µl
Primer 2 (10 pmol)	1 µl
Bakterienlysat	7,5 – 15 µl
Taq (0,5 U/µl)	1 µl
H ₂ O	ad 25 µl

Das PCR-Programm entsprach dabei den Bedingungen des Colony-Screenings von *E. coli* (4.3.11.1).

Zusätzlich zur PCR-vermittelten Identifizierung transgener Agrobakterien wurde noch ein spezifischer Farbnachweis auf Agrobakterien durchgeführt. Dieser Nachweis stellte sicher, dass die vorhandenen Bakterienkolonien tatsächlich von Agrobakterien gebildet wurden. Hierzu wurden die durch PCR getesteten Kolonien auf Agrobakterien-Testplatten ausgestrichen und für 2 – 3 Tage bei 28 °C inkubiert, bis starkes Bakterienwachstum sichtbar war. Anschließend wurden die Platten mit Benedicts-Reagenz überschichtet und für ca. 1 h bei RT stehen gelassen. Durch Bildung einer orange-roten Färbung im Bereich der Bakterien konnte nachgewiesen werden, dass es sich um Agrobakterien handelt. Diese Farbreaktion ist spezifisch für Agrobakterien. Nur sie können aus der Lactose in den Testplatten Ketolactose herstellen, die mit den Kupferionen aus dem Benedicts-Reagenz reagiert. Dabei entsteht CuO mit charakteristischer orange-roter Färbung. Andere Bakterien, wie z. B. *E. coli* oder auch Hefen können keine Ketolactose bilden. Im Bereich dieser Organismen tritt daher kein Farbumschlag auf.

4.3.12 Southern-Blotting

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Kopienzahl der übertragenen DNA-Sequenz in den transgenen Pflanzen mit Hilfe der Southern-Analysen überprüft.

Für einen Southern-Blot wurden jeweils 15 µg genomischer DNA einer Pflanze mit durchschnittlich 3 verschiedenen Restriktionsenzymen in getrennten Reaktions-

ansätzen hydrolysiert. Die Restriktionsansätze wurden bei der für das jeweilige Enzym optimalen Temperatur für ca. 16 h inkubiert.

Reaktionsansatz:

10x Reaktionspuffer	3 µl
DNA	15 µg
Enzym (10 U/µl)	2 µl
H ₂ O	ad 30 µl

Das entstandene Fragmentgemisch wurde auf einem 0,8 %igen Agarosegel (4.3.6.1) bei 25 V über 14 h aufgetrennt. Das Gel wurde nach einer 10minütigen Inkubation in 0,25 N HCl mit H₂O gespült und für 2x 20 min in 1 M NaCl/0,5 M NaOH geschwenkt. Im Anschluss folgten 2x 20 min in 0,5 M Tris/1,5 M NaCl (pH 7,5) und 10 min in 20x SSC. Danach wurde die DNA aus dem Gel mit Hilfe eines Kapillarblots auf eine Nylonmembran übertragen. Dazu wurde ein Schwamm in eine Kunststoffschale mit 20x SSC gelegt und mit 2 Blättern Whatman-Papier belegt. Das Gel wurde mit der Oberseite nach unten auf das Papier gelegt und mit einer Nylonmembran belegt. Darauf folgten 2 weitere Blätter Whatman-Papier. Den Abschluss bildete eine ca. 10 cm hohe Schicht aus Zellstoff, die mit einem Gewicht von ca. 1 kg beschwert wurde, um den Kapillarschluss sicherzustellen. Nach einer Transferzeit von 20 h wurde die vollständige Übertragung der DNA auf die Membran unter UV-Licht kontrolliert und die DNA bei 80 °C über 2 h an die Membran fixiert.

4.3.13 Northern-Blotting

Der Transfer der RNA erfolgte mittels Kapillarblot und war im Aufbau mit dem Southern-Blot identisch. Auch hier betrug die Transferzeit ca. 20 h. Die Vollständigkeit des RNA-Übertrags auf die Membran wurde unter UV-Licht kontrolliert. Anschließend wurde die RNA auf der Membran für 2 Stunden bei 80 °C fixiert.

4.3.14 Markierung von DNA-Fragmenten mit ^{32}P

10 μl Hexanucleotide-Buffer (Fermentas, St. Leon-Roth) wurden mit 200 ng Sonden-DNA vermischt und 10 min bei 95 °C denaturiert. Nach 5 min auf Eis wurde kurz zentrifugiert und es wurden 3 μl Mix A, 1 μl Klenow und 5 μl [^{32}P]-dATP hinzugefügt. Nach 10 min bei 37 °C wurden 4 μl dNTP-Mix zugefügt und für weitere 10 min bei 37 °C inkubiert. Um nicht eingebaute Radioaktivität aus der Lösung zu entfernen, wurde der Reaktionsansatz über Microspin-Säulen aufgereinigt (720 x g, 2 min, RT). Der Durchfluss mit der markierten DNA wurde bei 95 °C für 5 min denaturiert und anschließend 5 min auf Eis abgekühlt.

Bereits für eine Hybridisierung verwendete Sonden-DNA wurde bei 4 °C aufbewahrt. Zur erneuten Verwendung wurde die DNA in der Hybridisierungslösung bei 95 °C für 15 min denaturiert und anschließend 15 min auf Eis abgekühlt. Prähybridisierte Membranen wurden mit dieser Lösung versetzt und wie gewohnt $\ddot{u}\text{N}$ bei 42 °C inkubiert.

4.3.15 Hybridisierung mit ^{32}P -markierten Sonden

Die Blots wurden in Hybridisierungslösung bei 42 °C für 1 h im Wasserbadschüttler prähybridisiert. Anschließend wurde die denaturierte, radioaktiv markierte Sonde zur Lösung hinzugefügt. Das Hybridisieren erfolgte $\ddot{u}\text{N}$ bei 42 °C. Im Anschluss wurden die Membranen gewaschen, um die Hintergrundstrahlung durch unspezifisch gebundene Sonden-DNA zu minimieren. Dazu wurden die Blots zunächst 10 min in Waschlösung 1 (2x SSC, 0,1 % SDS) und anschließend 2 – 4 x für 5 min in Waschlösung 2 (0,2x SSC, 0,1 % SDS) bei 42 °C im Wasserbadschüttler inkubiert. Die gewaschenen Membranen wurden in Folie eingepackt und für 4 h bis 3 Tage auf einem Screen exponiert. Der Screen wurde nach der Expositionszeit im Phosphorimager ausgelesen.

4.3.16 *In vitro*-Transkription und Markierung von RNA-Fragmenten mit Digoxigenin

Für die Whole-Mount *in situ*-Hybridisierungen wurden Digoxigenin (DIG)-markierte RNA-Sonden verwendet. Zur *in vitro* Transkription von DNA wurden DNA-Fragmente von 150 – 180 bp in den Vektor pGemT-easy kloniert. Die Plasmide wurden mit den Restriktionsenzymen *Apal* (zur Transkription mit der SP6-RNA-Polymerase) bzw. *PstI* (zur Transkription mit der T7-RNA-Polymerase) linearisiert. Anschließend wurde die Plasmid-DNA für die Transkription eingesetzt.

Reaktionsansatz:

10x Transkriptions-Puffer	5 µl
dNTP-Mix-DIG	5 µl
DNA	2 µg
RNAse Inhibitor	1 µl
T7-/SP6-RNA-Polymerase	80 U
H ₂ O	ad 50 µl

Die Reaktion wurde nach 2 h bei 37 °C mit 5 µl 0,2 M EDTA abgestoppt. Nach Zugabe von 5,5 µl 3 M NaAc und 181,5 µl 100 % EtOH wurde die RNA für 1 h bei -70 °C gefällt. Im Anschluss wurde 20 min bei 14.000 rpm (4 °C) zentrifugiert und die RNA mit 100 µl 70 % EtOH gewaschen. Nach dem Trocknen wurde das Pellet in 100 µl H₂O_{DEPC} resuspendiert und die RNA, bis zu ihrer Verwendung, bei -20 °C gelagert.

Vor dem Hybridisieren der Präparate mit der Sonden-RNA wurden 500 ng/ml Sonden-RNA mit 100 µg/ml DNA aus Heringssperma und 10 µg/ml Hefe rRNA versetzt und 5 min bei 85 °C denaturiert. Nach 10 min abkühlen auf Eis wurde mit HB auf das entsprechende Volumen aufgefüllt.

4.4 Histologische Methoden

4.4.1 Whole-Mount *in situ*-Hybridisierung

Das Pflanzenmaterial wurde geerntet und sofort in Fixierlösung überführt. In einem Exsikkator wurde das Pflanzenmaterial durch Anlegen eines Vakuums vollständig mit Fixierlösung infiltriert. Nach einer Inkubationszeit von 2 h bei 4 °C wurde die Fixierlösung entfernt und die Proben mit PBS für je 15 min, 30 min und schließlich üN bei 4 °C gewaschen. Im Anschluss wurden von dem Probenmaterial mit einem Vibratom ca. 70 – 80 µm dicke Schnitte angefertigt. Diese wurden in eine 24er Mikrotiterplatte mit PBS überführt und im Anschluss 2x je 15 min mit PBT gewaschen. Es folgten 2 Inkubationsschritte von je 5 min in MeOH und 2x 5 min in 100 % EtOH (Lagerung bis zu 2 Tage bei -20 °C möglich).

Am nächsten Tag folgte eine Inkubation der Schnitte für 30 min in einer Mischung aus je einem Teil Xylen und EtOH. Im Anschluss wurden die Gewebeschnitte in eine neue

Mikrotiterplatte mit 100 % EtOH überführt und 2x je 5 min gewaschen. Nach 2 Waschschritten von je 5 min in MeOH folgte eine Inkubation von 5 min in MeOH/PBT. Das Gewebe wurde daraufhin mit 5 % Paraformaldehyd (in PBT) für 30 min ein weiteres Mal fixiert und mit PBT 2x 5 min gewaschen. Es folgte eine Proteinase-Behandlung mit Proteinase K (40µg/ml in PBT) für 10 min bei RT. Die Proteinase wurde mit 0,2 % Glycin für 5 min in PBT inhibiert und die Schnitte wurden daraufhin 2x mit PBT für je 5 min gewaschen. Anschließend folgte ein weiterer Fixierungsschritt mit 5 % Paraformaldehyd in PBT für 30 min. Nach 3x je 5 min in PBT wurden die Präparate nacheinander je 5 min in PBT/HB und HB inkubiert und schließlich 1 h bei 42 °C in HB prähybridisiert. Die Präparate wurden in Reaktionsgefäße mit Sonden-RNA in HB überführt und üN bei 42 °C im Hybridisierungssofen inkubiert.

Die Gewebeschnitte wurden am nächsten Tag wieder in Mikrotiterplatten überführt und 2x je 15 min mit HB bei 42 °C gewaschen. Nach einer 15minütigen Inkubation in HB/NTE wurde 2x je 5 min in NTE gewaschen und schließlich wurden die Präparate für 30 min mit RNase A (40 µg/ml in NTE) versetzt und bei 37 °C inkubiert, um unspezifisch gebundene, einzelsträngige Sonden-RNA abzubauen. Nach 2 Waschschritten von je 5 min in NTE bei 37 °C folgten 2 weitere Inkubationen in NTE bei RT. Anschließend wurde je 5 min in NTE/PBT und 5 min in PBT gewaschen und im Folgenden für 30 min in BS inkubiert. Zur Vermeidung von Hintergrund wurden die Präparate für 1 h in BS mit 5 % *normal sheep serum* behandelt. Es folgten 5 min in PBT und 30 min in PBT mit 0,5 % Blockierungslösung und 1 % BSA. Im Anschluss erfolgte eine Inkubation mit alkalischer Phosphatase-konjugierten Anti-DIG Antikörpern in einer Verdünnung von 1/500 in PBT mit 0,5 % Blockierungslösung und 1 % BSA. In 4 Waschschritten á 5 min mit PBT wurden nicht gebundene Antikörper entfernt. Nach 2x je 5 min in Puffer 3 erfolgte die Farbreaktion mit 15 µl/ml BCIP (15 mg/ml) und 15 µl/ml NBT (30 mg/ml) in Puffer 3 bei RT im Dunkeln. Nach ausreichender Farbentwicklung (ca. 15 – 30 min) wurde die Reaktion mit PBS + 1 mM EDTA gestoppt. Die Präparate wurden anschließend unter dem Binokular betrachtet.

4.4.2 Pollenkeimung

Arabidopsis thaliana

Die Pollenkeimungsexperimente mit *A. thaliana* wurden in Anlehnung an Hülskamp *et al.* (1995) durchgeführt. 2x Pollenkeimungsmedium wurde mit Low Melt Agarose versetzt und bis zur Auflösung des Agars in der Mikrowelle erhitzt. Nach Abkühlen des

Mediums auf ca. 40 °C wurden Aliquots zu je 500 µl in Reaktionsgefäße abgefüllt und bei -20 °C gelagert. Mono-, Di- oder Oligosaccharide wurden in den benötigten Mengen aus Stocklösungen zugegeben und das Medium wurde mit sterilem Wasser auf 1 ml aufgefüllt. Als Standard-Kontrolle wurde 440 mM Saccharose verwendet.

Vor Gebrauch des Pollenkeimungsmediums wurde dieses durch Erhitzen auf 65 °C verflüssigt. Tropfen von 50µl Volumen wurden auf einen Objektträger pipettiert und dieser sofort in eine mit Zellstoff ausgelegte und befeuchtete Petrischale gelegt. Auf den festen Agar wurden vorsichtig vollständig geöffnete *Arabidopsis*-Blüten aufgetupft und die Pollen ün bei 26 °C inkubiert. Von *Arabidopsis*-Pflanzen im Col-0-Hintergrund wurden je Agartropfen 3 Blüten und von Pflanzen mit Ler-Hintergrund je 2 Blüten aufgetupft. Unter dem Lichtmikroskop wurden Pollen und Pollenschläuche ausgezählt. Dabei wurden je Variante mindestens 600 Pollen ausgewertet.

Nicotiana tabacum

Pollen von Wildtyp-Pflanzen und transgenen Tabak-Pflanzen wurden je Blüte in einem Reaktionsgefäß gesammelt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert. 2x Pollenkeimungsmedium wurde mit verschiedenen Kohlenhydraten versetzt und mit sterilem Wasser auf 1 ml aufgefüllt. 500 µl Pollenkeimungsmedium wurden in ein Reaktionsgefäß mit Pollen pipettiert und dieser durch Vortexen suspendiert. Zur Auskeimung der Pollen wurden diese bei 26 °C für 2,5 Stunden inkubiert. Je 30 µl Suspension wurden auf einen Objektträger gegeben und unter dem Mikroskop ausgewertet.

4.4.3 Detektion der β -Glucuronidaseaktivität mittels X-Gluc

4.4.3.1 Histologischer Nachweis

Zur Analyse der Aktivität und Spezifität der in dieser Arbeit verwendeten Promotoren diente ein optischer Nachweis der β Glucuronidase in den generierten transgenen Reporterpflanzen. Über die Expression dieses Enzyms konnten Rückschlüsse auf die Promotoraktivität im jeweiligen Gewebe gezogen werden. Dabei wurde X-Gluc von der β -Glucuronidase gespalten und das entstandene Reaktionsprodukt zu unlöslichem Indigo oxidiert. Die Verteilung der Färbung und deren Intensität im Gewebe ließen Rückschlüsse auf die Aktivität des zu untersuchenden Promotors zu. Dabei wurde das zu untersuchende Gewebe mit GUS-Färbelösung versetzt und bei Bedarf durch Anlegen eines Vakuums infiltriert. Anschließend erfolgte die Reaktion im Dunkeln ün

bei 37 °C. Zur Entfernung des im Gewebe enthaltenen Chlorophylls und zur Konservierung wurde die Färbelösung entfernt und durch 70 % EtOH ersetzt. Dieser wurde mehrfach gewechselt. Bis zur Auswertung der Proben wurden diese in 70 % EtOH bei 4 °C gelagert.

4.4.3.2 Fluorometrischer Nachweis

Der quantitative Nachweis der GUS-Aktivität erfolgte nach Jefferson *et al.* (1987). Tabak-Pollen bzw. *Arabidopsis*-Blüten wurden gemörsert, in 250 µl GUS-Extraktionspuffer aufgenommen und je 3 x für 5 sec durch Ultraschallbehandlung zusätzlich aufgeschlossen. Nach einer Zentrifugation (8000 x g, 4 °C, 8 min) wurden vom Überstand 50 µl-Aliquots mit je 50 µl GUS-Assaypuffer vermischt und im Dunkeln bei 37 °C inkubiert. Nach 60 min wurde die Reaktion durch Zufügen von 50 µl 200 mM NaCO₃ gestoppt. Das Reaktionsprodukt 4-Methylumbelliferon (4-MU) wurde durch Nutzung des Fluoroskan Ascent (Labsystems, Milford, USA) fluorometrisch bestimmt. Die Proteinkonzentration des Probenüberstandes wurde nach Bradford (1976) ermittelt. Die GUS-Aktivität wurde berechnet als pmol 4-MU/min/mg Protein aus Daten von jeweils 3 unabhängigen Pollen- bzw. Blütenproben pro Pflanze. Jede Probe wurde dabei in einer 3-fach-Bestimmung analysiert.

4.4.4 Anilinblaufärbung von Pollenschläuchen *in vivo*

Tabakgriffel wurden zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Bestäubung geerntet und mit einer Rasierklinge in möglichst dünne Scheiben geschnitten. Die Griffelschnitte wurden in Fixierlösung, bestehend aus 2 Teilen 100 % EtOH und 1 Teil 90 % Milchsäure inkubiert und bis zur Weiterverarbeitung bei 4 °C gelagert. Im Anschluss wurden die Schnitte mit H₂O gewaschen und für 5 – 10 min in 1 M NaOH inkubiert. Nach erneutem Waschen mit H₂O wurden die Schnitte für 10 min in 0,1 % Anilinblaulösung (in 50 mM K₃PO₄) gefärbt und unter dem Mikroskop bei UV-Licht ausgewertet.

4.4.5 Elektronenmikroskopische Aufnahmen

Die raster- und transmissionselektronenmikroskopischen Aufnahmen von *Arabidopsis* Pollen wurden nach Spiliotis *et al.* (2008) in der zentralen Abteilung für Elektronenmikroskopie der Universität Würzburg durchgeführt.

5 Literaturverzeichnis

- Abbott J. C., Barakate A., Pinçon G., Legrand M., Lapierre C., Mila I., Schuch W. and Halpin C.** (2002). Simultaneous Suppression of Multiple Genes by Single Transgenes. Down-Regulation of Three Unrelated Lignin Biosynthetic Genes in Tobacco. *Plant Physiol.* 128: 844 – 853.
- Andersen M. N., Asch F., Wu Y., Jensen C. R., N? sted H., Mogensen V. O. and Koch K. E.** (2002). Soluble Invertase Expression Is an Early Target of Drought Stress during the Critical, Abortion-Sensitive Phase of Young Ovary Development in Maize. *Plant Phys.* 130: 591 – 604.
- Asega A. F. and de Carvalho M. A. M.** (2004). Fructan metabolizing enzymes in rhizophores of *Vernonica herbacea* upon excision of aerial organs. *Plant Phys. Biochem.* 42: 313 – 319.
- Atkinson A. H., Heath R. L., Simpson R. J., Clarke A. E. and Anderson M. A.** (1993). Proteinase Inhibitors in *Nicotiana glauca* Stigmas Are Derived from a Precursor Protein Which Is Processed into Five Homologous Inhibitors. *Plant Cell* 5: 203 – 213.
- Avonce N., Leyman B., Thevelein J. and Iturriaga G.** (2005). Trehalose metabolism and glucose sensing in plants. *Biochem. Soc. Trans.* 33: 276 – 279.
- Balasubramanian R., Karve A., Kandasamy M., Meagher R. B. and Moore B. D.** (2007). A Role for F-Actin in Hexokinase Mediated Glucose Signaling. *Plant Physiol.* 145: 1423 – 1434.
- Balibrea M. E., Cuartero J., Bolarin M. C. and Pérez-Alfocea F.** (2003). Sucrolytic activities during fruit development of *Lycopersicon* genotypes differing in tolerance to salinity. *Physiol. Plant.* 118: 38 – 46.
- Balibrea Lara M. E., Gonzalez Garcia M.C., Fatima T., Ehneß R., Lee T. K., Proels R., Tanner W. and Roitsch T.** (2004). Extracellular Invertase Is an Essential Component of Cytokinin-Mediated Delay of Senescence. *Plant Cell* 16: 1276 – 1287.
- Barker L., Kühn C., Weise A., Schulz A., Gebhardt C., Hirner B., Hellmann H., Schulze W., Ward J. M. and Frommer W. B.** (2000). SUT2, a Putative Sucrose Sensor in Sieve Elements. *Plant Cell* 12: 1153 – 1164.

- Barnabas B. and Fridvalszky L.** (1984). Adhesion and germination of differently treated maize pollen grains on the stigma. *Acta Bot. Hung.* 30: 329 – 332.
- Bate N. J., Niu X., Wang Y., Reimann K. S. and Helentjaris T. G.** (2004). An Invertase Inhibitor from Maize Localizes to the Embryo Surrounding Region during Early Kernel Development. *Plant Physiol.* 134: 246 – 254.
- Bäumlein H., Boerjan W., Nagy I., Bassüner R., van Montagu M., Inzé D. and Wobus U.** (1991). A novel seed protein gene from *Vicia faba* is developmentally regulated in transgenic tobacco and *Arabidopsis* plants. *Mol. Gen. Genet.* 225: 459 – 467.
- Bedinger P.** (1992). The Remarkable Biology of Pollen. *Plant Cell* 4: 879 – 887.
- Bereswill S., Jock S., Aldridge P., Janse J. D. and Geider K.** (1997). Molecular characterization of natural *Erwinia amylovora* strains deficient in levan synthesis. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 51: 215 – 225.
- Berger S., Papadopoulos M., Schreiber U., Kaiser W. and Roitsch T.** (2004). Complex regulation of gene expression, photosynthesis and sugar levels by pathogen infection in tomato. *Physiol. Plant.* 122: 419 – 428.
- Bhowmik P. K., Tamura K.-I., Sanada Y., Tase K. and Yamada T.** (2006). Sucrose Metabolism of Perennial Ryegrass in Relation to Cold Acclimation. *Z. Naturforsch.* 61 c: 99 – 104.
- Blackmore S., Wortley A. H., Skvarla J. J. and Rowley J. R.** (2007). Pollen wall development in flowering plants. *New Phytol.* 174: 483 – 498.
- Blöchl A., Peterbauer T. and Richter A.** (2007). Inhibition of raffinose oligosaccharide breakdown delays germination of pea seeds. *J. Plant Physiol.* 164: 1093 – 1096.
- Bocock P. N., Morse A. M., Dervinis C. and Davis J. M.** (2008). Evolution and diversity of invertase genes in *Populus trichocarpa*. *Planta* 227: 565 – 576.
- Bonfig K. B., Schreiber U., Gabler A., Roitsch T. and Berger, S.** (2006). Infection with virulent and avirulent *P. syringae* strains differentially affects photosynthesis and sink metabolism in *Arabidopsis* leaves. *Planta* 225: 1 – 12.
- Bosch S., Grof C. P. L. and Botha F. C.** (2004). Expression of neutral invertase in sugarcane. *Plant Sci.* 166: 1125 – 1133.
- Bournay A.-S., Hedley P. E., Maddison A., Waugh R. and Machray G. C.** (1996). Exon skipping induced by cold stress in a potato Invertase gene transcript. *Nucl. Acids Res.* 24: 2347 – 2351.

- Boyer J. S. and McLaughlin J. E.** (2007). Functional reversion to identify controlling genes in multigenic responses: analysis of floral abortion. *J. Exp. Bot.* 58: 267 – 277.
- 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: 248 – 254.
- Buchanan-Wollaston V.** (1997). The molecular biology of leaf senescence. *J. Exp. Bot.* 48: 181 – 199.
- Büttner M.** (2007). The monosaccharide transporter(-like) gene family in *Arabidopsis*. *FEBS Letters* 581: 2318 – 2324.
- Cerutti H., Johnson A. M., Gillham N. W. and Boynton J. E.** (1997). Epigenetic Silencing of a Foreign Gene in Nuclear Transformants of *Chlamydomonas*. *Plant Cell* 9: 925 – 945.
- Chen J.-G., Willard F. S., Huang J., Liang J., Chasse S. A., Jones A. M. and Siderovski D. P.** (2003). A Seven-Transmembrane RGS Protein That Modulates Plant Cell Proliferation. *Science* 301: 1728 – 1731.
- Cheng W.-H., Taliercio E. W. and Chourey P. S.** (1999). Sugars modulate an unusual mode of control of the cell-wall Invertase gene (*Incw1*) through its 3' untranslated region in a cell suspension culture of maize. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 69: 10512 – 10517.
- Cheung A. Y., Wang H. and Wu H.-M.** (1995). A Floral Transmitting Tissue-Specific Glycoprotein Attracts Pollen Tubes and Stimulates Their Growth. *Cell* 82: 383 – 393.
- Cheung A. Y., Wu H.-M., di Stilio V., Glaven R., Chen C., Wong E., Ogdahl J. and Estavillo A.** (2000). Pollen-Pistil Interactions in *Nicotiana tabacum*. *Ann. Bot.* 85 (Suppl. A): 29 – 37.
- Cheung A. Y., Zhan X.-Y., Wang H. and Wu H.-M.** (1996). Organ-specific and Agamous-regulated expression and glycosylation of a pollen tube growth-promoting protein. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93: 3853 – 3858.
- Chiang M. S.** (1974). Cabbage Pollen Germination and Longevity. *Euphytica* 23: 579 – 584.
- Claeyssen É. and Rivoal J.** (2007). Isozymes of plant hexokinase: Occurrence, properties and functions. *Phytochem.* 68: 709 – 731.

- Cho Y.-H., Yoo S.-D. and Sheen J.** (2006). Regulatory Functions of Nuclear Hexokinase1 Complex in Glucose Signaling. *Cell* 127: 579 – 589.
- Clément C. and Audran J. C.** (1999). Anther carbohydrates during *in vivo* and *in vitro* pollen development. In: *Anther and Pollen. From Biology to Biotechnology*. Clément S., Pacini E. und Audran J. C. (eds.). Springer-Verlag, Heidelberg, pp 69 – 90.
- Cole R. A., Synek L., Zarsky V. and Fowler J. E.** (2005). SEC8, a Subunit of the Putative Arabidopsis Exocyst Complex, Facilitates Pollen Germination and Competitive Pollen Tube Growth. *Plant Physiol.* 138: 2005 – 2018.
- Coupe S. A., Sinclair B. K., Greer L. A., Gapper N. E., Watson L. M. and Hurst P. L.** (2003). Analysis of acid invertase gene expression during the senescence of broccoli florets. *Postharvest Biol. Technol.* 28: 27 – 37.
- Cresti M., Pacini E., Ciampolini F. and Sarfatti G.** (1977). Germination and Early Tube Development *in vitro* of *Lycopersium peruvianum* Pollen: Ultrastructural Features. *Planta* 136: 239 – 247.
- Crowley T. M., Muralitharan M. S. and Stevenson T. W.** (2003). Isolating Conifer DNA: A Superior Polysaccharide Elimination Method. *Plant Mol. Biol. Rep.* 21: 97a – 97d.
- Cui X., Wise R. P. and Schnable P. S.** (1996). The *rf2* Nuclear Restorer Gene of Male-Sterile T-Cytoplasm Maize. *Science* 272: 1334 – 1336.
- De Connick B., Le Roy K., Francis I., Clerens S., Vergauwen R., Halliday A. M., Smith S. M., Van Laere A. and Van den Ende W.** (2005). Arabidopsis AtcwINV3 and 6 are not invertases but are fructan exohydrolases (FEHs) with different substrate specificities. *Plant, Cell & Environ.* 28: 432 – 443.
- Derksen J., Knuiman B., Hoedemaekers K., Guyon A., Bonhomme S. and Pierson E. S.** (2002). Growth and cellular organization of *Arabidopsis* pollen tubes *in vitro*. *Sex. Plant Rep.* 15: 133 – 139.
- Deshusses J., Gumber S. C. and Loewus F. A.** (1981). Sugar Uptake in Lily Pollen. *Plant Physiol.* 67: 793 – 796.
- Dey M.** (1983). Galactokinase of *Vicia faba* seeds. *Eur. J. Biochem.* 136: 155 – 159.
- Dixit R., Rizzo C., Nasrallah M. and Nasrallah J.** (2001). The *Brassica MIP-MOD* gene encodes a functional water channel that is expressed in the stigma epidermis. *Plant Mol. Biol.* 45: 51 – 62.

- Dong J., Kim S. T. and Lord E. M.** (2005). Plantacyanin Plays a Role in Reproduction in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 138: 778 – 789.
- Du H., Simpson R. J., Clarke A. E. and Bacic A.** (1996). Molecular characterization of a stigma-specific gene encoding an arabinogalactan-protein (AGP) from *Nicotiana glauca*. *Plant J.* 9: 313 – 323.
- Duke E. R., McCarty D. R. and Koch K. E.** (1991). Organ-Specific Invertase Deficiency in the Primary Root of an Inbred Maize Line. *Plant Physiol.* 97: 523 – 527.
- Dzyubinskaya E. V., Kiselevsky D. B., Lobysheva N. V., Shestak A. A. and Samuilov V. D.** (2006). Death of Stoma Guard Cells in Leaf Epidermis under Disturbance of Energy Provision. *Biochem.* 71: 1120 – 1127.
- Edlund A. F., Swanson R. and Preuss D.** (2004). Pollen and Stigma Structure and Function: The Role of Diversity in Pollination. *Plant Cell* 16: S84 – S97.
- Ehneß R., Ecker M., Godt D. E. and Roitsch T.** (1997). Glucose and Stress Independently Regulate Source and Sink Metabolism and Defense Mechanisms via Signal Transduction Pathways Involving Protein Phosphorylation. *Plant Cell* 9: 1825 – 1841.
- Elliott K. J., Butler W. O., Dickinson C. D., Konno Y., Vedvick T. S., Fitzmaurice L. and Mirkov T. E.** (1993). Isolation and characterization of fruit vacuolar invertase genes from two tomato species and temporal differences in mRNA levels during fruit ripening. *Plant Mol. Biol.* 21: 515 – 524.
- Ewing E. E., Devlin M., McNeill D. A., McAdoo M. H. and Hedges A. M.** (1977). Changes in Potato Tuber Invertase and Its Endogenous Inhibitor After Slicing, Including a Study of Assay Methods. *Plant Physiol.* 49: 925 – 929.
- Escobar-Restrepo J.-M., Huck N., Kessler S., Gagliardini V., Gheyselinck J., Yang W.-C. and Grossniklaus U.** (2007). The FERONIA Receptor-like Kinase Mediates Male-Female Interactions During Pollen Tube Reception. *Science* 317: 656 – 660.
- Estruch, J. J. and Beltrán J. P.** (1991). Changes in invertase activities precede ovary growth induced by gibberellic acid. *Physiol. Plant.* 81: 319 – 326.
- Faure J.-E., Rotman N., Fortuné P. and Dumas C.** (2002). Fertilization in *Arabidopsis thaliana* wild type: Developmental stages and time course. *Plant J.* 30: 481 – 488.

- Ficker M., Wemmer T. and Thompson R. D.** (1997). A promoter directing high level expression in pistils of transgenic plants. *Plant Mol. Biol.* 35: 425 – 431.
- Flemetakis E., Efrose R. C., Ott T., Stedel C., Aivalakis G., Udvardi M. K. and Katinakis P.** (2006). Spatial and temporal organization of sucrose metabolism in *Lotus japonicus* nitrogen-fixing nodules suggests a role for the elusive alkaline/neutral invertase. *Plant Mol. Biol.* 62: 53 – 69.
- Fotopoulos F., Gilbert M. J., Pittman J. K., Marvier A. C., Buchanan A. J., Sauer N., Hall J. L. and Williams L. E.** (2003). The Monosaccharide Transporter Gene, *AtSTP4*, and the Cell-Wall Invertase, *Atβfruct1*, Are Induced in Arabidopsis during Infection with the Fungal Biotroph *Erysiphe cichoracearum*. *Plant Physiol.* 132: 821 – 829.
- Fridman E. and Zamir D.** (2003). Functional Divergence of a Syntenic Invertase Gene Family in Tomato, Potato, and *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 131: 603 – 609.
- Fukushima E., Arata Y., Endo T., Sonnewald U. and Sato F.** (2001). Improved Salt Tolerance of Transgenic Tobacco Expressing Apoplastic Yeast-Derived Invertase. *Plant Cell Physiol.* 42: 245 – 249.
- Gallusci P., Salamini F. and Thompson R. D.** (1994). Differences in cell type-specific expression of the gene *Opaque 2* in maize and transgenic tobacco. *Mol. Gen. Genet.* 244: 391 – 400.
- Gao Z., Maurousset L., Lemoine R., Yoo S. D., van Nocker S. and Loescher W.** (2003). Cloning, expression and characterization of sorbitol transporters from developing sour cherry fruit and leaf sink tissues. *Plant Physiol.* 131: 1566 – 1575.
- Garrido D., Busscher J. and van Tunen A. J.** (2006). Promoter activity of a putative pollen monosaccharide transporter in *Petunia hybrida* and characterization of a transposon insertion mutant. *Protoplasma* 228: 3 – 11.
- Gasser C. S., Budelier K. A., Smith A. G., Shah D. M. and Fraley R. T.** (1989). Isolation of Tissue-Specific cDNAs from Tomato Pistils. *Plant Cell* 1: 15 – 24.
- German M. A., Dai N., Chmelnitsky I., Sobolev I., Salts Y., Barg R., Schaffer A. A. and Granot D.** (2002). *LeFRK4*, a novel tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) fructokinase specifically expressed in stamens. *Plant Sci.* 163: 607 – 613.
- Gibson S. I.** (2005). Control of plant development and gene expression by sugar signaling. *Curr. Opin. Plant Biol.* 8: 93 – 102.

- Godt D. E. and Roitsch T.** (1997). Regulation and Tissue-Specific Distribution of mRNAs for Three Extracellular Invertase Isoenzymes of Tomato Suggests an Important Function in Establishing and Maintaining Sink Metabolism. *Plant Physiol.* 115: 273 – 282.
- Goetz M.** (2001). Extrazelluläre Invertasen in Höheren Pflanzen. Dissertation. Universität Regensburg.
- Goetz M. and Roitsch T.** (1999). The different pH-optima and substrate specificities of extracellular and vacuolar invertases are determined by a single amino acid substitution. *Plant J.* 20: 707 – 711.
- Goetz M., Godt D. E. and Roitsch T.** (2000). Tissue-specific induction of the mRNA for an extracellular Invertase isoenzyme of tomato by brassinosteroids suggests a role for steroid hormones in assimilate partitioning. *Plant J.* 22: 515 – 522.
- Goetz M., Godt D. E., Guivarc'h A., Kahmann U., Chriqui D. and Roitsch T.** (2001). Induction of male sterility in plants by metabolic engineering of the carbohydrate supply. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98: 6522 – 6527.
- Goldberg R. B., Beals T. P. and Sanders P. M.** (1993). Anther Development: Basic Principles and Practical Applications. *Plant Cell* 5: 1217 – 1229.
- Goldman M. H. S., Goldberg R. B. and Mariani C.** (1994). Female sterile tobacco plants are produced by stigma-specific cell ablation. *EMBO J.* 13: 2976 – 2984.
- Gonzali S., Alpi A., Blando F. and de Bellis L.** (2002). *Arabidopsis* (HXK1 and HXK2) and yeast (HXK2) hexokinases overexpressed in transgenic lines are characterized by different catalytic properties. *Plant Sci.* 163: 943 – 954.
- Greiner S., Krausgrill S. and Rausch T.** (1998). Cloning of a Tobacco Apoplasmic Invertase Inhibitor. *Plant Physiol.* 116: 733 – 742.
- Greiner S., Rausch T., Sonnewald U. and Herbers K.** (1999). Ectopic expression of a tobacco invertase inhibitor homolog prevents cold-induced sweetening of potato tubers. *Nature Biotechnol.* 17: 708 – 711.
- Greiner S., Weil M., Krausgrill S. and Rausch T.** (1995). A Tobacco cDNA Coding for Cell-Wall Invertase. *Plant Physiol.* 108: 825 – 826.
- Grennan A. K.** (2007). The Role of Trehalose Biosynthesis in Plants. *Plant Physiol.* 144: 3 – 5.

- Grove M. D., Spencer G. F., Rohwedder W. K., Mandava N., Worley J. F., Warthen J. D. Jr, Steffens G. L., Flippen-Anderson J. L., and Cook, J. C. Jr** (1979). Brassinolide, a plant growth-promoting steroid isolated from *Brassica napus* pollen. *Nature* 281: 216 – 217.
- Guivarc'h A., Rembur J., Goetz M., Roitsch T., Noin M., Schmülling T. and Chriqui D.** (2002). Local expression of the *ipt* gene in transgenic tobacco (*Nicotiana tabacum* L. cv. SR1) axillary buds establishes a role for cytokinins in tuberization and sink formation. *J. Exp. Bot.* 53: 621 – 629.
- Gupta A. K. and Kaur N.** (2005). Sugar signaling and gene expression in relation to carbohydrate metabolism under abiotic stresses in plants. *J. Biosci.* 30: 761 – 776.
- Hackett R. M., Cadwallader G. and Franklin F. C. H.** (1996). Functional Analysis of a *Brassica oleracea* *SLR1* Gene Promoter. *Plant Physiol.* 112: 1601 – 1607.
- Halford N. G., Hey S., Jhurrea D., Laurie S., McKibbin R. S., Paul M. and Zhang Y.** (2003). Metabolic signalling and carbon partitioning: role of Snf1-related (SnRK1) protein kinase. *J. Exp. Bot.* 54: 467 – 475.
- Hamilton D. A., Roy M., Rueda J., Sindhu R. K., Sandford J. and Mascarenhas J. P.** (1992). Dissection of a pollen-specific promoter from maize by transient transformation assays. *Plant Mol. Biol.* 18: 211 – 218.
- Haouazine-Takvorian N., Tymowska-Lalanne Z., Takvorian A., Tregear J., Lejeune A. and Kreis M.** (1997). Characterization of two members of the *Arabidopsis thaliana* gene family, *Atβfruct3* and *Atβfruct4*, coding for vacuolar invertases. *Gene* 197: 239 – 251.
- Haradahira T., Tanaka A., Maeda M., Kanazawa Y., Ichiya Y.-I. and Masuda K.** (1995). Radiosynthesis, Rodent Biodistribution, and Metabolism of 1-Deoxy-1-[¹⁸F]Fluoro-D-Fructose. *Nucl. Med. Biol.* 22: 719 – 725.
- Haritatos E., Medville R. and Turgeon R.** (2000). Minor vein structure and sugar transport in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 211: 105 – 111.
- Hendry G. A. F.** (1993). Evolutionary origins and natural functions of fructans – a climatological, biogeographic and mechanistic appraisal. *New Phytol.* 123: 3 – 14.
- Henikoff S.** (1990). Position-effect variegation after 60 years. *Trends Genet.* 6: 422 – 426.

- Herbers K., Meuwly P., Frommer W. B., Métraux J.-P. and Sonnewald U.** (1996). Systemic Acquired Resistance Mediated by the Ectopic Expression of Invertase: Possible Hexose Sensing in the Secretory Pathway. *Plant Cell* 8: 793 – 803.
- Hettwer U., Gross M. and Rudolph K.** (1995). Purification and Characterization of an Extracellular Levansucrase from *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola. *J. Bacteriol.* 177: 2834 – 2839.
- Higashiyama T., Yabe S., Sasaki N., Nishimura Y., Miyagishima S.-Y., Kuroiwa H. and Kuroiwa T.** (2001). Pollen Tube Attraction by the Synergid Cell. *Science* 293: 1480 – 1483.
- Hitz W. D., Card P. J. and Ripp K. G.** (1986). Substrate Recognition by a Sucrose Transporting Protein. *J. Biol. Chem.* 261: 11986 – 11991.
- Holland N., Sala J. M., Menezes H. C. and Lafuente M. T.** (1999). Carbohydrate Content and Metabolism As Related to Maturity and Chilling Sensitivity of Cv. Fortune Mandarins. *J. Agric. Food Chem.* 47: 2513 – 2518.
- Hothorn M., D'Angelo I., Márquez J. A., Greiner S. and Scheffzek K.** (2004). The Invertase Inhibitor Nt-CIF from Tobacco: A Highly Thermostable Four-helix Bundle with an Unusual N-terminal Extension. *J. Mol. Biol.* 335: 987 – 995.
- Hothorn M., Wolf S., Aloy P., Greiner S. and Scheffzek K.** (2004). Structural Insights into the Target Specificity of Plant Invertase and Pectin Metyesterase Inhibitory Proteins. *Plant Cell* 16: 3437 – 3447.
- Howard H. F. and Witham F. H.** (1983). Invertase Activity and the Kinetin-Stimulated Enlargement of Detached Radish Cotyledons. *Plant Physiol.* 73: 304 – 308.
- Hsieh C.-W., Li L.-K., Yeh S.-H., Chen C.-F., Lin H.-I., Sung H.-Y. and Wang A.-Y.** (2006). Molecular Cloning and Functional Identification of Invertase Isoenzymes from Green Bamboo *Bambusa oldhamii*. *J. Agric. Food Chem.* 54: 3101 – 3107.
- Hülskamp M., Kopczak S., Horejsi T. F., Kihl B. K. and Pruitt R. E.** (1995). Identification of genes required for pollen-stigma recognition in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 8: 703 – 714.
- Jang J.-C. and Sheen J.** (1994). Sugar Sensing in Higher Plants. *Plant Cell* 6: 1665 – 1679.
- Jefferson R. A., Kavanagh, T. A. and Bevan M. W.** (1987). GUS fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J.* 6: 3901 – 3907.

- Ji X. M., Raveendran M., Oane R., Ismail A., Lafitte R., Bruskiwich R., Cheng S. H. and Bennett J.** (2005a). Tissue-specific expression and drought responsiveness of cell-wall Invertase genes of rice at flowering. *Plant Mol. Biol.* 59: 945 – 964.
- Ji X., Van den Ende W., Van Laere A., Cheng S. and Bennett J.** (2005b). Structure, Evolution, and Expression of the Two Invertase Gene Families of Rice. *J. Mol. Evol.* 60: 615 – 634.
- Johnson-Brousseau S. A. and McCormick S.** (2004). A compendium of methods useful for characterizing *Arabidopsis* pollen mutants and gametophytically-expressed genes. *Plant J.* 39: 761 – 775.
- Johnston C. A., Taylor J. P., Gao Y., Kimple A. J., Grigston J. C., Chen J.-G., Siderovski D. P., Jones A. M. and Willard F. S.** (2007). GTPase acceleration as the rate-limiting step in *Arabidopsis* G protein-coupled sugar signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104: 17317 – 17322.
- Jordi W., Schapendonk A., Davelaar E., Stoopen G. M., Pot C. S., de Visser R., van Rhijn J. A., Gan S. and Amasino R. M.** (2000). Increased Cytokinin levels in transgenic P_{SAG12} -*IPT* tobacco plants have large direct and indirect effects on leaf senescence, photosynthesis and N partitioning. *Plant, Cell and Environ.* 23: 279 – 289.
- Kang H. T. and Hwang E. S.** (2006). 2-Deoxyglucose: An anticancer and antiviral therapeutic, but not any more a low glucose mimetic. *Life Sci.* 78: 1392 – 1399.
- Kaothien P., Ok S. H., Shuai B., Wengler D., Cotter R., Kelley D., Kiriakopolos S., Muschietti J. and McCormick S.** (2005). Kinase partner protein interacts with the LePRK1 and LePRK2 receptor kinases and plays a role in polarized pollen tube growth. *Plant J.* 42: 492 – 503.
- Kaplan C. P., Tugal H. B. and Baker A.** (1997). Isolation of a cDNA encoding an *Arabidopsis* galactokinase by functional expression in yeast. *Plant Mol. Biol.* 34: 497 – 506.
- Karni L. and Aloni B.** (2002). Fructokinase and Hexokinase from Pollen Grains of Bell Pepper (*Capsicum annuum* L.): Possible Role in Pollen Germination under Conditions of High Temperature and CO₂ Enrichment. *Ann. Bot.* 90: 607 – 612.
- Karpen G. H.** (1994). Position-effect variegation and the new biology of heterochromatin. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 4: 281 – 291.

- Kato-Noguchi H, Takaoka T. and Izumori K.** (2005). Psicose inhibits lettuce root growth via a hexokinase-independent pathway. *Physiol. Plant.* 125: 293 – 298.
- Kawakami A., Yoshida M. and van den Ende W.** (2005). Molecular cloning and functional analysis of a novel 6&1-FEH from wheat (*Triticum aestivum* L.) preferentially degrading small graminans like bifurcose. *Gene* 358: 93 – 101.
- Kim J.-B., Olek A. T. and Carpita N. C.** (2000). Cell Wall and Membrane-Associated Exo- β -D-Glucanases from Developing Maize Seedlings. *Plant Physiol.* 123: 471 – 485.
- Kim J.-Y., Mahé A., Brangeon J. and Prioul J.-L.** (2000). A Maize Vacuolar Invertase, *IVR2*, Is Induced by Water Stress. Organ/Tissue Specificity and Diurnal Modulation of Expression. *Plant Phys.* 124: 71 – 84.
- Kim S., Mollet J.-C., Dong J., Zhang K., Park S.-Y. and Lord E. M.** (2003). Chemocyanin, a small basic protein from the lily stigma, induces pollen tube chemotropism. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100: 16125 – 16130.
- Koch K.** (2004). Sucrose metabolism: regulatory mechanisms and pivotal roles in sugar sensing and plant development. *Curr. Opin. in Plant Biol.* 7: 235 – 246.
- Kojima H., Suzuki T., Kato T., Enomoto K.-I., Sato S., Kato T., Tabata S., Sáez-Vasquez J., Echeverría M., Nakagawa T., Ishiguro S. and Nakamura K.** (2007). Sugar-inducible expression of the nucleolin-1 gene of *Arabidopsis thaliana* and its role in ribosome synthesis, growth and development. *Plant J.* 49: 1053 – 1063.
- Koltunow A. M., Truettner J., Cox K. H., Wallroth M. and Goldberg R. B.** (1990). Different Temporal and Spatial Gene Expression Patterns Occur during Anther Development. *Plant Cell* 2: 1201 – 1224.
- Koncz C., Martini N., Mayerhofer R., Koncz-Kalman Z., Körber H., Redei G. P. and Schell J.** (1989). High-frequency T-DNA-mediated gene tagging in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86: 8467 – 8471.
- Koonjul P. K., Minhas J. S., Nunes C., Sheoran I. S. and Saini H. S.** (2005). Selective transcriptional down-regulation of anther invertases precedes the failure of pollen development in water-stressed wheat. *J. Exp. Bot.* 56: 179 – 190.
- Krapp A., Hofmann B., Schäfer C. and Stitt M.** (1993). Regulation of the expression of *rbcS* and other photosynthetic genes by carbohydrates: a mechanism for the 'sink regulation' of photosynthesis? *Plant J.* 3: 817 – 828.

- Krausgrill S., Sander A., Greiner S., Weil M. and Rausch T.** (1996). Regulation of cell-wall invertase by a proteinaceous inhibitor. *J. Exp. Bot.* 47: 1193 – 1198.
- Krichevsky A., Kozlovsky S. V., Tian G.-W., Chen M.-H., Zaltsman A. and Citovsky V.** (2007). How pollen tubes grow. *Dev. Biol.* 303: 405 – 420.
- Kuiper D.** (1993). Sink strength: established and regulated by plant growth regulators. *Plant, Cell and Environ.* 16: 1025 – 1026.
- Kunze I., Ebneith M., Heim U., Geiger M., Sonnewald U. and Herbers K.** (2001). 2-Deoxyglucose resistance: a novel selection marker for plant transformation. *Mol. Breeding* 7: 221 – 227.
- Lauer K.** (2006). Nt-VIF – ein proteinogener Inhibitor der Vakuolären Invertasen in Tabak. Dissertation. Universität Heidelberg.
- Leisy D. J., Hnilo J., Zhao Y. and Okita T. W.** (1989). Expression of a rice glutelin promoter in transgenic tobacco. *Plant Mol. Biol.* 14: 41 – 50.
- Lemoine R., Bürkle L., Barker L., Sakr S., Kühn C., Regnacq M., Gaillard C., Delrot S. and Frommer W. B.** (1999). Identification of a pollen-specific sucrose transporter-like protein NtSUT3 from tobacco. *FEBS Letters* 454: 325 – 330.
- Lennon K. A. and Lord E. M.** (2000). In vivo pollen tube cell of *Arabidopsis thaliana* I. Tube cell cytoplasm and wall. *Protoplasma* 214: 45 – 56.
- Le Roy K., Lammens W., Verhaest M., de Coninck B., Rabijns A., van Laere A. and van den Ende W.** (2007). Unravelling the Difference between Invertases and Fructan Exohydrolases: A Single Amino Acid (Asp-239) Substitution Transforms *Arabidopsis* Cell Wall Invertase 1 into a Fructan 1-Exohydrolase. *Plant Physiol.* 145: 616 – 625.
- Li J. and Chory J.** (1999). Brassinosteroid actions in plants. *J. Exp. Bot.* 50: 275 – 282.
- Linden J., Ehneß R. and Roitsch T.** (1996). Ethylene regulation of apoplastic invertase expression in autotrophic cells of *Chenopodium rubrum*. *Plant Growth Reg.* 19: 219 – 222.
- Link M., Rausch T. and Greiner S.** (2004). In *Arabidopsis thaliana*, the invertase inhibitors AtC/VIF1 and 2 exhibit distinct target enzyme specificities and expression profiles. *FEBS Letters* 573: 105 – 109.
- Link V. L., Hofmann M. G., Sinha A. K., Ehneß R., Strnad M. and Roitsch T.** (2002). Biochemical Evidence for the Activation of Distinct Subsets of Mitogen-

- Activated Protein Kinases by Voltage and Defense-Related Stimuli. *Plant Physiol.* 128: 271 – 281.
- Lippman Z., Gendrel A.-V., Black M., Vaughn M. W., Dedhia N., McComble R., Lavine K., Mittal V., May B., Kasschau K. D., Carrington J. C., Doerge R. W., Colot V. and Martienssen R.** (2004). Role of transposable elements in heterochromatin and epigenetic control. *Nature* 430: 471 – 476.
- Long J. C., Zhao W., Rashotte A. M., Muday G. K. and Huber S. C.** (2002). Gravity-Stimulated Changes in Auxin and Invertase Gene Expression in Maize Pulvinal Cells. *Plant Physiol.* 128: 591 – 602.
- Loreti E., Alpi A. and Perata P.** (2000). Glucose and Disaccharide-Sensing Mechanisms Modulate the Expression of *α-amylase* in Barley Embryos. *Plant Physiol.* 123: 939 – 948.
- Lowell C. A., Tomlinson P. T. and Koch K. E.** (1989). Sucrose-Metabolizing Enzymes in Transport Tissues and Adjacent Sink Structures in Developing Citrus Fruit. *Plant Physiol.* 90: 1394 – 1402.
- Lu C.-A., Lin C.-C., Lee K.-W., Chen J.-L., Huang L.-F., Ho S.-L., Liu H.-J., Hsing Y.-I. and Yu S.-M.** (2007). The SnRK1A Protein Kinase Plays a Key Role in Sugar Signaling during Germination and Seedling Growth of Rice. *Plant Cell* 19: 2484 – 2499.
- Lush W. M., Grieser F. and Wolters-Arts M.** (1998). Directional Guidance of *Nicotiana glauca* Pollen Tubes *in Vitro* and on the Stigma. *Plant Physiol.* 118: 733 – 741.
- Maddison A. L., Hedley P. E., Meyer R. C., Aziz N., Davidson D. and Machray G. C.** (1999). Expression of tandem Invertase genes associated with sexual and vegetative growth cycles in potato. *Plant Mol. Biol.* 41: 741 – 751.
- Mascarenhas J. P.** (1990). Gene Activity During Pollen Development. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 41: 317 – 338.
- Mascarenhas J. P.** (1993). Molecular Mechanisms of Pollen Tube Growth and Differentiation. *Plant Cell* 5: 1303 – 1314.
- Matsushita K. and Uritani I.** (1977). Synthesis and Apparent Turnover of Acid Invertase in Relation to Invertase Inhibitor in Wounded Sweet Potato Root Tissue. *Plant Physiol.* 59: 879 – 883.

- Matsuura-Endo C., Kobayashi A., Noda T., Takigawa S., Yamauchi H. and Mori M.** (2004). Changes in sugar content and activity of vacuolar acid Invertase during low-temperature storage of potato tubers from six Japanese cultivars. *J. Plant Res.* 117: 131 – 137.
- McCormick S. (2004).** Control of Male Gametophyte Development. *Plant Cell* 16 (Suppl.): S142 – S153.
- McCormick S. and Yang H.** (2005). Is there more than one way to attract a pollen tube? *Trends Plant Sci.* 10: 260 – 263.
- McInnis S. M., Costa L. M., Gutiérrez-Marcos J. F., Henderson C. A. and Hiscock S. J.** (2005). Isolation and characterization of a polymorphic stigma-specific class III peroxidase gene from *Senecio squalidus* L. (Asteraceae). *Plant Mol. Biol.* 57: 659: 677.
- Mellema S., Eichenberger W., Rawlyer A., Suter M., Tadege M. and Kuhlemeier C.** (2002). The ethanolic fermentation pathway supports respiration and lipid biosynthesis in tobacco pollen. *Plant J.* 30: 329 – 336.
- Meyer P.** (2000). Transcriptional transgene silencing and chromatin components. *Plant Mol. Biol.* 43: 221 – 234.
- Michiels A., van Laere A., van den Ende W. and Tucker M.** (2004). Expression analysis of a chicory fructan 1-exohydrolase gene reveals complex regulation by cold. *J. Exp. Bot.* 55: 1325 – 1333.
- Miki D., Itoh R. and Shimamoto K.** (2002). RNA Silencing of Single and Multiple Members in a Gene Family of Rice. *Plant Physiol.* 138: 1903 – 1913.
- Mitsuhashi W., Sasaki S., Kanazawa A., Yang Y.-Y., Kamiya Y. und Toyomasu, T.** (2004). Differential Expression of Acid Invertase Genes during Seed Germination in *Arabidopsis thaliana*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 68: 602 – 608.
- Moore B., Zhou L., Rolland F., Hall Q., Cheng W.-H., Liu Y.-X., Hwang I., Jones T. and Sheen J.** (2003). Role of the *Arabidopsis* Glucose Sensor HXK1 in Nutrient, Light, and Hormonal Signaling. *Science* 300: 332 – 336.
- Müller J., Aeschbacher A., Sprenger N., Boller T. and Wiemken A.** (2000). Disaccharide-Mediated Regulation of Sucrose:Fructan-6-Fructosyl-transferase, a Key Enzyme of Fructan Synthesis in Barley Leaves. *Plant Physiol.* 123: 265 – 273.

- Müssig C. and Altmann T.** (1999). Physiology and molecular mode of action of brassinosteroids. *Plant Physiol. Biochem.* 37: 363 – 372.
- Murayama S. and Handa H.** (2007). Genes for alkaline/neutral invertase in rice: alkaline/neutral invertases are located in plant mitochondria and also in plastids. *Planta* 225: 1193 – 1203.
- Myers D. K. and Matheson N. K.** (1994). Hexose-6-Kinases in Germinating Honey Locust Cotyledons: Substrate Specificity of D-Fructo-6-Kinase. *Phytochem.* 37: 957 – 969.
- Nakamura N., Shimizu M. and Suzuki H.** (1991). Characterization of hexose kinases from camellia and lily pollen grains. *Physiol. Plant.* 81: 215 – 220.
- Ngampanya B., Sobolewska A., Takeda T., Toyofuku K., Narangajavana J., Ikeda A. and Yamaguchi J.** (2003). Characterization of Rice Functional Monosaccharide Transporter, *OsMST5*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 67: 556 – 562.
- Niewiadomski P., Knappe S., Geimer S., Fischer K., Schulz B., Unte U. S., Rosso M. G., Ache P., Flügge U.-I. and Schneider A.** (2005). The *Arabidopsis* Plastidic Glucose 6Phosphate/Phosphate Translocator GPT1 Is Essential for Pollen Maturation and Embryo Sac Development. *Plant Cell* 17: 760 – 775.
- Noiraud N., Delrot S. and Lemoine R.** (2000). The sucrose transporter of celery. Identification and expression during salt stress. *Plant Physiol.* 122: 1447 – 1455.
- Oliver S. N., Dennis E. S. and Dolferus R.** (2007). ABA Regulates Apoplastic Sugar Transport and is a Potential Signal for Cold-Induced Pollen Sterility in Rice. *Plant, Cell and Physiol.* 48: 1319 – 1330.
- Op den Camp R. G. L. and Kuhlemeier C.** (1997). Aldehyde dehydrogenase in tobacco pollen. *Plant Mol. Biol.* 35: 355 – 365.
- Ordóñez R. M., Isla M. I., Vattuone M. A. and Sampietro A. R.** (2000). Invertase proteinaceous inhibitor of *Cyphomandra betacea* Sendt fruits. *J. Enzyme Inhib.* 15: 583 – 596.
- Otsu C. T., daSilva I., de Molfetta J. B., da Silva L. R., de Almeida-Engler J., Engler G., Torraca P. C., Goldman G. H. and Goldman M. H. S.** (2004). *NtWBC1*, an ABC transporter gene specifically expressed in tobacco reproductive organs. *J. Exp. Bot.* 55: 1643 – 1654.

- Padidam M.** (2003). Chemically regulated gene expression in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 6: 169 – 177.
- Palanivelu R., Brass L., Edlund A. F. and Preuss D.** (2003). Pollen Tube Growth and Guidance Is Regulated by *POP2*, an *Arabidopsis* Gene that Controls GABA Levels. *Cell* 114: 47 – 59.
- Park J.-H., Halitschke R., Kim H. B., Baldwin I. T., Feldmann K. A. and Feyereisen R.** (2002). A knock-out mutation in allene oxide synthase results in male sterility and defective wound signal transduction in *Arabidopsis* due to a block in jasmonic acid biosynthesis. *Plant J.* 31: 1 – 12.
- Paul M.** (2007). Trehalose 6-phosphate. *Curr. Opin. Plant Biol.* 10: 303 – 309.
- Pauls P. K., Kunert K., Huttner E. and Grandbastien M.-A.** (1994). Expression of the tobacco Tnt1 retrotransposon promoter in heterologous species. *Plant Mol. Biol.* 26: 393 – 402.
- Pawloski L. C., Muthugapatti K. K. and Meagher R. B.** (2006). The late pollen actins are essential for normal male and female development in *Arabidopsis*. *Plant Mol. Biol.* 62: 881 – 896.
- Peach C. and Velten J.** (1991). Transgene expression variability (position effect) of CAT and GUS reporter genes driven by linked divergent T-DNA promoters. *Plant Mol. Biol.* 17: 49 – 60.
- Pego J. V., Kortstee A. J., Huijser C. and Smeekens S. C. M.** (2000). Photosynthesis, sugars and the regulation of gene expression. *J. Exp. Bot.* 51: 407 – 416.
- Pego J. V. and Smeekens C. M.** (2000). Plant fructokinases: a sweet family get-together. *Trends Plant Sci.* 5: 531 – 536.
- Pego J. V., Weisbeek P. J. and Smeekens S. C. M.** (1999). Mannose Inhibits *Arabidopsis* Germination via a Hexokinase-Mediated Step. *Plant Physiol.* 119: 1017 – 1023.
- Pharr D. M. and Sox H. N.** (1984). Changes in carbohydrate and enzyme levels during the sink to source transition of leaves of *Cucumis sativus* L., a stachyose translocator. *Plant Sci. Lett.* 35: 187 – 193.
- Prado A. M., Porterfield D. M. and Feijo J. A.** (2004). Nitric oxide is involved in growth regulation and re-orientation of pollen tubes. *Dev.* 131: 2707 – 2714.

- Preuss D., Lemieux B., Yen G. and Davis R. W.** (1993). A conditional sterile mutation eliminates surface components from *Arabidopsis* pollen and disrupts cell signaling during fertilization. *Gen. Dev.* 7: 974 – 985.
- Pressey R.** (1968). Invertase Inhibitors From Red Beet, Sugar Beet, and Sweet Potato Roots. *Plant Physiol.* 43: 1430 – 1434.
- Pressey R.** (1994). Invertase Inhibitor in Tomato Fruit. *Phytochem.* 36: 543 – 546.
- Price J., Li T.-C., Kang S. G., Na J. K. and Jang J.-C.** (2003). Mechanisms of Glucose Signaling during Germination of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 132: 1424 – 1438.
- Pröls F. and Meyer P.** (1992). The methylation patterns of chromosomal integration regions influence gene activity of transferred DNA in *Petunia hybrida*. *Plant J.* 2: 466 – 475.
- Proels R. K., González M.-C. and Roitsch T.** (2006). Gibberellin-dependent induction of tomato extracellular Invertase *Lin7* is required for pollen development. *Funct. Plant Biol.* 33: 547 – 554.
- Proels R. K., Hause B., Berger S. and Roitsch, T.** (2003). Novel mode of hormone induction of tandem tomato Invertase genes in floral tissues. *Plant Mol. Biol.* 52: 191 – 201.
- Qi X., Wu Z., Li J., Mo X., Wu S., Chu J. and Wu P.** (2007). AtCYT-INV1, a neutral invertase, is involved in osmotic stress-induced inhibition on lateral root growth in *Arabidopsis*. *Plant Mol. Biol.* 64: 575 – 587.
- Qin Y., Chen D. and Zhao J.** (2007). Localization of arabinogalactan proteins in anther, pollen, and pollen tube of *Nicotiana tabacum* L. *Protoplasma* 23: 43 – 53.
- Rai M., Datta K., Parkhi V., Tan J., Oliva N., Chawla H. S. and Datta S. K.** (2007). Variable T-DNA linkage configuration affects inheritance of carotenogenic transgenes and carotenoid accumulation in transgenic indica rice. *Plant Cell Rep.* 26: 1221 – 1231.
- Ramon M., Rolland F., Thevelein J. M., van Dijck P. and Leyman B.** (2007). ABI4 mediates the effects of exogenous trehalose on *Arabidopsis* growth and starch breakdown. *Plant Mol. Biol.* 63: 195 – 206.
- Rausch T. and Greiner S.** (2004). Plant protein inhibitors of invertases. *Biochim. Biophys. Acta* 1696: 253 – 261.

- Reger B. J., Pressey R. and Chaubal R.** (1992). *In vitro* chemotropism of pearl millet pollen tubes to stigma tissue: a response to glucose produced in the medium by tissue-bound invertase. *Sex. Plant Rep.* 5: 201 – 205.
- Reinders A., Schulze W., Thaminy S., Stagljar I., Frommer W. B. and Ward J. M.** (2002). Intra- and Intermolecular Interactions in Sucrose Transporters at the Plasma Membrane Detected by the Split-Ubiquitin System and Functional Assays. *Structure* 10: 763 – 772.
- Rhee S. Y., Beavis W., Berardini T. Z., Chen G., Dixon D., Doyle A., Garcia-Hernandez M., Huala E., Lander G., Montoya M., Miller N., Mueller L. A., Mundodi S., Reiser L., Tacklind J., Weems D. C., Wu Y., Xu I., Yoo D., Yoon J. and Zhan P.** (2003). The *Arabidopsis* Information Resource (TAIR): a model organism database providing a centralized, curated gateway to *Arabidopsis* biology, research materials and community. *Nuc. Acids Res.* 31: 224 – 228.
- Richings E. W., Cripps R. F. and Cowan A. K.** (2000). Factors affecting 'Hass' avocado fruit size: Carbohydrate, abscisic acid and isoprenoid metabolism in normal and phenotypically small fruit. *Physiol. Plant.* 109: 81 – 89.
- Ritsema T., Hernández L., Verhaar A., Altenbach D., Boller T., Wiemken A. and Smeekens S.** (2006). Developing fructan-synthesizing capability in a plant Invertase via mutations in the sucrose-binding box. *Plant J.* 48: 228 – 237.
- Robson P. R., Donnison I. S., Wang K., Frame B., Pegg S. E., Thomas A. and Thomas H.** (2004). Leaf senescence is delayed in maize expressing the *Agrobacterium* IPT gene under the control of a novel maize senescence-enhanced promoter. *Plant Biotechnol. J.* 2: 101 – 112.
- Roitsch T. and Ehneß R.** (2000). Regulation of source/sink relations by cytokinins. *Plant Gr. Reg.* 32: 359 – 367.
- Roitsch T., Ehneß R., Goetz M., Hause B., Hofmann M. and Sinha A. K.** (2000). Regulation and function of extracellular Invertase from higher plants in relation to assimilate partitioning, stress responses and sugar signalling. *Aust. J. Plant Physiol.* 27: 815 – 825.
- Roitsch T. and González M.-C.** (2004). Function and regulation of plant invertases: sweet sensations. *Trends Plant Sci.* 9: 606 – 613.
- Roitsch T., Balibrea M. E., Hofmann M., Proels R. and Sinha A. K.** (2003). Extracellular Invertase: key metabolic enzyme and PR protein. *J. Exp. Bot.* 54: 513 – 524.

- Roitsch T., Bittner M. and Godt D. E.** (1995). Induction of Apoplastic Invertase of *Chenopodium rubrum* by D-Glucose and a Glucose Analog and Tissue-Specific Expression Suggest a Role in Sink-Source Regulation. *Plant Physiol.* 108: 285 – 294.
- Rolland F., Baena-Gonzalez E. and Sheen J.** (2006). Sugar Sensing and Signaling in Plants: Conserved and Novel Mechanisms. *Annu. Rev. Plant Biol.* 57: 675 – 709.
- Rook F., Gerrits N., Kortstee A., van Kampen M., Borrias M., Weisbeek P. and Smeekens S.** (1998). Sucrose-specific signalling represses translation of the *Arabidopsis* ATB2 bZIP transcription factor gene. *Plant J.* 15: 253 – 263.
- Rosen W. G.** (1968). Ultrastructure and Physiology of Pollen. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 19: 435 – 462.
- Sander A., Krausgrill S., Greiner S., Weil M. and Rausch T.** (1996). Sucrose protects cell wall invertase but not vacuolar invertase against proteinaceous inhibitors. *FEBS Letters* 385: 171 – 175.
- Sato T., Thorsness M. K., Kandasamy M. K., Nishio T., Hirai M., Nasrallah J. B. and Nasrallah M. E.** (1991). Activity of an S Locus Gene Promoter in Pistils and Anthers of Transgenic *Brassica*. *Plant Cell* 3: 867 – 876.
- Sauer N. and Stolz J.** (1994). SUC1 and SUC2: two sucrose transporters from *Arabidopsis thaliana*; expression and characterization in baker's yeast and identification of the histidine-tagged protein. *Plant J.* 6: 67 – 77.
- Sayago J. E., Vattuone M. A., Sampietro A. R. and Isla M. I.** (2001). An invertase inhibitory protein from *Pteris deflexa* link fronds. *J. Enzyme Inhib.* 16: 517 – 525.
- Schijlen E. G. W. M., de Vos C. H. R., Martens S., Jonker H. H., Rosin F. M., Molthoff J. W., Tikunov Y. M., Angenent G. C., van Tunen A. J. and Bovy A. G.** (2007). RNA Interference Silencing of Chalcone Synthase, the First Step in the Flavonoid Biosynthesis Pathway, Leads to Parthenocarpic Tomato Fruits. *Plant Physiol.* 144: 1520 – 1530.
- Schlüter U., Köpke D., Altmann T. and Müssig C.** (2002). Analysis of carbohydrate metabolism of *CPD* antisense plants and the brassinosteroid-deficient *ccb1* mutant. *Plant, Cell and Environ.* 25: 783 – 791.
- Schmidt K.** (2006). Untersuchungen zur gentechnisch vermittelten Induktion männlicher Sterilität bei *Nicotiana spp.* Diplomarbeit. Universität Würzburg.

- Schnable P. S. and Wise R. P.** (1998). The molecular basis of cytoplasmic male sterility and fertility restoration. *Trends Plant Sci.* 3: 175 – 180.
- Schnurr J. A., Storey K. K., Jung H.-J. G., Somers D. A. and Gronwald J. W.** (2006). UDP-sugar pyrophosphorylase is essential for pollen development in *Arabidopsis*. *Planta* 224: 520 – 532.
- Schotta G., Ebert A., Dorn R. and Reuter G.** (2003). Position-effect variegation and the genetic dissection of chromatin regulation in *Drosophila*. *Sem. Cell Dev. Biol.* 14: 67 – 75.
- Schubert D., Lechtenberg B., Forsbach A., Gills M., Bahadur S. and Schmidt R.** (2004). Silencing in *Arabidopsis* T-DNA Transformants: The Predominant Role of a Gene-Specific RNA Sensing Mechanism versus Position Effects. *Plant Cell* 16: 2561 – 2572.
- Schulze W., Weise A., Frommer W. B. and Ward J. M.** (2000). Function of the cytosolic N-terminus of sucrose transporter AtSUT2 in substrate affinity. *FEBS Lett.* 485: 189 – 194.
- Schwimmer S., Makower R. and Rorem E.** (1961). Invertase & Invertase Inhibitor in Potato. *Plant Physiol.* 36: 313 – 316.
- Scognamiglio M. A., Ciardiello M. A., Tamburrini M., Carratore V., Rausch T. and Camardella L.** (2003). The Plant Invertase Inhibitor Shares Structural Properties and Disulfide Bridges Arrangement with the Pectin Methyltransferase Inhibitor. *J. Prot. Chem.* 22: 363 – 369.
- Scott P., Lyne R. L. and ap Rees T.** (1995). Metabolism of maltose and sucrose by microspores isolated from barley (*Hordeum vulgare* L.). *Planta* 197: 435 – 441.
- Seifert G. J. and Roberts K.** (2007). The Biology of Arabinogalactan Proteins. *Annu. Rev. Plant Biol.* 58: 137 – 161.
- Sergeeva L. I., Keurentjes J. J. B., Bentsink L., Vonk J., van der Plas L. H. W., Koorneef M. and Vreugdenhil D.** (2006). Vacuolar invertase regulates elongation of *Arabidopsis thaliana* roots as revealed by QTL and mutant analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103: 2994 – 2999.
- Sheen J.** (1990). Metabolic Repression of Transcription in Higher Plants. *Plant Cell* 2: 1027 – 1038.
- Shen W.-H.** (2001). NtSET1, a member of a newly identified subgroup of plant SET-domain-containing proteins, is chromatin-associated and its ectopic overexpression inhibits tobacco plant growth. *Plant J.* 28: 371 – 383.

- Sherson S. M., Alford H. L., Forbes S. M., Wallace G. and Smith S. M.** (2003). Roles of cell-wall invertases and monosaccharide transporters in the growth and development of *Arabidopsis*. *J. Exp. Bot.* 54: 525 – 531.
- Simpson C. G., Hedley P. E., Watters J. A., Clark G. P., McQuade C., Machray G. C. and Brown J. W. S.** (2000). Requirements for mini-exon inclusion in potato invertase mRNAs provides evidence for exon-scanning interactions in plants. *RNA* 6: 422 – 433.
- Singh M. B. and Knox R. B.** (1984). Invertases of *Lilium* Pollen. *Plant Physiol.* 74: 5410 – 515.
- Singh S., Letham D. S. and Palni L. M. S.** (1992). Cytokinin biochemistry in relation to leaf senescence. VII. Endogenous Cytokinin levels and exogenous applications of cytokinins in relation to sequential leaf senescence in tobacco. *Physiol. Plant.* 86: 388 – 397.
- Sinha A. K., Hofmann M. G., Römer U., Köckenberger W., Elling L. and Roitsch T.** (2002). Metabolizable and Non-Metabolizable Sugars Activate Different Signal Transduction Pathways in Tomato. *Plant Physiol.* 128: 1480 – 1489.
- Sivitz A. B., Reinders A., Johnson M. E., Krentz A. D., Grof C. P. L., Perroux J. M. and Ward J. M.** (2007). Arabidopsis Sucrose Transporter AtSUC9. High-Affinity Transport Activity, Intragenic Control of Expression, and Early Flowering Mutant Phenotype. *Plant Physiol.* 143: 188 – 198.
- Smart C. M., Scofield S. R., Bevan M. W. and Dyer T. A.** (1991). Delayed Leaf Senescence in Tobacco Plants Transformed with *tmr*, a Gene for Cytokinin Production in *Agrobacterium*. *Plant Cell* 3: 647 – 656.
- Sonnewald U., Brauer M., von Schaewen A., Stitt M. and Willmitzer L.** (1991). Transgenic tobacco plants expressing yeast-derived invertase in either the cytosol, vacuole or apoplast: a powerful tool for studying sucrose metabolism and sink/source interactions. *Plant J.* 1: 95 – 106.
- Spiliotis M., Lechner S., Tappe D., Scheller C., Krohne G. and Brehm K.** (2008). Transient transfection of *Echinococcus multilocularis* primary cells and complete *in vitro* regeneration of metacystode vesicles. *Int. J. Parasitol.* In press.
- Sprenger N. and Keller F.** (2000). Allocation of raffinose family oligosaccharides to transport and storage pools in *Ajuga reptans*: the roles of two distinct galactinol synthases. *Plant J.* 21: 249 – 258.

- Springer N. M., Napoli C. A., Selinger D. A., Pandey R., Cone K. C., Chandler V. L., Kaepler H. F. and Kaepler S. M.** (2003). Comparative Analysis of SET Domain Proteins in Maize and *Arabidopsis* Reveals Multiple Duplications Preceding the Divergence of Monocots and Dicots. *Plant Physiol.* 132: 907 – 925.
- Stadler R., Truernit E., Gahertz M. and Sauer N.** (1999). The AtSUC1 sucrose carrier may represent the osmotic driving force for anther dehiscence and pollen tube growth in *Arabidopsis*. *Plant J.* 19: 269 – 278.
- Stålberg K., Ellerström M., Sjö Dahl S., Ezcurra I., Wycliffe P. and Rask L.** (1998). Heterologous and homologous transgenic expression directed by a 2S seed storage promoter of *Brassica napus*. *Transg. Res.* 7: 165 – 172.
- Stead A. D.** (1992). Pollination-induced flower senescence: a review. *Plant Growth Reg.* 11: 13 – 20.
- Stephenson A. G., Travers S. E., Mena-Ali J. L. and Winsor J. A.** (2003). Pollen performance before and during the autotrophic-heterotrophic transition of pollen tube growth. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 358: 1009 – 1018.
- Stieglitz H.** (1977). Role of β -1,3-Glucanase in Postmeiotic Microspore Release. *Dev. Biol.* 57: 87 – 97.
- Sturm A., Hess D., Lee H. S. and Lienhard S.** (1999). Neutral invertase is a novel type of sucrose-cleaving enzyme. *Physiol. Plant.* 107: 159 – 165.
- Swartzberg D., Dai N., Gan S., Amasino R. and Granot D.** (2006). Effects of Cytokinin Production under Two SAG Promoters on Senescence and Development of Tomato Plants. *Plant Biol.* 8: 579 – 586.
- Synek L., Schlager N., Eliáš M., Quentin M., Hauser M.-T. and Žárský V.** (2006). AtEXO70A1, a member of a family of putative exocyst subunits specifically expanded in land plants, is important for polar growth and plant development. *Plant J.* 48: 54 – 72.
- Tadege M. and Kuhlemeier C.** (1997). Aerobic fermentation during tobacco pollen development. *Plant Mol. Biol.* 35: 343 – 354.
- Takaiwa F., Oono K. and Kato A.** (1991). Analysis of the 5' flanking region responsible for the endosperm-specific expression of a rice glutelin chimeric gene in transgenic tobacco. *Plant Mol. Biol.* 16: 49 – 58.

- Takeda T., Amano K., Ohto M.-A., Nakamura K., Sato S., Kato T., Tabata S. and Ueguchi C.** (2006). RNA interference of the *Arabidopsis* putative transcription factor *TCP16* gene results in abortion of early pollen development. *Plant Mol. Biol.* 61: 165 – 177.
- Tang W., Kelley D., Ezcurra I., Cotter R. and McCormick S.** (2004). LeSTIG1, an extracellular binding partner for the pollen receptor kinases LePRK1 and LePRK2, promotes pollen tube growth *in vitro*. *Plant J.* 39: 343 – 353.
- Tang X., Gomes A. M. T. R., Bhatia A and Woodson W. R.** (1994). Pistil-Specific and Ethylene-Regulated Expression of 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylate Oxidase Genes in Petunia Flowers. *Plant Cell* 6: 1227 – 1239.
- Taylor L. P. and Hepler P. K.** (1997). Pollen Germination And Tube Growth. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48: 461 – 491.
- Thelander M., Nilsson A., Olsson T., Johansson M., Girod P.-A., Schaefer D. G., Zryd J.-P. and Ronne H.** (2007). The moss genes PpSKI1 and PpSKI2 encode nuclear SnRK1 interacting proteins with homologues in vascular plants. *Plant Mol. Biol.* 64: 559 – 573.
- Thévenot C., Simond-Côte E., Reyss A., Manicacci D., Trouverie J., Le Guilloux M., Ginhoux V., Sidicina F. and Prioul J.-L.** (2005). QTLs for enzyme activities and soluble carbohydrates involved in starch accumulation during grain filling in maize. *J. Exp. Bot.* 56: 945 – 958.
- Thoma I., Loeffler C., Sinha A. K., Gupta M., Krischke M., Steffan B., Roitsch T. und Mueller M. J.** (2003). Cyclopentenone isoprostanes induced by reactive oxygen species trigger defense gene activation and phytoalexin accumulation in plants. *Plant J.* 34: 363 – 375.
- Thomas S. G., Rieu I. and Steber C. M.** (2005). Gibberellin metabolism and signaling. *Vitam. Horm.* 72: 289 – 338.
- Trouverie J., Chateau-Joubert S., Thévenot C., Jacquemot M. P. and Prioul J. L.** (2004). Regulation of vacuolar invertase by abscisic acid or glucose in leaves and roots from maize plantlets. *Planta* 219: 894 – 905.
- Trouverie J., Thévenot C., Rocher J.-P., Sotta B. and Prioul J.-L.** (2003). The role of abscisic acid in the response of a specific vacuolar invertase to water stress in the adult maize leaf. *J. Exp. Bot.* 54: 2177 – 2186.

- Tsuchiya T., Toriyama K., Ejiri S.-I. and Hinata K.** (1994). Molecular characterization of rice genes specifically expressed in the anther tapetum. *Plant Mol. Biol.* 26: 1737 – 1746.
- Tsukamoto Y. and Matsubara S.** (1968). Studies on germination of chrysanthemum pollen I. Effect of sugars on germination. *Plant Cell Physiol.* 9: 227 – 235.
- Tymowska-Lalanne Z. and Kreis M.** (1998). Expression of the *Arabidopsis thaliana* invertase gene family. *Planta* 207: 259 – 265.
- Van Aelst A. C., Pierson E. S., Van Went J. L. and Cresti M.** (1993). Ultrastructural changes of *Arabidopsis thaliana* pollen during final maturation and rehydration. *Zygote* 1: 173 – 179.
- Van Blokland R., van der Geest N., Mol J. N. M. and Kooter J. M.** (1994). Transgene-mediated suppression of chalcone synthase expression in *Petunia hybrida* results from an increase in RNA turnover. *Plant J.* 6: 861 – 877.
- Van den Ende W., Clerens S., Vergauwen R., van Riet L., van Laere A., Yoshida M. and Kawakami A.** (2003a). Fructan 1-Exohydrolases. β -(2,1)-Trimmers during Graminan Biosynthesis in Stems of Wheat? Purification, Characterization, Mass Mapping, and Cloning of Two Fructan 1-Exohydrolase Isoforms. *Plant Physiol.* 131: 621 – 631.
- Van den Ende W., De Coninck B., Clerens S., Vergauwen R. and Van Laere A.** (2003b). Unexpected presence of fructan 6exohydrolases (6-FEHs) in non-fructan plants: characterization, cloning, mass mapping and functional analysis of a novel 'cell-wall Invertase-like' specific 6-FEH from sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Plant J.* 36: 697 – 710.
- Van den Ende W., de Coninck B. and van Laere A.** (2004). Plant fructan exohydrolases: a role in signaling and defense? *Trends Plant Sci.* 9: 523 – 528.
- Van den Ende W., Michiels A., De Roover J., Verhaert P. and Van Laere A.** (2000). Cloning and functional analysis of chicory root fructan 1-exohydrolase I (1-FEH I): a vacuolar enzyme derived from a cell-wall Invertase ancestor? Mass fingerprint of the 1-FEH I enzyme. *Plant J.* 24: 447 – 456.
- Van Dijken A. J. H., Schluepmann H. and Smeekens S. C. M.** (2004). *Arabidopsis* Trehalose-6-Phosphate Synthase 1 Is Essential for Normal Vegetative Growth and Transition to Flowering. *Plant Physiol.* 135: 969 – 977.
- Van Doorn W. G.** (1997). Effects of pollination on floral attraction and longevity. *J. Exp. Bot.* 48: 1615 – 1622.

- Vargas W. A., Pontis H. G. and Salerno G. L.** (2007). Differential expression of alkaline and neutral invertases in response to environmental stresses: characterization of an alkaline isoform as a stress-response enzyme in wheat leaves. *Planta* 226: 1535 – 1545.
- Vargas W., Cumino A. and Salerno G. L.** (2003). Cyanobacterial alkaline/neutral invertases. Origin of sucrose hydrolysis in the plant cytosol? *Planta* 216: 951 – 960.
- Voegele R. T., Wirsel S., Möll U., Lechner M. and Mendgen K.** (2006). Cloning and Characterization of a Novel Invertase from the Obligate Biotroph *Uromyces fabae* and Analysis of Expression Patterns of Host and Pathogen Invertases in the Course of Infection. *M.P.M.I.* 19: 625 – 634.
- Von Besser K., Frank A. C., Johnson M. A. and Preuss D.** (2006). *Arabidopsis HAP2 (GCS1)* is a sperm-specific gene required for pollen tube guidance and fertilization. *Dev.* 133: 4761 – 4769.
- Von Schaewen A., Stitt M., Schmidt R., Sonnewald U. and Willmitzer L.** (1990). Expression of a yeast-derived Invertase in the cell wall of tobacco and *Arabidopsis* plants leads to accumulation of carbohydrate and inhibition of photosynthesis and strongly influences growth and phenotype of transgenic tobacco plants. *EMBO J.* 8: 3033 – 3044.
- Walia H., Wilson C., Condamine P., Liu X., Ismail A. M. und Close T. J.** (2007). Large-scale expression profiling and physiological characterization of jasmonic acid-mediated adaptation of barley to salinity stress. *Plant, Cell and Environ.* 30: 410 – 421.
- Walters D. R. and McRoberts N.** (2006). Plants and biotrophs: a pivotal role for cytokinins? *Trends Plant Sci.* 11: 581 – 586.
- Wang L. T., Wang A. Y., Hsieh C. W., Chen C. Y. and Sung H. Y.** (2005). Vacuolar Invertases in Sweet Potato: Molecular Cloning, Characterization, and Analysis of Gene Expression. *J. Agric. Food Chem.* 53: 3672 – 3678.
- Weber H., Borisjuk L., Heim U., Buchner P. and Wobus U.** (1995). Seed Coat-Associated Invertases of Fava Bean Control Both Unloading and Storage Functions: Cloning of cDNAs and Cell Type-Specific Expression. *Plant Cell* 7: 1835 – 1846.
- Weil M., Krausgrill S., Schuster A. and Rausch T.** (1994). A 17-kDa *Nicotiana tabacum* cell-wall peptide acts as an in-vitro inhibitor of the cell-wall isoforms of acid Invertase. *Planta* 193: 438 – 445.

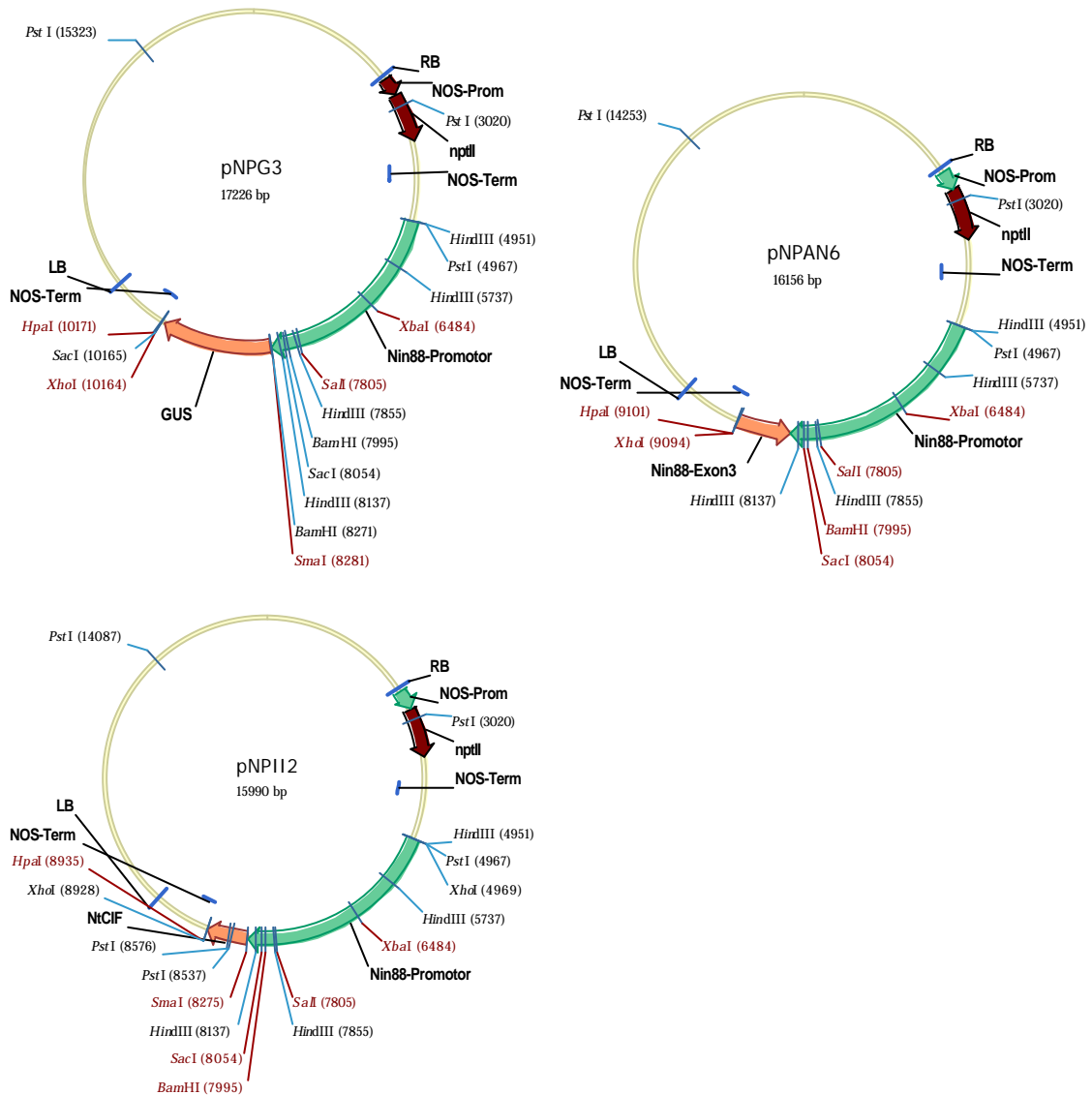
- Weil M. and Rausch T.** (1990). Cell Wall Invertase in Tobacco Crown Gall Cells. *Plant Physiol.* 94: 1575 – 1581.
- Weising K., Schell J. and Kahl G.** (1988). Foreign genes in plants: Transfer, structure, expression, and applications. *Annu. Rev. Genet.* 22: 421 – 477.
- Weschke W., Panitz R., Gubatz S., Wang Q., Radchuk R., Weber H. and Wobus U.** (2003). The role of invertases and hexose transporters in controlling sugar ratios in maternal and filial tissues of barley caryopses during early development. *Plant J.* 33: 395 – 411.
- Weterings K. and Russell S. D.** (2004). Experimental Analysis of the Fertilization Process. *Plant Cell* 16 (Suppl.): S107 – S118.
- Wiese A., Elzinga N., Wobbes B. and Smeekens S.** (2005). Sucrose-induced translational repression of plant bZIP-type transcription factors. *Biochem. Soc. Trans.* 33: 272 – 275.
- Wingler A., Fritzius T., Wiemken A., Boller T. and Aeschbacher R. A.** (2000). Trehalose Induces the ADP-Glucose Pyrophosphorylase Gene, *ApL3*, and Starch Synthesis in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 124: 105 – 114.
- Wobus U. and Weber H.** (1999). Sugars as Signal Molecules in Plant Seed Development. *Biol. Chem.* 380: 937 – 944.
- Wu H., de Graaf B., Mariani C. and Cheung A. Y.** (2001). Hydroxyproline-rich glycoproteins in plant reproductive tissues: structure, functions and regulation. *Cell. Mol. Life Sci.* 58: 1418 – 1429.
- Wu H.-M. and Cheung A. Y.** (2000). Programmed cell death in plant reproduction. *Plant Mol. Biol.* 44: 267 – 281.
- Wu H.-M., Wang H. and Cheung A. Y.** (1995). A Pollen Tube Growth Stimulatory Glycoprotein Is Deglycosylated by Pollen Tubes and Displays a Glycosylation Gradient in the Flower. *Cell* 82: 395 – 403.
- Wu L. L., Mitchell J. P., Cohn N. S. and Kaufman P. B.** (1993). Gibberellin (GA_3) enhances cell wall Invertase activity and mRNA levels in elongating dwarf pea (*Pisum sativum*) shoots. *Int. J. Plant Sci.* 154: 280 – 289.
- Xu H., Davies S. P., Kwan B. Y. H., O'Brien A. P., Singh M. and Knox R. B.** (1993). Haploid and diploid expression of a *Brassica campestris* anther-specific gene promoter in *Arabidopsis* and tobacco. *Mol. Gen. Genet.* 239: 58 – 65.

- Yamada S., Nelson D. E., Ley E. Marquez S. and Bohnert H. J.** (1997). The Expression of an Aquaporin Promoter from *Mesembryanthemum crystallinum* in Tobacco. *Plant Cell Physiol.* 38: 1326 – 1332.
- Yang J., Zhang J., Wang Z., Zhu Q. and Liu L.** (2004). Activities of fructan- and sucrose-metabolizing enzymes in wheat stems subjected to water stress during grain filling. *Planta* 220: 331 – 343.
- Ylstra B., Garrido D., Busscher J. and van Tunen A. J.** (1998). Hexose Transport in Growing Petunia Pollen Tubes and Characterization of a Pollen-Specific, Putative Monosaccharide Transporter. *Plant Physiol.* 118: 297 – 304.
- Yu J. Q., Huang L. F., Hu W. H., Zhou Y. H., Mao W. H., Ye S. F. and Nogués S.** (2004). A role for brassinosteroids in the regulation of photosynthesis in *Cucumis sativus*. *J. Exp. Bot.* 55: 1135 – 1143.
- Zhang L., Cohn N. S. und Mitchell J. P.** (1996). Induction of a Pea Cell-Wall Invertase Gene by Wounding and Its Localized Expression in Phloem. *Plant Physiol.* 112: 1111 – 1117.
- Zeng Y., Wu Y., Avigne W. T. and Koch K. E.** (1999). Rapid Repression of Maize Invertases by Low Oxygen. Invertase/Sucrose Synthase Balance, Sugar Signaling Potential, and Seedling Survival. *Plant Physiol.* 121: 599 – 608.
- Zhang D. P., Lu Y. M., Wang Y. Z., Duan C. Q. and Yan H. Y.** (2001). Acid Invertase is predominantly localized to cell walls of both the practically symplasmically isolated sieve element/companion cell complex and parenchyma cells in developing apple fruits. *Plant, Cell & Environ.* 24: 691 – 702.
- Zhang X.-Y., Wang X.-L., Wang X.-F., Xia G.-H., Pan Q.-H., Fan R.-C., Wu F.-Q., Yu X.-C. and Zhang D.-P.** (2006). A Shift of Phloem Unloading from Symplasmic to Apoplasmic Pathway Is Involved in Developmental Onset of Ripening in Grape Berry. *Plant Physiol.* 142: 220 – 232.
- Zhang Y., Shewry P. R., Jones H., Barcelo P., Lazzari P. A. and Halford N. G.** (2001). Expression of antisense SnRK1 protein kinase sequence causes abnormal pollen development and male sterility in transgenic barley. *Plant J.* 28: 431 – 441.
- Zhang Z.-B., Zhu J., Gao J.-F., Wang C., Li H., Li H., Zhang H.-Q., Zhang S., Wang D.-M., Wang Q.-X., Huang H., Xia H.-J. and Yang Z.-N.** (2007). Transcription factor *AtMYB103* is required for anther development by regulating tapetum development, callose dissolution and exine formation in *Arabidopsis*. *Plant J.* 52: 528 – 538.

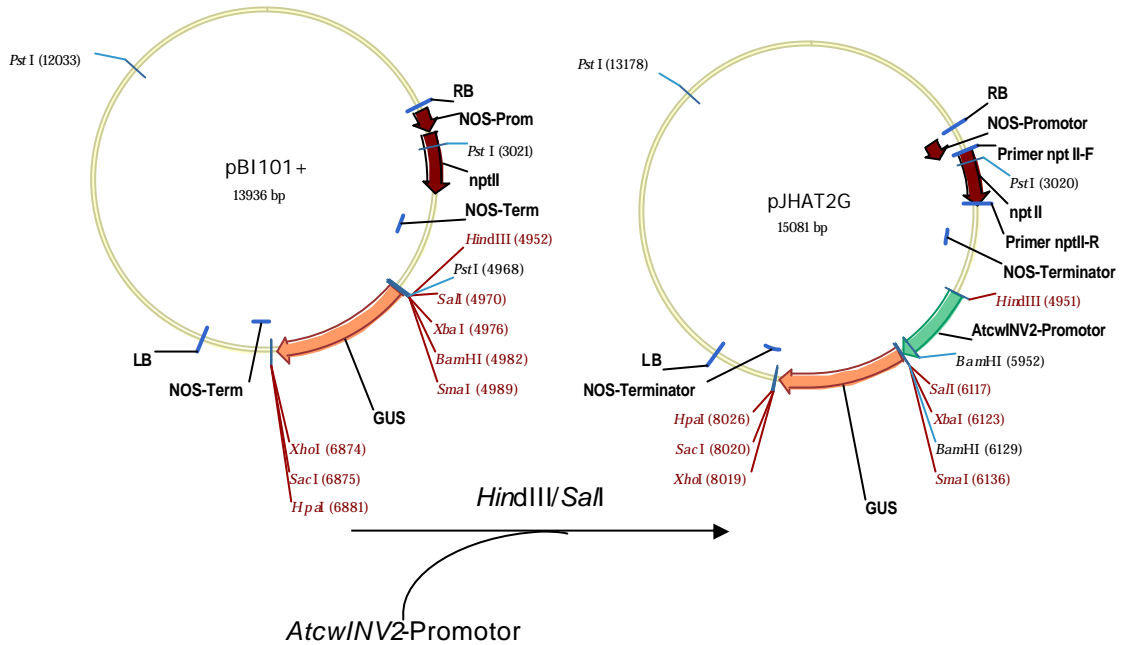
- Zimmermann P., Hennig L. and Gruissem W.** (2005). Gene-expression analysis and network discovery using Genevestigator. *Trends Plant Sci.* 10: 407 – 409.
- Zinkl G. M., Zwiebel B. I., Grier D. G. and Preuss D.** (1999). Pollen-stigma adhesion in *Arabidopsis*: a species-specific interaction mediated by lipophilic molecules in the pollen exine. *Dev.* 126: 5431 – 5440.
- Zinselmeier C., Westgate M. E., Schussler J. R. and Jones R. J.** (1995). Low Water Potential Disrupts Carbohydrate Metabolism in Maize (*Zea mays* L.) Ovaries. *Plant Physiol.* 107: 385 – 391.
- Zrenner R., Schüler K. and Sonnewald U.** (1996). Soluble acid Invertase determines the hexose-to-sucrose ratio in cold-stored potato tubers. *Planta* 198: 246 – 252.
- Zuo J. and Chua N.-H.** (2000). Chemical-inducible systems for regulated expression of plant genes. *Curr. Opin. Biotechnol.* 11: 146 – 151.

6 Anhang

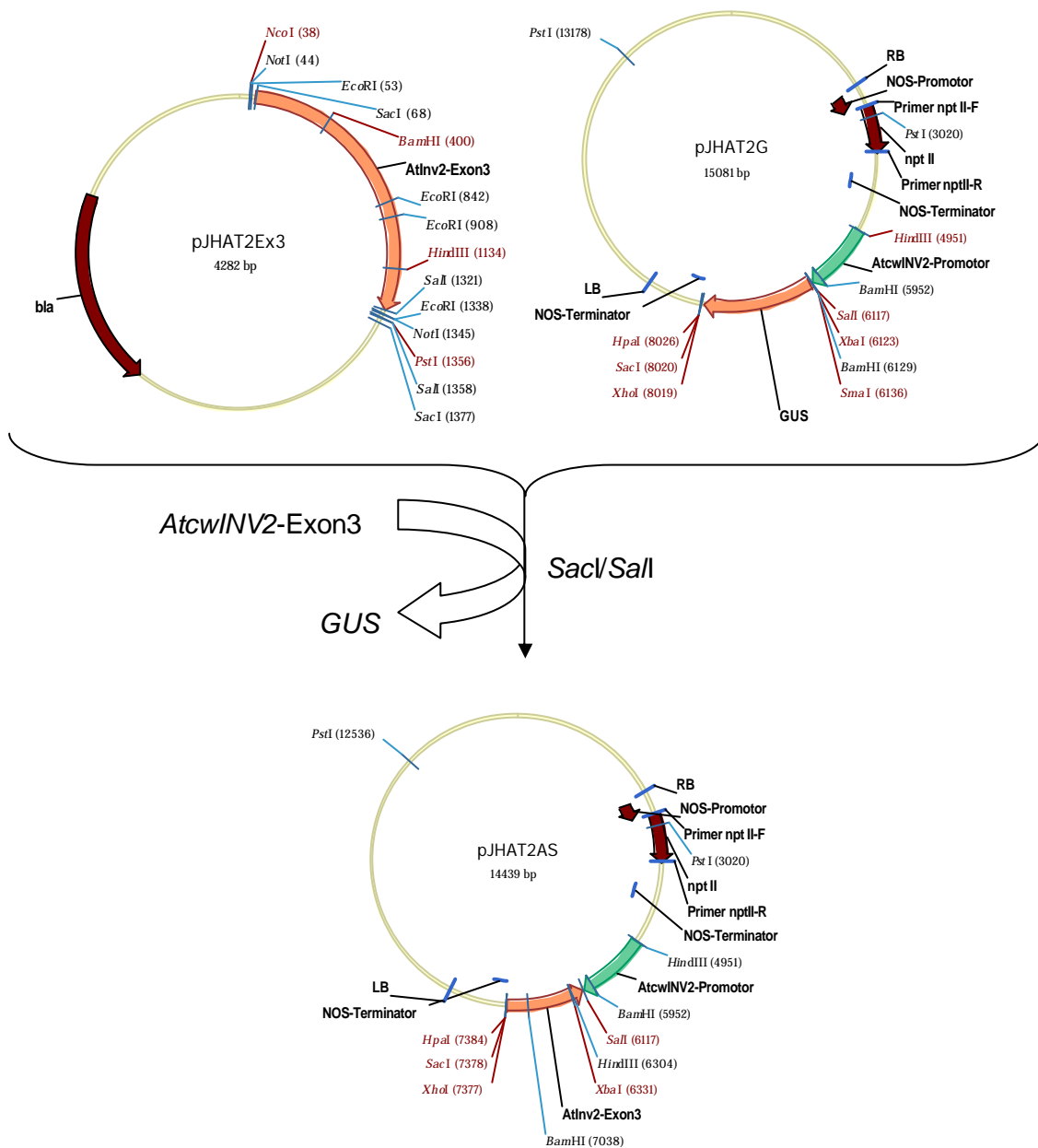
6.1 Übersicht der bereits von Goetz (2001) hergestellten Vektoren zur Erzeugung transgener *A. thaliana*:



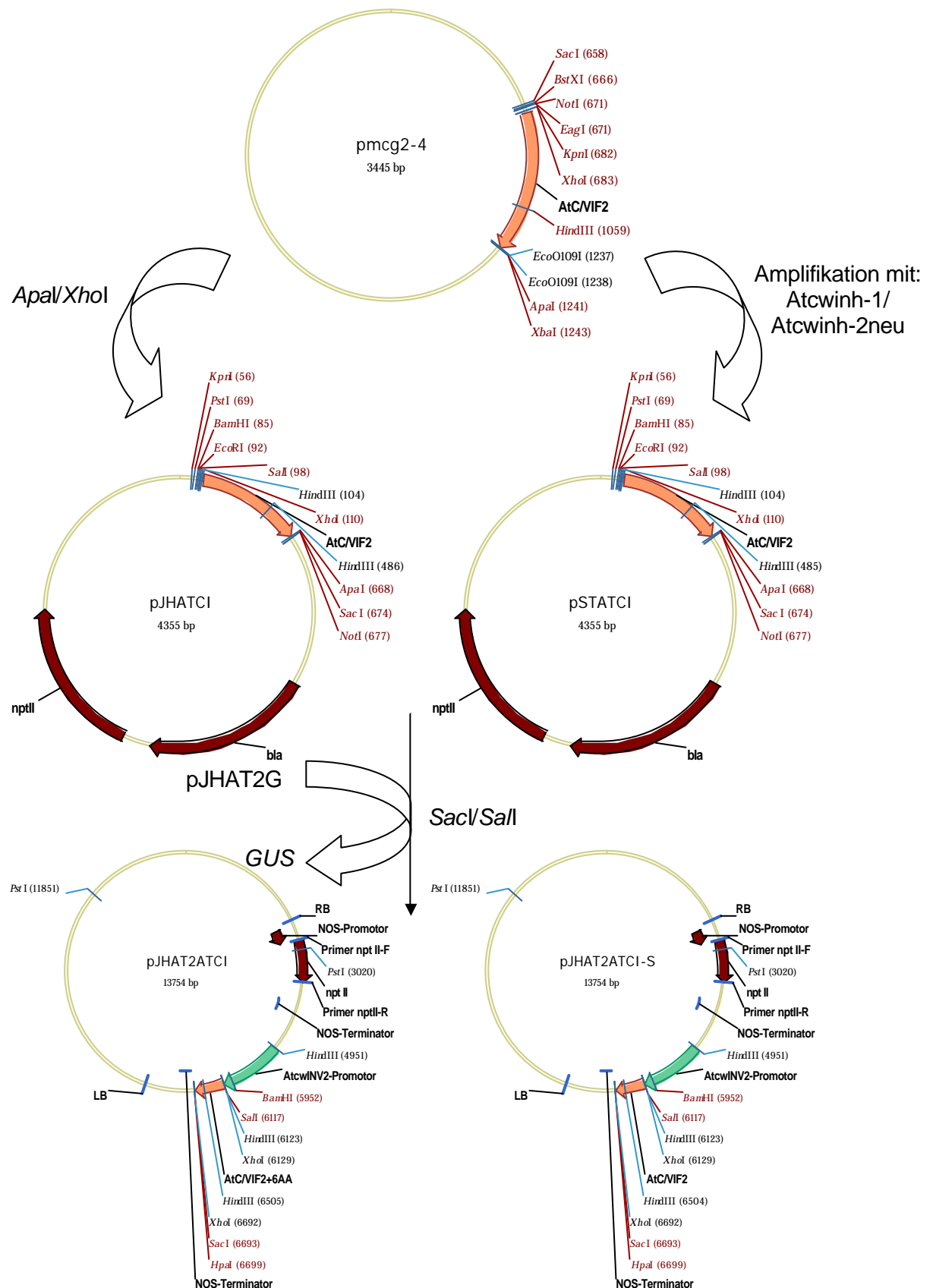
6.2 Schematische Darstellung der Klonierung des *Atcw/INV2*-Promotors in den binären Vektor pBI101+.



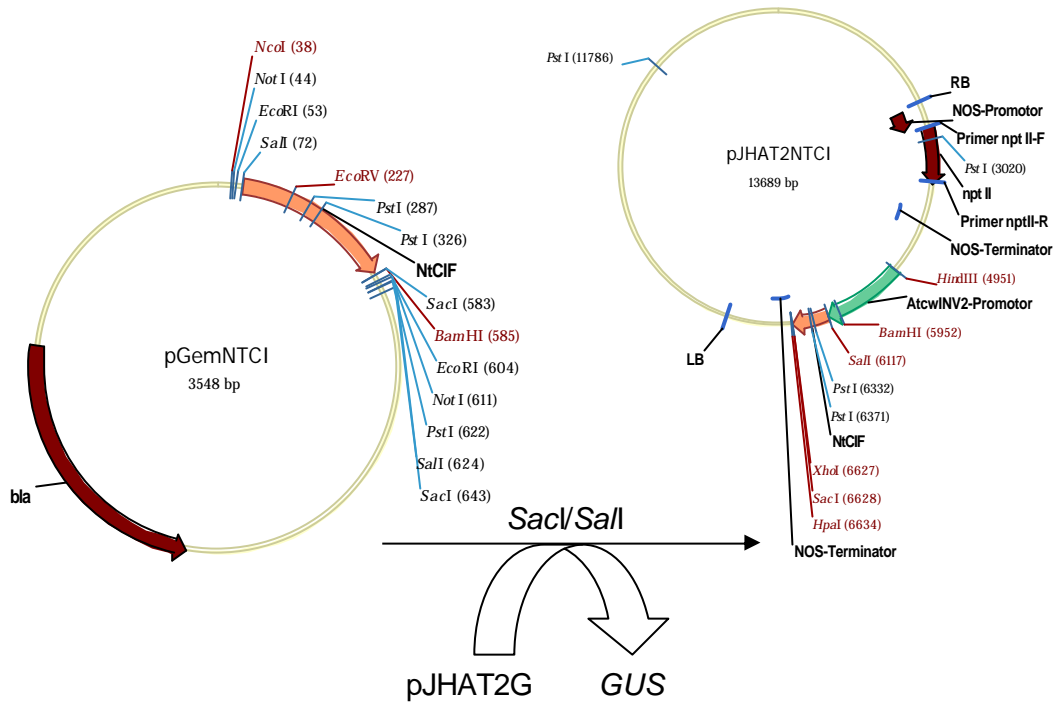
6.3 Schematische Darstellung der Klonierung des Konstrukts *AtcwINV2::AtcwINV2-Antisense* in den Hintergrund des binären Vektors pBI101+.



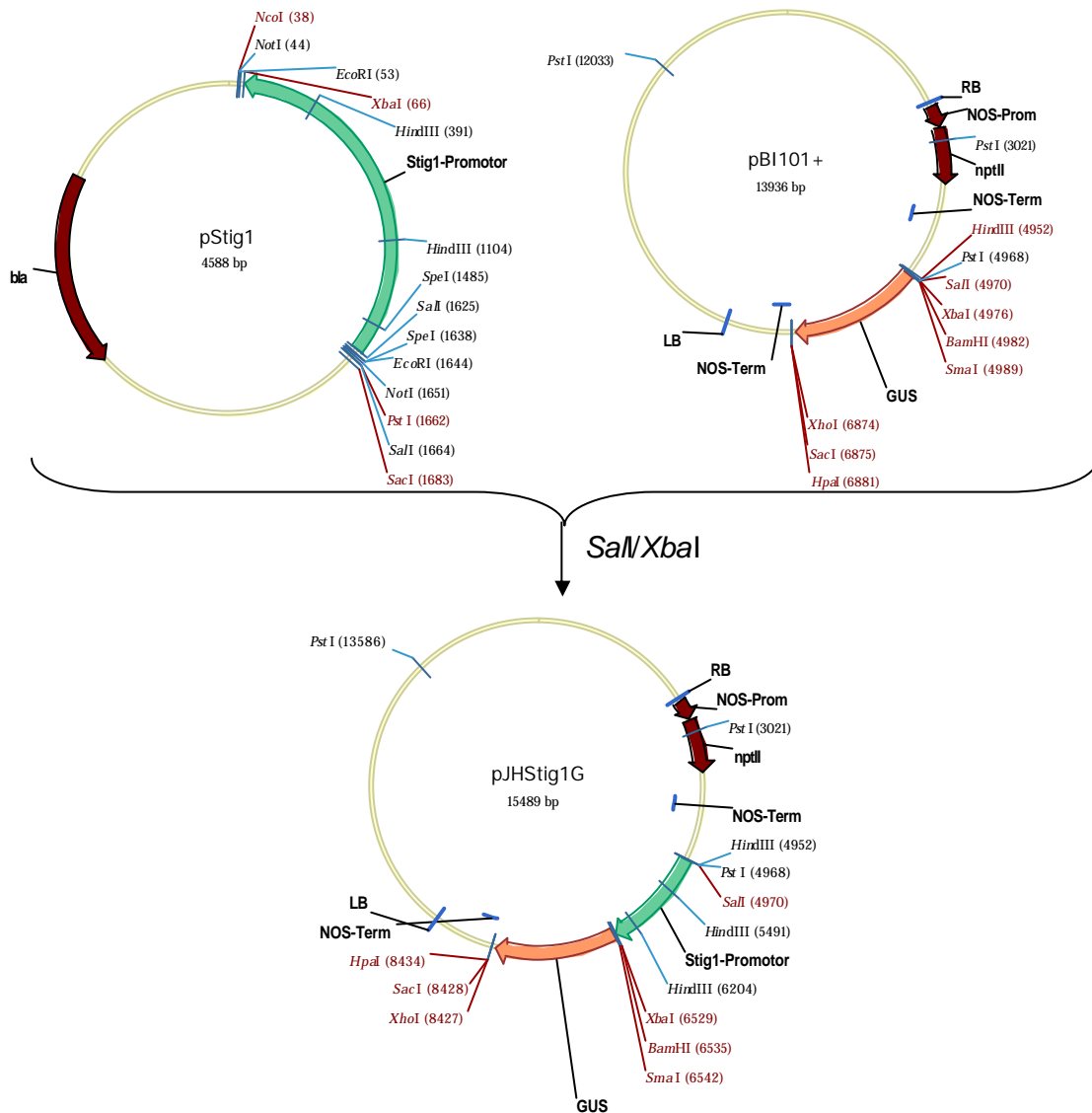
6.4 Schematische Darstellung der Klonierung der Konstrukte *AtcwINV2::AtC/VIF2+6AA* und *AtcwINV2::AtC/VIF2* in den Hintergrund des binären Vektors pBI101+.



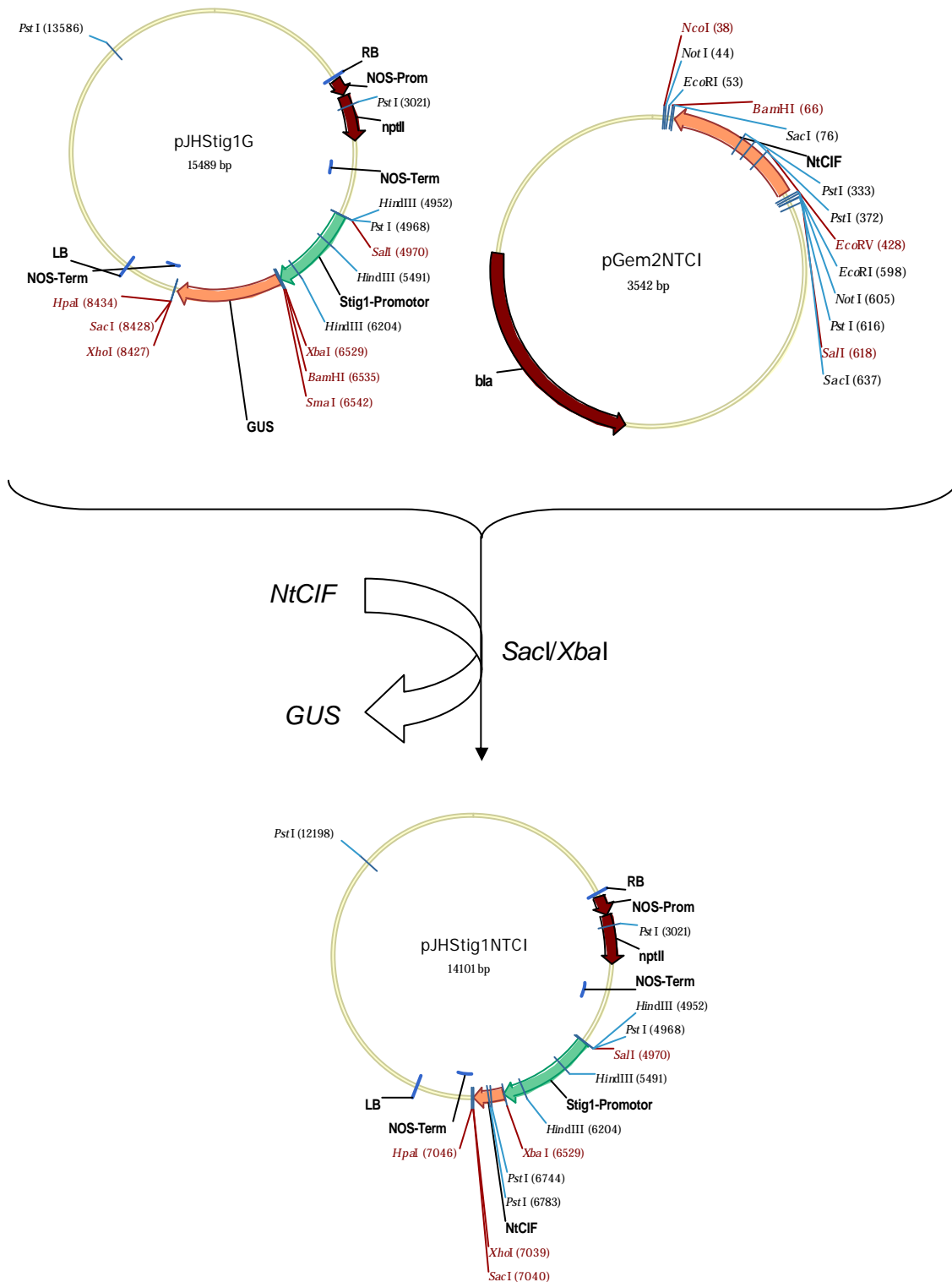
6.5 Schematische Darstellung der Klonierung des Konstrukts *AtcwINV2::NtCIF* in den Hintergrund des binären Vektors pBI1101+.



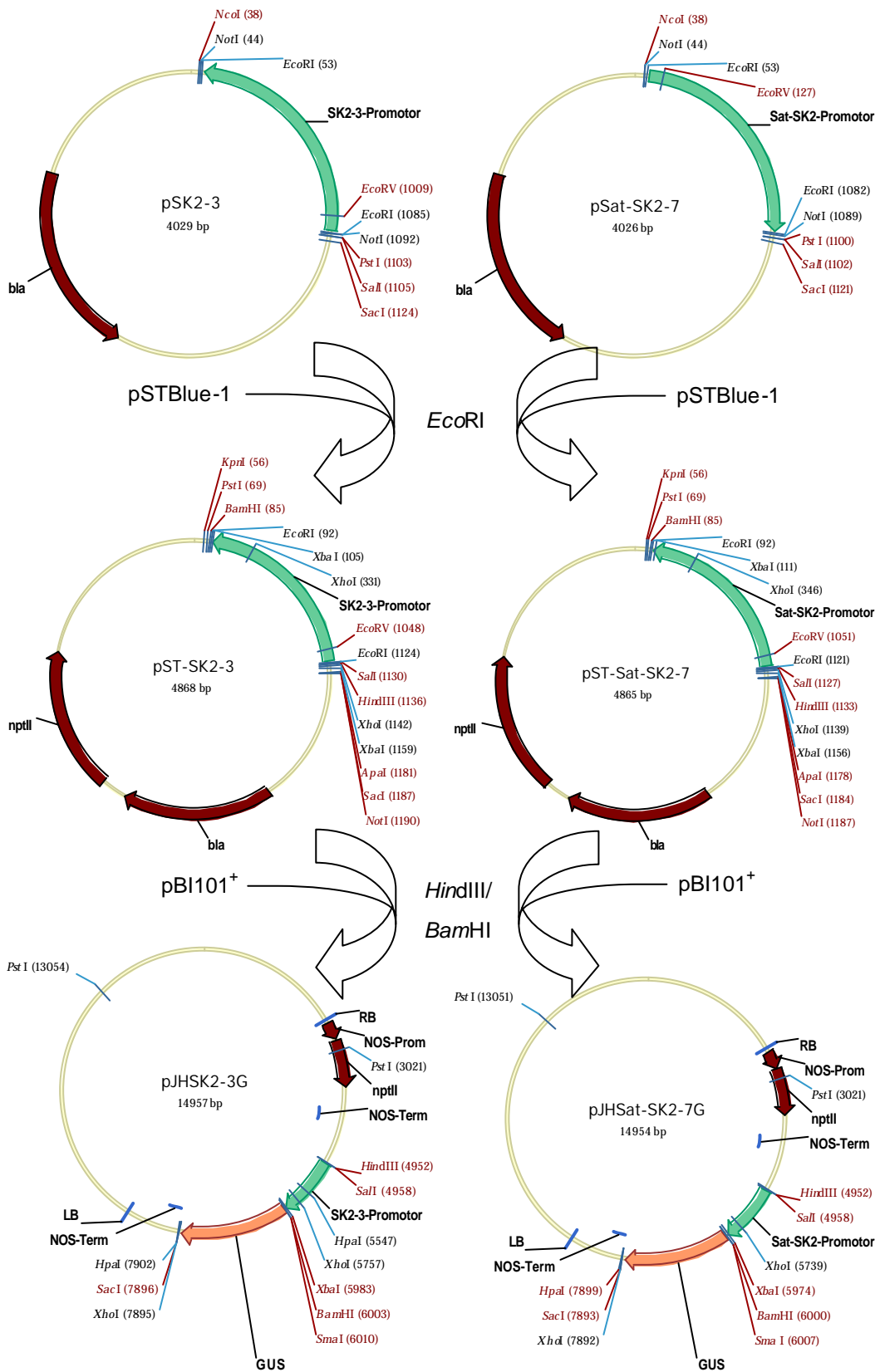
6.6 Schematische Darstellung der Klonierung des Reporterkonstrukts *STIG1::GUS* in den binären Vektor pBI101+.



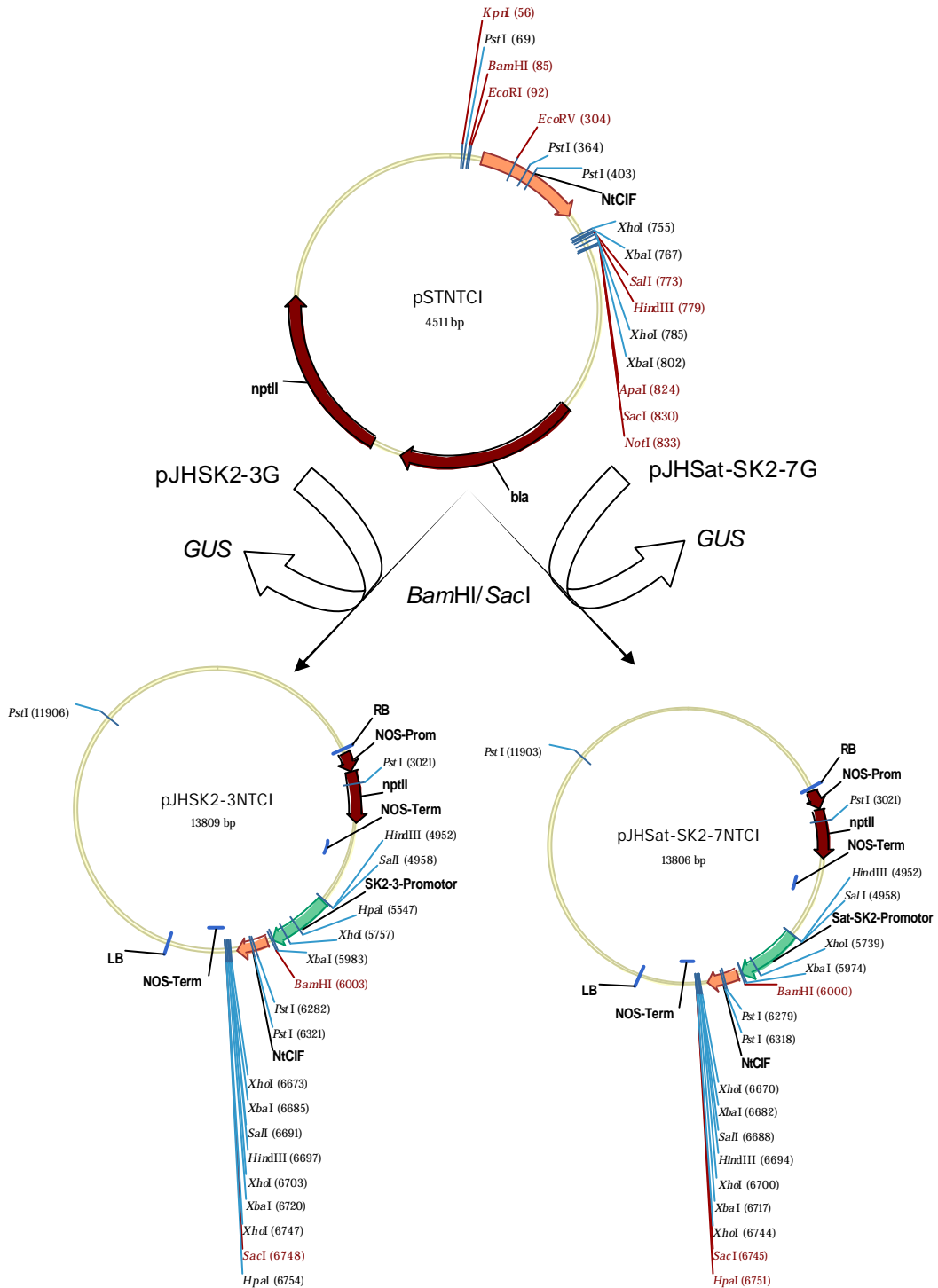
6.7 Schematische Darstellung der Klonierung des Konstrukts *STIG1::NtCIF* in den binären Vektor pBI101+.



6.8 Schematische Darstellung der Klonierung der Konstrukte *SK2-3::GUS* und *Sat-SK2-7::GUS* in den binären Vektor *pBI101+*.



6.9 Schematische Darstellung der Klonierungsstrategie der Konstrukte *SK2-3::NtCIF* und *Sat-SK2-7::NtCIF*.



6.10 Expressionsprofile aller cw- und vac-INV's aus *Arabidopsis*

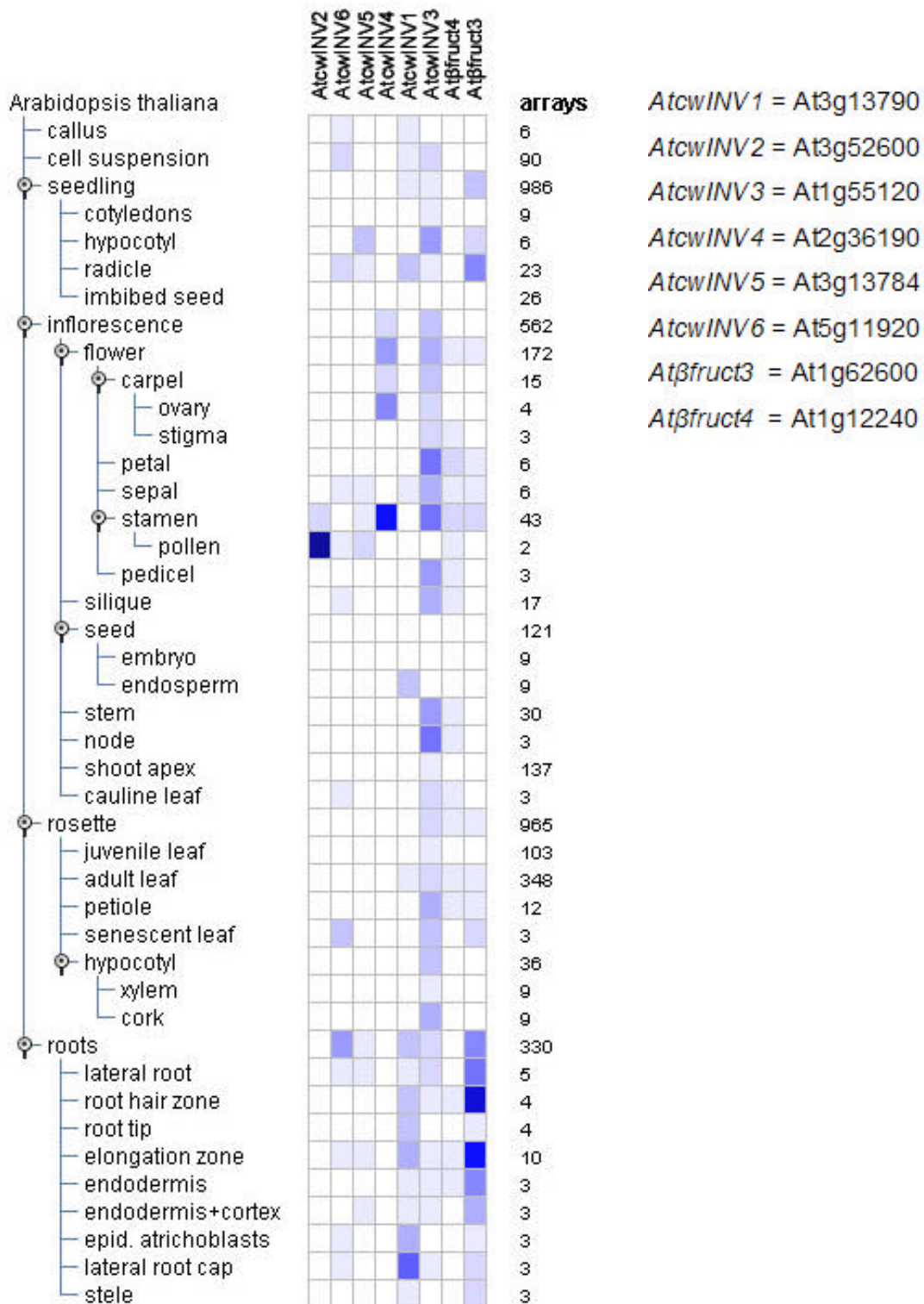


Abbildung 6-1: *In silico*-Expressionsanalyse der Invertasenfamilie aus *Arabidopsis* mit Hilfe des Tools „genevestigator“ (Zimmermann *et al.*, 2005).

6.11 DNA-Sequenzen

BncwINV1 :

```

1   GACCCATCCA CTGCTTGGCT AGGCCAAGAC AAGAAATGGA GAGTGATTAT
51  CGGAAGCAAG ATTCACCGTC GTGGACTAGC CATCACTTAC ACGAGTAAAG
101 ACTTTCTAAA ATGGGGAAAA TCTCCAGAGC CGTCGCATTA CGACGACGGA
151 AGTGGAAATGT GGAATGTCC TGATTTTTTTC CCGGTCACGA GGTTCGGTTC
201 TAACGGCGTG  GAAACGTCTT CGTTTGGTGA ACCTAATGAG ATTTTGAAGC
251 ACGTGTTGAA  AATAAGTTTG GACGACACGA AACATGATTA TAACACGATT
301 GGTACGTACG  ATCGGGTTAA AGATAAATTC GTACCGGACA ATGGTTTCAA
351 GATGGACGGT  ACGGCTCCGA GATACGATAC GGAAAGTATT ACGCGTCCAA
401 AACATTCTAT  GA

```

BncwINV2a :

```

1   CCTTCACCTG TTCTACCAGT ACAATCCCAA AGGTGCGGTT TGGGGTAACA
51  TTGTGTGGGC TCATTCAGTT TCTAAGGACT TGATCAATTG GGAAGCTCTT
101 GAACCGGCTA TTTACCCCTC CAAATGGTTT GATATCAATG GTACATGGTC
151 CGGTTCAGCC ACCAACGTAC CGGGAAAAGG ACCGGTTATC CTCTACTG
201 GTATCACCGA GAACCATACT CAGATCCAAA ATTATGCCAT TCCCCAAGAC
251 CTTTCCGACC CATACTCAA GAAATGGATC AAGCCCAGC ACAACCCTAT
301 CGTAAGACCC GACCATGGCG AGAATGGATC CGCTTCCGT GACCCGACAA
351 CTGCTTGGTT CAACAAAAAA GATGGGCACT GGAGAATGCT TGTGGGCTCA
401 AAGAACAAGC GTAGAGGAAT TGCTTATATG TACAAAAGTC GTGACTTCAA
451 GAAATGGGTC AAAACTAGAC GTCCCGTACA CACTAGAAAA GCAACCGGTA
501 TGTGGGAATG TCCCGACTTT TTCCCGGTTT CCATCGGCAA GAAAACCGGT
551 TTAGACACCA GCTATGACGG TCCAAACACC AAGCATGTGT TGAAGGTTAG
601 CTTGGACCTG ACCAGGTACG AGTACTACAC TCTTGGAACG TATGATACTA
651 AGAAGGATCG TTACAAGCCT GATGGTACCA CTCCTGATGG TTGGGATGGT
701 TTGAGACTAG ATTATGGTAA CTTCTACGCA TCAAAACTT TCTACGAAAG
751 G

```

BncwINV2b :

```

1   GATCCAACAA CGGCTTGGTT CAACAAGGAA GATGGGTATT GGAGAATGCT
51  TGTTGGCTCA AAGAGAAAGA ACAGAGGAAT TGCTTATATG TACAAGAGCC
101 GTGACTTCAA AAAATGGGTC AAAGGCAAAC ATCCTAACCA CTCAAGAAAG
151 AAAACCGGTA TGTGGGAATG TCCCGATTTT TTCCCGGTAT TCGTAACCGA
201 CAAGAAAAAC GGTTCGGACT TCAGCTACGA CGGTCCAAAC GCCAAGCATG
251 TGTTGAAGGT TAGTTTGGAC TTGACCAGAT ACGAGTACTA CACTCTTGGA
301 ACGTATGACA CCAAGAAGGA TCGTTACAGG CCAGACGGTT ACACTCCTGA
351 CGGTTGGGAT GGTTCGAGAT TTGATTATGG TAACTACTAT GCGTCAAAAT
401 CGTTCCTCGA

```

BncwINV3a :

1 CCTTCACTTG TTTTATCAGT ACAATCCATA CGGCGCCGTT TGGGATGTAA
 51 GAATCGTGTG GGGTCACTCC ACGTCACTTG ATCTAGTTAA CTGGACCCCA
 101 CAGCCTCCAG CATTCACTCC ATCTCAGCCG TCAGACATCA ACGGTTGTTG
 151 GTCAGGCTCC GTCACGATTC TACCAAACGG CACACCGGTG ATCCTCTACA
 201 CCGGCATTGA CCAAACAAA AGTCAAGTCC AAAACGTTCG CGTTCCGCTT
 251 AACATCTCCG ATCCATATCT CCGCGAATGG TCAAAGTCGC CGGCAAATCC
 301 TCTGATGGCT CCTAACGCCG TCAACGGAAT CAACCCCGAC CGGTTCCGAG
 351 ACCCGACCAC CGCGTGGCTA GGACACGACG GAGAATGGAG AGTCATCGTC
 401 GGAAGCTCGA CGGACGATCG TCGAGGATTA GCGGTTCTTT ACAAGAGCAG
 451 AGATTTCTTC AACTGGACGC AAGCGACGAA GCCTCTTCAC CACGAAGACT
 501 TAACCGGAAT GTGGGAGTGT CCTGATTTTT TCCCGGTTTC GATAACCGGA
 551 ACGGACGGTC TCGAGACGTC GTCGTTTGGT GAGGTGAAAC ACGTGCTGAA
 601 AGTGAGTTTG ATCGAGACGT TGCATGATTA TTACACGGTT GGGAGTTACG
 651 ACCGTGAGAA GGATGTTTAC GTACCGGATC ATGGGTTTGT GCAAGATGGT
 701 TCGGCTCCGA GGCTGGACTA CGGGAAGTTT TACGCAACCA AAACCTTCTA
 751 CGAAAGG

BncwINV3b :

1 GACCCAACCA CCGCTTGGCT TGGACGTGAC GGAGAATGGC GAGTAATCGT
 51 CGGAAGCTCG ACGGACGATC GACGAGGATT AGCGATTCTT TACAAAAGCA
 101 GAGATTTCTT CAACTGGACG CAATCAATGA AGCCTTTACA TTACGAAGAC
 151 TTAACCGGAA TGTGGGAACG TCCTGATTTT TTCCCGGTTT CGATAACCGG
 201 ATCGGACGGT GTAGAAACGT CGTCGGTTGG TGAGAATGGG ATTAAGCGTG
 251 TGCTTAAAGT GAGTTTGATT GAGACATTGC ATGATTATTA CACGATTGGG
 301 AGTTATGATC GTGAGAAAGA TGTTTACGTA CCGGATCTTG GGTTTGCGCA
 351 AAACGAATCA GCTCCGAGGT TAGATTACGG GAAATATTAC GCGTCCAAGT
 401 CCTTCTACGA

BncwINV4 :

1 GACCCGTCGA CCGCGTGGTA CTCCAAAGAC GGGCATTGGA GAACCGTGGT
 51 AGGGTCAAAA AGAAAGCGTA GAGGAATTGC TTACATCTAC AGAAGCCGAG
 101 ATTTCAAGCA TTGGGTCAAA GCTAAGCACC CGGTTCACTC TAAACAGTCA
 151 ACCGGTATGT GGAATGTCC TGATTTCTTC CCGGTTTCCT TAACCGATTT
 201 CCGAAACGGT TTGGACTTGG ATTACGTCGG TCCAAACACC AAGCATGTGT
 251 TGAAGGTTAG CTTGGACATT ACCCGGTACG AGTATTACAC GCTTGGTAAA
 301 TACGATCTTA AGAAGGACCG GTACATACCG GACGGTAATA CTCCCGATGG
 351 TTGGGAGGGT TTGAGATTCG ATTACGGTAA TTTCTACGCG TCCAAGTCAT
 401 TTTTTCGA

BncwINV6 :

1 CCTTCACTTG TTTTACAATA TAATCCTTTA GCTCCAGAGT TCAGTAGAAG
 51 AATCATATGG GGCCACTCTG TTTTACAAGA CATGGTCAAC TGGATCCAAC
 101 TCCCGCCAGC ACTTTCTCCC TCTGAGTCCT ACGACATCAA CAGCTGCTGG
 151 TCAGGATCCG CTACGATCCT CCCCAGTGGC AAACCTGTGA TCTTGTACAC
 201 CGGAATCGAT AACCAAGAGA GACGGGAAGA CAGACGGCAA GTCACAGTTC
 251 TTGCCGTACC TAAAGATGCT TCCGACCCTT TGCTTCGTGA GTGGATGAAG
 301 CCAAAGCAA ACCCTGTCAT GGATCCATCA GAGGACATCC TTCACTACTG
 351 TTTCCGTGAC CCTACCACTG CATGGCAAGG TCAAGATGGT AAATGGAGAG
 401 TTCTCATAGG AGCTAAGGAG AGAGATACTC TAAGAGGAGT AGCTCTTTTG
 451 TACCATAGTA CTGATGATTG TGAGCAATGG ACTAGGTATC AAGAACCTTT
 501 ACTTGTAGCA CAAGCCAACG AAATGTTGGA GTGCGTTGAC TTTTTCCCGG
 551 TTAAGCTCAT GGGTAAAGAA GGTGTAGATA CTTCGGTGAA CAATGCTAGT
 601 GTGAGGCATG TGTTGAAAGT TAGTTTTGAG GAAGAAGTTG GAGGCAAAGA
 651 TTGTTATGTT ATTGGCTCAT ATTGTTCCGA GACTGATAGA TTTGTCCCGG
 701 ACTCAGAGCT CACTTACACA CGTGCTGATC TGAGATATGA TGATGGATGG
 751 TTTTACGCTA CCAAACCTT CTATGAAAGG

BnBfruct3 :

1 CCTTCACTTT TTCTATCAAT ATAACCCAAA TGCAGCCGTG TGGGGTGACA
 51 TTGTTTGGGG TCACGCAGTG TCTAAAGATC TTATCCATTG GCTTCACCTC
 101 CCGTTTGCAA TGGTTCCTGA CCAATGGTAC GACGCTAACG GTGTTTGGAC
 151 CGGTTCCGGCT ACTTTCCTCG ATGATGGTTC TATTGTCATG CTCTACACTG
 201 GATCCACCGA CAAATTCGTA CAAGTATTAC TTTTTAAAAC CATTCTCTCTG
 251 TTAAATAAGT ATTTGATTCA TAATTCCTTTT GATATGATAT CAATAACTCT
 301 TTTGATATAC TGGTGACAGA TTTATATAAA ACCTTAATTA ATCCTTTAAA
 351 AATCATTTC AATAAGATT TATCGGACCA ATTAGCGATA ATAATATTAG
 401 CTATTATTAT GTTTTTAGGT TCAAACCTT GCCCTATCCT GAGGACCCCA
 451 ATGATCCACT TTTGTTGAAA TGGACCAAGT TCTCTGGCAA CCCGGTTCTC
 501 GAACCGCCTC CAGGTATCGG TGATAAGGAC TTCCGTGACC CAACAAGTGC
 551 GTGGAAGACA TCAGACGGAA AATGGCGGAT CACTATCGGC CCCAAAATCA
 601 ATAGAACCGG AATATCCCTT GTTTATGACA CCGTCGATTT CAAGACCTAC
 651 GAGAAACACG ACATCTTGTT GCACCAAGTC CCAAACACAG GAATGTGGGA
 701 GTGCGTTGAC TTTTATCCGG TGTCAAAGAC TAAGCACCAC GGTCTTGACA
 751 CTTCAGTTAA TGGACCGGAT GTTAGGCATA TAGTGAAAGC TAGCATGGAC
 801 GATACAAGAA TTGACCATTA TGCCATTGGG ACGTACTATG ATTCTAATGG
 851 AACATGGGTC CCGGATAATC CTTCAATTGA TGTGGGATT AGTACCGGTT
 901 TGAGATACGA TTACGGTAAA TTTTACGCAA CAAAACCTTT CTACGAAAGG

Bnβfruct4:

1 GATCCCTCGA CTGCATGGAA GACATCAGCC GGAAAATGGC GGATCACTAT
 51 TGGTTCCAAA ATCAACAGAA CCGGGATCTC ACTCGTGTAC GACACGACTG
 101 ACTTCAAGAC TTACGAGAAA CTCGACACAT TGTTGCACAA AGTTCCAAAC
 151 ACCGGGATGT GGGAGTGTGT TGACTTTTAT CCAGTGTCTA AGACCTTGGT
 201 TAAGGGGCTC GACACATCGG TCAATGGACC AGATGTGAAG CACGTCGTGA
 251 AGGCTAGTAT GGACGACACC AGAATCGACC ATTATGCCAT AGGAACATAT
 301 TTCGATTCGA ACGGGACGTG GATCCCGGAT GATCCTACTA TTGATGTTGG
 351 GATTAGTACT AGTTTAAGAT ATGATTGCGG AAAGTTTTAT GCCTCCAAGT
 401 CCTTTTACGA

Nin11:

1 CCTTCACTTG TTCTACCAGT ACAACCCTTA CGATGCACAA TCCGGAAACA
 51 TAGTCTGGGG ACATTCTACA TCAACTGATC TTATCAACTG GACACCTCAG
 101 CCGCCGGCAC TACTCCGATC AGAGCCTTAT GATTTTAAAG GCTGTTTTTC
 151 AGGTTCTACA ACAATTCTCT CCGGCGGAAA ACCGGCAATT CTCTATACCG
 201 GAGTAGACTT CTCCGATATC CAAGTTCAA ATCTAGCCGT GCCCAAAAAT
 251 TTATTGGACC CTTACCTTAT AGAATGGGTA AAATCACCTT ATAATCCACT
 301 AATAACACCT AATTCAGTGA ATAAAATTGA TGGTCAAAT TTCAGAGACC
 351 CAACTACTGC TTGGGTAAAT CCTACAGATG GTAATTGGAG AATGGTAGTT
 401 GGAAATAAAA AAAATAACAC AGGAATTGGT TTATTGTACA AAAGCAAGAA
 451 TTTTATTGAT TGGATTCAA CTGAACAACC TTTGCATTTT TTAACAATT
 501 CTGGAATGTG GGAATGTCCT GATTTTTTCC CAGTTTCAAC AATTAGTCAA
 551 ATTGGTTTAG ACACTTCAAT TATGGGTCCA AATGTAAAAC ATGTATTCAA
 601 AGTAAGTGTA GCAAATCTG ATTACTATAC AATTGGAATA TATAATCCAA
 651 ATAAGGATAT TTTTGTCCCG GATAATGAAT CCTTGGATAT TGGATTAGGA
 701 TTTAGATATG ATTATGGAAA GTATTACGCA TCCAAACCTT CTTTGAAAGG

Nin52:

1 CCTTCACTTG TTTTATCAGT ATAATCCTAA TGGTGTAATA TGGGGTCCGC
 51 CGGTGTGGGG TCACTCAACC TCAAAGGATC TAGTAAACTG GATGCCACAA
 101 CCATTAACAA TGGAGCCAGA AATGGCAGCC AACATTAATG GAAGTTGGTC
 151 GGGTTCAGCC ACTATACTCC CAGGAAATAA ACCGGCAATT CTCTTTACTG
 201 GACTTGACCC AAATTATGAA CAAGTCCAAG TTTTAGCCTA CCCTAAAGAT
 251 TTAAATGACC CTTATCTTAA AGAATGGTTT TTGGCACCAA AAAATCCAGT
 301 CATGTTCCCT ACCCCACAGA ATCAAATCAA TGCCACCTCG TACCGGGACC
 351 CAACGACAGC GTGGATGCTG CCAGATGGCA ATTGGAGAGT GCTCATTGGA
 401 AGCAAAAGAG GACAGCGTGG ATTGTCCTTA TTATATAGAA GCAGAGATTT
 451 TGTTCAATTG GTTAAAGCTA AACACCCTTT ATATTCTTAT GAACGTAGTG
 501 GCATGTGGGA ATGTCCCGAT TTTTCCCTG TTTATAAAAA CGGTAACACA
 551 ATGGGTATAG ATACGTCTGT AATTGGTCCT AATATTAAGC ATGTAICTAA

601 AGTTAGCTTA GATGTAAGTA AGCATGATGT TTATACAATT GGAGGATATG
 651 ATACTAAGAA GGATGCGTAT ACTCCTGATG TGGGTTTCAT GAACGACTCG
 701 AGTTTAAGGT ATGGTTATGG TAAATATTAC GCATCCAAAA CCTTCTTCGA
 751 AAGG

Nin63:

1 CCTTCACTTG TTTTACCAGT ATAATCCTGA AAGTCCAACA TGGGGAAACT
 51 TAGCTTGGGG TCATTCTACT TCAACTGATC TTGTTAACTG GACTGTTCAT
 101 CCTCCTGCAC TTTTCCCTTC AGATTTCATAT GACATCAATG GTTGTGGTTC
 151 AGGTTCTGCT ACAATTCTCC AAAACGGCAC ACCAGCTATA CTTTACACTG
 201 GTTGTGACTC ACAAGATACT CAACTTCAAA ATCTAGCCAT ACCTAAAGAT
 251 TTATCAGACC CTTATCTTAT CGAATGGATT AAATCGGATC ATAATCCGAT
 301 AATGGTACCT AATCCGGGGG AAGAACTTT GTTTAGGGAC CCGAGCACGG
 351 CGTGGTTAGG CCCTGACGAT GGAATTTGGA GAGTAATCAT AGGGAACGAA
 401 AGAGAAGACA ATGGAAGTGC TCTTTTGTAC AGAAGTAAAG ATTTTATTCA
 451 CTGGACTGAA GCTGAGCGTC CCCTGCATTG GACAAATGAA ACTAGAATGT
 501 GGAATGTCC TGAACTTTTT CCTGTATTAG TGGACGGTAC TGAAAATGGA
 551 GTTGACACTT CAGTGTTTTT TCAAGGGGTT AAATATGTAT TTAAGATTAG
 601 TGTGGCTGGT ACTGGTGTTG ATTATTATAC TATTGGAECT TATGACCATA
 651 TGTATATATT CCAGATGAAG GATTTGTAGA CAATATTGAA TCAGGATTAA
 701 GATTGGATTA TGGAAGGTTT TACGCTACCA AAACCTTCTT CGAAAGG

Nin77:

1 CCTTCACTTG TTTTATCAGT ACAATCCAAA AGGATCAGTA TGGGGCAACA
 51 TTGTTTGGGC TCATTTCAGT TCAAAAAGATT TAATCAATTG GATTAATTTA
 101 GAGCCTGCAA TTTATCCATC CAAACAATTT GACAAATATG GAACTTGGTC
 151 TGGTTCAGCA ACAGTTCCTC CTGGTAACAA GCCCATTATT TTGTACACTG
 201 GAATAGTTGA TGCCAATAAA ACCCAAGTCC AAAATTACGC CGTCCCGGCC
 251 AACTTATCCG ATCCATATCT TCGCGAATGG ATCAAGCCCG ATAACAACCC
 301 GTTAATCGTC CCGGATATTA GCATTAACAA GACCCAATTT CGTGACCCGA
 351 CAACAGCTTG GATGGGCAA GATGGTCATT GGAGAATTAT AATGGGAAGT
 401 TTGAGAAAAA AGAGGGGATT GGCAATAATG TATAGAAGTA AGGATTTTAT
 451 GAGATGGATT AAGGCTAAAC ATCCACTTCA TTCAACTGCT AATACAGGAA
 501 ATTGGGAATG TCCTGATTTT TTCCCTGTAT CATTACAAGG TACAAATGGT
 551 TTAGATAAAT ATGGTGAAGA TTCTAAGTAC GTRACTTAAAA ATAGTATGGA
 601 TCTTACTAGG TTTGAGTACT ATACTGTTGG TACGTACGAT ATTAAAAAAG
 651 ACAGGTATAT TCCAGATAAC ACTTCGGTTG ATAGTTGGAA GGGATTGAGA
 701 CTTGACTATG GAAATTTCTA CGCTTCCAAA ACCTT

Nin88:

```
1 CCTTCACTTT TTTTACCAGT ACAACCCAAA AGGATCAACA ATGAACAACA
51 TTGTTTGGGC TCATTAGTC TCAAAAGACT TAATCAATTG GATTAATTTA
101 GAGCCTGCAA TTTATCCATC CAAACCATTT GACAAATATG GAACATGGTC
151 TGGTTCAGCA ACTATTCTCC CTGGTAACAA GCCCATTATT TTGTACTG
201 GAGTGGTAGA TGCCAACATG ACCCAAGTCC AAAATTACGC CGTCCCGGCC
251 AACTTATCCG ATCCATATCT CCGTGAATGG AACAAGCCCG ATAACAACCC
301 GTTGATCGTC CCGGATATCA GCATCACCAA GACCCAATTT CGTGACCCGA
351 CAACAGCTTG GATGGGCAA GATGGTCATT GGAGAATTGT GGTAGGAAGT
401 TCAAGAAACC GTGGTGGGTT GGCAATATTG TATAGAAGTA GGAATTTTCA
451 GAAATGGATC AAGGCTGAGC ATCCACTTCA TTCATCTGCC AAAACAGGAA
501 ATTGGGAATG CCCAGATTTT TTTCTGTTT CCTTGCAAGG TTCTAATGGT
551 TTAGATGCAT CGTACAACGG AAAATATGTT AAGTACGTTT TCAAGAATAG
601 CCTTCCTGTT GCCGCGTTTG AGTACTACAC AATTGGTACA TATGATGCCA
651 AACAAGATAG GTATATTCCA GATAACACTT CAGTCGATGG TTGGAAAGGA
701 TTGAGACTTG ACTATGGCAT TTTCTACGCA TCCAAAACCT TCTACGAAAG
751 G
```

Nin21:

```
1 CCTTACCTG TTCTACCAGT ATAATCCAGA GGCTGCAGTA TGGGGAAATA
51 TTGTATGGGG CCATGCAGTT TCAAGAGACT TAATTCACTG GCAACACCTT
101 CCAGTTGCTA TGGTTGCGGA TCAATGGTAC GACATTAACG GTGTATGGAC
151 CGGATCCGCA ACCATTTTAC CCGATGGTAA ACTCGTCATG TTATATACCG
201 GGTCAACCAA CGAGTCAGTA CAGGTTCAA ATCTAGCGTA CCCGGCTGAC
251 CCATCGGATC CTCTCCTAAG AAAATGGGTC AAATATGAGG GCAACCCGGT
301 ACTTGTACCA CCACCCGAA TTGCTACTAA AGATTTTCGT GACCCACCA
351 CTGCATGGAC CACACCACAA GGCAAATGGA GGATTACTAT TGGTTCAAAG
401 GTTAATAAAA CTGGAATTTT ATTGGTCTAT GACACTATTG ATTTTAAGAA
451 ATTTGAGTTG TTGGATGGGG TGCTCCATGG TGTACCGGGT ACGGGTATGT
501 GGGAAATGTGT GGACTTTTAC CCGGTTTCGA AAGTTGTTGA AAATGGGCTT
551 GACACATCAG ATAATGGGCC TGCAGTAAAA CATGTGTTAA AGTCCAGTCT
601 AGATGATGAT AGAAATGATT ATTATGCACT TGGAACCTAT GATGCAGTGG
651 CTGGTAAATG GATTCCTGAT AATCCACAA TTGATGTTGG TATTGGATTA
701 AGATATGATT ATGGAAATTT TTACGCATCC AAAACCTTCT TCGAAAGG
```

Publikationen

Teile dieser Arbeit sind zur Veröffentlichung eingereicht:

Hirsche J., Engelke T., Völler D., Goetz M. and Roitsch T. Interspecies compatibility of the anther specific cell wall invertase promoters from *Arabidopsis* and tobacco for generating male sterile plants. (Eingereicht bei: Theoretical and Applied Genetics)

Hirsche J., Fernández J. M. G. and Roitsch T. Hexokinase-dependent and -independent signalling pathways regulate pollen germination of *Arabidopsis thaliana*. (Eingereicht bei: The Plant Journal)

Lebenslauf

Persönliche Angaben:

Name: Jörg Hirsche
Geburtsdatum: 26. April 1977
Geburtsort: Selb
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig

Schulbildung:

1983 – 1987 Grundschole Thierstein/Höchstädt
1987 – 1996 Gymnasium Selb, Abschluss: Abitur

Wehrdienst:

07/1996 – 04/1997 Ableistung des Grundwehrdienstes

Berufsausbildung:

09/1997 – 07/1999 Ausbildung zum Gärtner, Fachrichtung Zierpflanzenbau

Berufstätigkeit:

08/1999 – 10/1999 Gärtnergehilfe an der FH Weihenstephan, Freising

Studium/Promotion:

11/1999 – 06/2004 Studium der Gartenbauwissenschaften an der TU München-Weihenstephan; Abschluss: Diplom-Agraringenieur
seit 07/2004 Promotion am Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie (Prof. Roitsch) der Julius-Maximilians-Universität Würzburg

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Meinem Betreuer, Herrn Prof. Dr. Thomas Roitsch, danke ich für die Überlassung des vielschichtigen und hochinteressanten Themas. Vielen Dank auch für sein reges Interesse am Fortgang der Arbeit, seinen wissenschaftlichen Rat sowie die Freiheit, eigene Ideen in das Projekt mit einzubringen. Ohne seine Unterstützung wären auch meine beiden Auslandsaufenthalte an der Université Pierre et Marie Curie in Paris nicht möglich gewesen.

Vielen Dank auch Herrn Prof. Dr. Kaiser für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Ein ganz besonderes Dankeschön gilt Herrn PD Dr. Thomas Engelke für die gute Zusammenarbeit, die vielen wertvollen Anregungen, zahlreichen Diskussionen und nicht zuletzt für das Korrekturlesen.

Frau Christine Hampp danke ich für die Durchführung der Tabaktransformationen und für die tägliche Unterstützung im Laboralltag.

Den Praktikanten und Diplomanden Regina Burkl, Nicole Plickert, Katja Schmidt und Daniel Völler danke ich für Ihren Beitrag an diesem Projekt.

Ein herzliches Dankeschön auch an Katharina Bonfig, Dr. Ines Raacke, PD Dr. Susanne Berger, Barbara Schäfer sowie allen ehemaligen und aktuellen Mitarbeitern des Lehrstuhls für die gute Zusammenarbeit. Vielen Dank auch dem Gärtnerteam für die Pflege der Pflanzen im Gewächshaus.

Besonderer Dank auch an Frau Dr. Anne Guivarc'h für die gute Betreuung in Paris und dafür, alles über *in situ*-Hybridisierung lernen zu dürfen. In diesem Zusammenhang gilt mein Dank auch Tae Kyun Hyun sowie seiner Frau für die Durchführung weiterer *in situ*-Hybridisierungen.

Für die elektronenmikroskopischen Aufnahmen danke ich Herrn Prof. Dr. Krohne und seinen Mitarbeitern.

Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei meiner Familie, die mich stets vorbehaltlos auf all meinen Wegen unterstützte und mir auch in schwierigeren Zeiten neue Kraft gab.

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Diese Arbeit wurde in gleicher oder ähnlicher Form noch zu keinem anderen Prüfungsverfahren vorgelegt.

Ich erkläre, dass ich bisher keine akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht habe.

Würzburg, den

Jörg Hirsche