

Inhaltsverzeichnis

Geleitwort.....	5
Vorwort.....	7
Inhaltsverzeichnis	9
Abkürzungsverzeichnis.....	15
Zusammenfassung	19
Einleitung.....	21
1 Extrazelluläre Invertasen: Funktion und Regulation in höheren Pflanzen.....	21
2 Pollenentwicklung und männliche Sterilität.....	27
3 Brassinosteroide	33
4 Zielsetzung	37
Ergebnisse.....	39
1 Identifizierung einer spezifisch in Tabakblüten exprimierten Invertase und Untersuchungen zu ihrer Funktion bei der Pollenentwicklung und -keimung	39
1.1 Charakterisierung und Sequenzierung des genomischen Invertaseklons pNDG8	39
1.2 Analyse des spezifischen zeitlichen und räumlichen Expressionsusters von Nin88.....	42
1.3 Klonierung des Nin88-Promotors und Überprüfung der korrekten Expression	46
1.4 Gewebespezifische Reduzierung von Nin88-Aktivität durch Antisense Repression oder einen Invertase-Inhibitor verursacht männliche Sterilität	47
1.4.1 Gewebespezifische Antisense Repression von Nin88	47
1.4.1.1 Phänotypische Charakterisierung der Antisense-Pflanzen.....	48
1.4.1.2 Morphologische Charakterisierung der Antisense-Pollen	51

1.4.1.3 Selektive Verringerung der Invertaseaktivität im Tapetum und in sich entwickelnden Pollen in den Antisense-Pflanzen	52
1.4.1.4 Untersuchungen zur Entwicklung der transgenen Pollen	55
1.4.2 Gewebespezifische Reduzierung der Nin88-Aktivität durch einen Invertase-Inhibitor	58
1.4.2.1 Phänotypische Charakterisierung der Inhibitor-Pflanzen	59
1.4.2.2 Morphologische Charakterisierung der Inhibitor-Pollen	60
1.4.2.3 Untersuchung der Invertaseaktivität in sich entwickelnden Pollen in den Inhibitor-Pflanzen.....	61
1.4.2.4 Extrazelluläre Invertaseaktivität während der Pollenkeimung	62
1.4.2.5 Zuckeraufnahme in Wildtyp- und Inhibitor-Pollen	63
1.5 Untersuchungen zur Samenproduktion in den Antisense-Pflanzen	65
1.5.1 Fremdbestäubung der Antisense-Pflanzen mit Wildtyp-Pollen.....	65
1.5.2 Expression von Nin88 in Fruchtknoten und Pollen.....	68
1.6 Antherenspezifische Expression des Nin88-Promotors in anderen Pflanzen	69
2 Klonierung von Hexosetransportern aus Tabakantheren	71
2.1 Klonierung und Sequenzierung von Hexosetransportern	71
2.2 Expressionsanalyse der Hexosetransporter Nt-Htp1 und Nt-Htp2.....	72
3 Gewebespezifische Induktion einer extrazellulären Invertase aus Tomaten durch Brassinosteroide.....	73
3.1 Die extrazelluläre Invertaseaktivität in photoautotrophen Tomatensuspensionskulturen wird durch Brassinosteroide erhöht.....	73
3.2 Brassinosteroide induzieren spezifisch die mRNA des extrazellulären Invertaseisoenzyms Lin6.....	74

3.3 Die Zuckeraufnahme in Suspensionskulturzellen wird durch Brassinosteroide stimuliert	76
3.4 Das lokalisierte, brassinosteroidabhängige Hypokotyl- wachstum von Tomatenkeimlingen korreliert mit einer gewebespezifischen Induktion der Lin6 mRNA	79
4 Etablierung einer schnellen und einfachen Methode zur Detektion nicht kovalent gebundener Pflanzenzellwand-Proteine	82
Diskussion	85
1 Analyse der Regulation und Funktion der extrazellulären Invertase Nin88	85
1.1 Klonierung der extrazellulären Invertase Nin88 und ihres Promotors aus <i>Nicotiana tabacum</i>	85
1.2 Nin88 besitzt ein spezifisches zeitliches und räumliches Expressionsmuster	87
1.3 Erzeugung männlich steriler Pflanzen durch Reduzierung der Nin88-Aktivität in Pollen	88
2 Spezifische Induktion der extrazellulären Invertase Lin6 durch Brassinosteroide	94
3 Ausblick	97
Material und Methoden	101
1 Material	101
1.1 Verwendete Organismen	101
1.1.1 Suspensionszellkulturen	101
1.1.2 Pflanzen	101
1.1.3 <i>Escherichia coli</i> -Stämme und <i>Agrobacterium</i> stamm	102
1.2 Vektoren und Klone	102
1.3 Antikörper	103
1.4 Oligonukleotide	103
1.5 Chemikalien, Enzyme und Verbrauchsmaterialien	108
1.6 Laborgeräte und Computersoftware	111
1.7 Puffer und Lösungen	114
1.7.1 Agarosegelelektrophorese	114
1.7.2 <i>Agrobacterien</i> minipreps	115
1.7.3 Bradford-Proteinbestimmungstest	115

1.7.4	DNA-Minipreps	115
1.7.5	Genomische DNA-Isolierung aus Pflanzen.....	116
1.7.6	Invertasetests.....	116
1.7.7	Pollenuntersuchungsmethoden.....	116
1.7.8	RNA-Isolierung und Northernblotanalysen.....	118
1.7.8.1	RNA-Isolierung.....	118
1.7.8.2	RNA-Gele, Blotting und Northern-Hybridisierung.....	118
1.7.9	SDS-Proteingele und Westernblotanalysen.....	119
1.7.9.1	Coomassie-Färbung von SDS-Proteingelen	119
1.7.9.2	SDS-Gele	120
1.7.9.3	Westernblot	120
1.8	Medien	121
1.8.1	Pflanzentransformationen.....	121
2	Methoden.....	124
2.1	Anzucht der Pflanzen, Behandlung und Ernte des verwendeten Pflanzenmaterials	124
2.1.1	Anzucht der Pflanzen	124
2.1.2	Anzucht der Suspensionskulturen	125
2.1.3	Ernte von Pflanzenmaterial	125
2.1.4	Behandlung der Suspensionszellen mit Testsubstanzen	126
2.1.5	Hypokotylwachstumstest mit Brassinosteroiden.....	126
2.2	Pflanzentransformationen.....	127
2.2.1	Transformation von <i>Nicotiana tabacum</i>	127
2.2.2	Transformation von <i>Lycopersicon peruvianum</i>	128
2.3	Molekularbiologische Methoden.....	129
2.3.1	Agrobakterien.....	129
2.3.1.1	Herstellung kompetenter Agrobakterien	129
2.3.1.2	Transformation von Agrobakterien	129
2.3.1.3	Agrobakterien Minipreps	129
2.3.2	Carrier-DNA	130
2.3.3	DNA-Agarosegelelektrophorese	131
2.3.4	DNA-Dephosphorylierung mit alkalischer Phosphatase.....	131

2.3.5	DNA-Fragmentisolierung aus LMP-Gelen	131
2.3.6	DNA-Ligation	132
2.3.7	DNA-Plasmid-Midipreps	132
2.3.8	DNA-Plasmid-Minipreps und Restriktions- enzymverdaue	133
2.3.9	DNA-Sequenzierung	133
2.3.10	Genomische DNA-Isolierung aus Pflanzen.....	134
2.3.11	Gewinnung von Antiseren gegen extrazelluläre Invertasen	135
2.3.11.1	Klonierung der Expressionsvektoren	135
2.3.11.2	Expression und Anreicherung der Fusionsproteine.....	135
2.3.11.3	Immunisierung von Kaninchen und Gewinnung von Antiseren	136
2.3.12	Herstellung der DNA-Standards für die Agarosegelelektrophorese	137
2.3.13	Herstellung kompetenter E. coli-Zellen und Transformation.....	137
2.3.14	Northernblot-Analysen.....	138
2.3.14.1	RNA-Isolierung	138
2.3.14.2	RNA-Formaldehydelektrophorese	139
2.3.14.3	Northern-Blot.....	139
2.3.14.4	Hybridisierung	140
2.3.15	Pollenuntersuchungsmethoden.....	140
2.3.15.1	DAPI-Färbung	140
2.3.15.2	Histochemische GUS-Färbungen.....	141
2.3.15.3	in vitro Pollenkeimungstest.....	141
2.3.15.4	in vitro Pollenreifung.....	141
2.3.15.5	Stärkefärbung mit I ₂ /KI-Lösung	141
2.3.15.6	Vitalitätstest	142
2.3.16	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	142
2.3.17	Primer-Annealing.....	142
2.3.18	Reverse-Transkription.....	143
2.3.19	RNA-in situ Hybridisierungen und Nin88- Immunolokalisation.....	143

2.3.20 Zuckeraufnahmemessungen	144
2.4 Biochemische und Proteinchemische Methoden	146
2.4.1 Aufnahmen mit dem Elektronenmikroskop	146
2.4.2 Bradford-Proteinbestimmungstest	146
2.4.3 Herstellung von Invertaseextrakten	146
2.4.4 Invertaseaktivitätstest	147
2.4.5 SDS-Proteingelelektrophorese und Westernblot	147
2.4.5.1 SDS-PAGE	147
2.4.5.2 Coomassie-Färbung von SDS-Proteingelen	148
2.4.5.3 Western-Blot	148
Anhang	149
1 Sequenz des Nin88-Promotors und identifizierte regulatorische Elemente	149
2 Genomische Sequenz von Nin88 mit der identifizierten Exon-Intron-Struktur	153
3 Nukleotid- und abgeleitete Aminosäuresequenz der Exons I – IV von Nin88	156
4 Gesamtsequenz des genomischen Invertaseklons pNDG8	158
5 Teilsequenzen von extrazellulären Invertasen, die für die Konstruktion der Antisense- Konstrukte verwendet wurden	166
5.1 Teilsequenz aus Nin88	166
5.2 Teilsequenz aus Nt- β fruc1	166
5.3 Teilsequenz aus Cin1	167
6 Nukleotid- und abgeleitete Aminosäuresequenzen der klonierten Hexosetransporter aus Tabakantheren	169
6.1 Sequenzen von Nt-Htp1	169
6.2 Sequenzen von Nt-Htp2	170
Literaturverzeichnis	173