

Physiologische und bioanalytische Untersuchungen während der  
Pollenembryogenese von *Hordeum vulgare*

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doktor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I  
Biowissenschaften

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von

Herrn Rico Lippmann

Geboren am 22.01.1983 in Lichtenstein (Sa.)

Gutachterin bzw. Gutachter:

1. Herr PD Dr. Hans-Peter Mock
2. Herr Prof. Dr. Klaus Humbeck
3. Herr Prof. Dr. Erwin Heberle-Bors

Halle (Saale) , den 11.09.2012

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1	Pollenembryogenese <i>via</i> Mikrosporen-Kultur vs. Gametogenese.....	2
1.1.1	Pollenembryogenese.....	2
1.1.2	Gametophytische Pollenentwicklung.....	4
1.2	Induktion der Pollenembryogenese-Kompetenz.....	5
1.3	Pollenembryogenese und deren Potential in der modernen Pflanzenzüchtung.....	7
1.4	Effekt von Co-Kulturen auf die Pollenembryogenese.....	8
1.5	Zielstellung.....	10
<b>2</b>	<b>Material &amp; Methoden</b> .....	<b>11</b>
2.1	Pflanzenmaterial und –Aufarbeitung.....	11
2.1.1	Pistillisolierung aus Weizenähren.....	11
2.1.2	Isolierung und Kultivierung unreifer Pollen aus <i>Hordeum vulgare</i> .....	11
2.1.2.1	Isolierung.....	11
2.1.2.2	Kultivierung.....	12
2.1.2.3	Regeneration.....	12
2.1.2.4	Co-Kultivierung von heterogenem <i>Feeder</i> -Gewebe.....	13
2.1.3	Tabaksuspensionskultur S2LS3.....	13
2.2	Integrative Extraktion von Proteinen und Metaboliten.....	13
2.3	Metabolitanalytik.....	14
2.3.1	GC-TOFMS.....	14
2.3.1.1	Derivatisierung und GC-MS Analyse.....	14
2.3.1.2	Ungerichtete Analyse und Multidimensionale Datenanalyse.....	15
2.3.2	Analyse phosphorylierter Metabolite und organischer Säuren (IC-ESI-MS).....	15
2.3.3	Protein-Expressionsanalyse mittels <small>nano</small> LC-MS/MS.....	16
2.3.3.1	Extraktion der Proteine und tryptischer Verdau.....	16
2.3.3.2	Trennung der Peptide mittels LC-MS/MS.....	16
2.3.3.3	Prozessierung der <i>Multiplexed</i> LC-MS Daten.....	17
2.3.3.4	Quantifizierung, multidimensionale und statistische Analyse der Daten.....	18
2.4	Fraktionierung von konditioniertem Pistill-Medium.....	18
2.4.1	Etablierung eines Bio-Assay zur Validierung der Fraktionen.....	18
2.4.2	Größenfraktionierung durch Zentrifugation.....	19
2.4.3	Größenfraktionierung mittels Gelfiltration.....	19
2.4.4	2 Phasen Extraktion.....	19
2.4.5	Festphasenextraktion.....	20
2.5	Sekretomanalysen des Kulturmediums.....	21
2.5.1	Metabolitanalyse mittels GC-MS.....	21
2.5.2	Quantitative Analyse von Aminosäuren.....	21
2.5.2.1	Derivatisierung.....	21
2.5.2.2	Chromatographische Trennung.....	22
2.5.3	Polyaminanalyse – HPLC.....	22
2.5.3.1	Derivatisierung.....	22
2.5.3.2	Chromatographische Trennung.....	22
2.5.4	Analyse extrazellulärer Proteine mittels LC-MS/MS.....	23
2.6	Mikroskopische Untersuchungen.....	23
2.6.1	Fluoreszenzmikroskopie.....	23

2.6.2	Transmissionselektronenmikroskopie .....	23
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>25</b>
3.1	Physiologische und bioanalytische Untersuchungen der Pollenembryogenese.....	26
3.1.1	Untersuchung der Induktion der Pollenembryogenese-Kompetenz .....	26
3.1.1.1	Veränderungen des Primärstoffwechsels während der Induktion der Pollenembryogenese-Kompetenz .....	26
	Proteinmuster während der Induktion der Pollenembryogenese- Kompetenz.....	35
3.1.1.2	35	
3.1.1.3	Veränderungen des Primärstoffwechsels auf Proteinebene – Enzyme der Glykolyse und des TCA-Zyklus .....	38
3.1.1.4	Signifikant unterschiedlich abundante Proteine in allen biologischen Replikaten .....	39
3.1.2	Änderungen zu Beginn der Pollenembryogenese im Vergleich zur gametophytischen Entwicklung.....	45
3.1.2.1	Physiologische Änderungen innerhalb der Entwicklung.....	45
3.1.2.2	Änderungen von Primärmetaboliten zu Beginn embryogener Entwicklung .....	49
3.1.2.3	Differentiell abundante Proteine zu Beginn der embryogenen Entwicklung.....	51
3.2	Identifizierung Pollenembryogenese-fördernder Substanzen im Sekretom von Pistill- „Ammenkulturen“ und Embryogenese-kompetenten Pollenkulturen.....	53
3.2.1	Etablierung der analytischen Methoden anhand einer Tabak Zellsuspensions- kultur - S2LS3.....	54
3.2.1.1	Proteinanalytik des Kulturmediums der Suspensionskultur .....	55
3.2.2	Untersuchung des konditionierten Kulturmediums auf akkumulierende Substanzen mit potenziellem <i>Feeder</i> -Effekt.....	56
3.2.2.1	Extrazelluläre Metabolite Embryogenese-stimulierender Kulturen .....	56
3.2.2.2	Extrazelluläre Metabolite der Pistill- <i>Feeder</i> -Kultur.....	61
3.2.2.3	Extrazelluläre Proteine in Embryogenese-stimulierenden Kulturmedien .....	63
3.2.2.4	Zusammenfassung: Identifizierung Co-sekretierter Substanzen zur Reduktion potentieller Kandidaten .....	66
3.2.3	Etablierung des Biotests zur präzisen Bestimmung der <i>Feeder</i> -Qualität.....	67
3.2.3.1	Bestimmung der kritischen Populationsdichte der Pollenkultur .....	68
3.2.3.2	Bestimmung der notwendigen Anzahl an Pistillen für das Regenerationsmedium .....	69
3.2.3.3	Optimierung der Erneuerung von konditioniertem Medium .....	70
3.2.4	Reduzierung der Anzahl potentiell relevanter Substanzklassen mithilfe des Biotests .....	71
3.2.4.1	Fraktionierung nach Molekulargewicht zeigte Bioaktivität unterhalb von 3 kDa.....	71
3.2.4.2	Fraktionierung mittels Gelfiltration.....	72
3.3	Effekt der Co-Kultivierung von Pistillen aus Weizen.....	74
3.3.1	Effekt der Co-Kultivierung von verschiedenem dissektierten Material von Weizen Pistillen .....	75
3.3.2	Effekt der Anzahl co-kultivierter longitudinal geschnittener Pistille .....	79
3.3.3	Validierung der Ergebnisse an ‘Golden Promise’ als Modell .....	80

<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>82</b>
4.1	Änderungen des intrazellulären Stoffwechsels während der Induktion der Pollenembryogenese-Kompetenz und frühen Pollenembryogenese .....	82
4.1.1	Metabolite .....	83
4.1.2	Proteine mit unterschiedlicher Abundanz und möglicher Relevanz während der Pollenembryogenese .....	86
4.1.3	Transkriptions und Translationsfaktoren während der Pollenembryogenese .....	88
4.2	Co-Kulturen und deren Einfluss auf die Pollenembryogenese .....	91
4.2.1	Biotest zur präzisen Bestimmung der <i>Feeder</i> -Qualität der Kokultivierung .....	92
4.2.2	Co-Kultivierung verschiedener Teile von Weizen-Pistillen.....	92
4.3	Analyse des Sekretoms von embryogenen Pollen und Pistillen .....	96
4.3.1	Methoden-Etablierung anhand einer Zellsuspensionskultur von <i>N. tabacum</i> .....	97
4.3.2	Detektierte Metabolite im Sekretom und deren potenzieller <i>Feeder</i> -Effekt .....	98
4.3.3	Akkumulierte Proteine und deren potentieller Einfluss auf die Embryogenese .....	103
4.4	Eingrenzung möglicher Kandidaten des initialen stimulierenden Effektes .....	107
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>114</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>117</b>
<b>7</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>129</b>
<b>8</b>	<b>Curriculum vitae .....</b>	<b>130</b>
<b>9</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>134</b>
<b>10</b>	<b>Erklärung.....</b>	<b>135</b>
<b>11</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>136</b>

## 1 Einleitung

Die Embryogenese ist sowohl im Tier- als auch Pflanzenreich ein Prozess mit fundamentaler Bedeutung, der normalerweise mit der Verschmelzung von zwei Gameten zur Zygote eingeleitet wird. Zusätzlich besteht die Möglichkeit, dass *in vivo* auch ohne Befruchtung, Embryogenese stattfindet. Ein Beispiel hierfür ist Apomixis, bei der entweder die unbefruchtete Eizelle (Parthenogenese) oder aber andere Zellen der Samenanlage den Ursprung des sich im Samen entwickelnden Embryos darstellen. Für weitere Informationen wird auf den Übersichtartikel von Koltunow und Grossniklaus (2003) verwiesen. Neben diesen Entwicklungen können sich unter bestimmten Bedingungen *in vitro* auch andere Zelltypen zu Embryonen entwickeln. Hierzu zählen unter anderem die somatische Embryogenese, die Gynogenese und die Pollenembryogenese (Mordhorst et al., 1997; Forster et al., 2007). Für Letztere existieren in der Literatur die alternativen Begriffe Androgenese und Mikrosporenembryogenese. Im Weiteren wird in dieser Arbeit der Begriff Pollenembryogenese verwendet.

Ein wesentlicher Unterschied zwischen den verschiedenen Kategorien der Embryogenese ist der Ursprung des embryogenen Gewebes. Bei der somatischen Embryogenese handelt es sich dabei i.d.R. um diploide Körperzellen, wohingegen in der Pollenembryogenese eine haploide Zelle als Ursprung des Embryos dient. Diese Möglichkeit der asexuellen Vermehrung stellt ein enormes Potential für die Pflanzenwissenschaften und -züchtung dar, auf das noch näher eingegangen werden soll.

So besitzen unreife Pollen die Fähigkeit unter bestimmten äußeren Einwirkungen von der gametophytischen Entwicklung zu einem embryogenen Entwicklungsweg umzuschalten (Touraev et al., 1997). Im Gegensatz zur somatischen Embryogenese oder Apomixis, enthalten diese Embryonen nur den durch meiotische Reduktion entstandenen haploiden Chromosomensatz. Für Pflanzenzüchter und die Grundlagenforschung ist diese Methode von Interesse, da die Pflanzen bereits in der ersten Generation ohne Kreuzungen homozygot sind und somit der Genotyp sofort auch dem Phänotyp entspricht.

Bereits in den sechziger Jahren wurde erstmalig die Erzeugung von haploiden Pflanzen aus Antherenkulturen durch Guha & Maheshwari (1964) beschrieben. In der darauffolgenden Zeit wurden Methoden und Protokolle für eine Vielzahl von Spezies etabliert. Jedoch ist die Induktionsrate und die Ausbeute an Regeneraten auch bis heute für einige wichtige Kulturpflanzen sehr gering und für die meisten Spezies stark Genotyp-abhängig (Riley, 1974; Wang et al., 2000).

---

## 1.1 Pollenembryogenese *via* Mikrosporen-Kultur vs. Gametogenese

### 1.1.1 Pollenembryogenese

Zunächst muss hier zwischen zwei verschiedenen Applikationen unterschieden werden. Zum Einen wird die *in vitro* Kultivierung von Antheren verwendet. Diese Methode ist generell einfach und auf eine Vielzahl von Kulturpflanzen anwendbar (Maluszynski et al., 2003). Zum größten Teil entstehen Embryonen aus den enthaltenen Mikrosporen innerhalb der Antheren. Es kann hierbei jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass intermediäre Kalli entstehen, welche eine gametoklonale Varianz fördern (Forster et al., 2007). Zusätzlich besteht die Gefahr der falschpositiven Selektion von Regeneraten, die nicht aus Mikrosporen sondern aus somatischem Gewebe entstehen. Ein weiterer Nachteil, vor allem in zellbiologischen und biochemischen Untersuchungen, ist die schützende Hülle der Antheren. Dadurch ist eine direkte Beeinflussung und Untersuchung der Mikrosporen verhindert. Eine vorherige Isolierung und anschließende Kultivierung von Mikrosporen *in vitro* für solche Untersuchungen ist daher die Methode der Wahl. Dadurch ist es einfacher, strukturelle Veränderungen zu untersuchen, sowie genetische Manipulationen vorzunehmen, wie es zum Beispiel bei Gerstenkulturen beschrieben wurde (Kumlehn et al., 2006).

Die Pollenembryogenese setzt zunächst eine Reprogrammierung der Mikrosporen voraus, um von der gametophytischen Entwicklung zur embryogenen zu wechseln. Bisherige Studien legen nahe, dass eine Induktion der Embryogenese-Kompetenz im Zeitfenster um die asymmetrische Teilung der uninuklearen Mikrospore möglich ist, jedoch nur solange bis die Einlagerung von Stärke beginnt (Binarova et al., 1997). Im Gegensatz zur Gametogenese zeigen vakuolisierte Mikrosporen nach Induktion der Embryogenese-Kompetenz eine vergrößerte Zentralvakuole und ein klares dedifferenziertes Zytoplasma (Huang, 1986; Hoekstra et al., 1992; Maraschin et al., 2003). Es wird davon ausgegangen, dass eine Degradierung von Zellorganellen entscheidend ist, um die Totipotenz der Zellen zu induzieren. Für diese Restrukturierung ist zum einen die Autophagie und die Proteindegradierung durch das 26S-Proteasome verantwortlich (Maraschin et al. 2005 und enthaltene Referenzen).

Nach Induktion und Überführung der Mikrosporen in nährstoffreiches Medium wird während der Pollenembryogenese und der Zellteilung vor allem eine reduzierte Anzahl an Stärkekörnern und Lipidkörpern als struktureller Marker angesehen (Rashid et al., 1982; Huang, 1986; Telmer et al., 1995; Kumlehn and Loerz, 1999). Zu Beginn der Embryogenese finden zusätzlich starke Umstrukturierungen in der Zytoskelett-Struktur statt (Rashid et al.,

---

1982; Barnabas et al., 1991; Zaki and Dickinson, 1991; Telmer et al., 1995; Gervais et al., 2000; Obert and Barnabas, 2004), die in verschiedenen Spezies wie *Nicotiana tabacum* (Dunwell and Sunderland 1974a, 1974b, Garrido et al., 1995, Touraev et al. 1996a), *Brassica napus* (Zaki and Dickinson 1990, Telmer et al. 1993), *Datura* (Sangwan and Camefort 1983, 1984) beschrieben wurden. Entnommen aus dem Review von Shariatpanahi et al. (2006) können folgende Marker aufgelistet werden: a) Fragmentierung der Vakuole, b) „Wanderung“ des Zellkerns in die Zellmitte (Zaki and Dickinson, 1991), c) Vergrößerung des Zellvolumens, d) Generierung einer neuen Zellwand unter der Exinschicht, e) Verkleinerung des Zellkerns, f) Komprimierung des Zellkerns, g) Degenerierung der Plastiden, h) eine symmetrische Zellteilung gegenüber der asymmetrischen Teilung während der Gametogenese (Simmonds and Keller, 1999; Shariatpanahi et al., 2006). Jedoch fanden die meisten Untersuchungen in Dikotyledonen, wie *Brassica napus* oder *Nicotiana* statt. Anhand einiger *Zelltracking*-Experimente wurde festgestellt, dass auch eine „sternartige“ Struktur der Zelle für die weitere Embryogenese von Bedeutung sein könnte (Binarova et al., 1997; Maraschin et al., 2005).

Maraschin *et al.* (2005) haben gezeigt, dass die induzierten Gersten-Mikrosporen sich in drei unterschiedliche Subtypen (I-III) innerhalb einer Kultur entwickeln können, wobei nur I&II multizelluläre Strukturen ausbilden. Zellen die einer Entwicklung vom Typ III folgen, lagern Stärke ein und zeigen eine gametophytische Entwicklung. Nur multizelluläre Strukturen des Typ I können letztendlich auch embryogene Strukturen ausbilden. Dies zeigt, die Heterogenität innerhalb einer Mikrosporen-Kultur und nicht alle Zellen sind zur Embryogenese befähigt. Neuere Untersuchungen von Daghma et al. (submitted) haben zur Unterscheidung von 9 verschiedenen Typen innerhalb einer Pollenkultur geführt, was dessen Heterogenität noch stärker verdeutlicht.

Grundsätzlich lässt sich sagen, dass die Pollenembryogenese in 3 Teilschritte unterteilt werden kann. In Phase I wird durch Stressapplikation das embryogene Potential induziert und die Gametogenese unterdrückt. In Phase 2 entstehen durch Zellteilungen multizelluläre Strukturen, wobei sich zunächst die Größe der gesamten Struktur nicht wesentlich ändert, wohl aber die der proliferierenden Zellen. Nach Aufbrechen der Exine (Phase 3) entwickeln sich embryoartige Strukturen, von denen sich ein Teil nach Kallusbildung zu grünen Regeneraten entwickelt. Eine schematische Darstellung der einzelnen Stadien ist in Abbildung 1 zu sehen. Zum Vergleich ist neben der Pollenembryogenese auch die gametophytische Entwicklung im Überblick abgebildet, auf die jedoch im nächsten Kapitel detaillierter eingegangen wird (Abbildung 1).

---

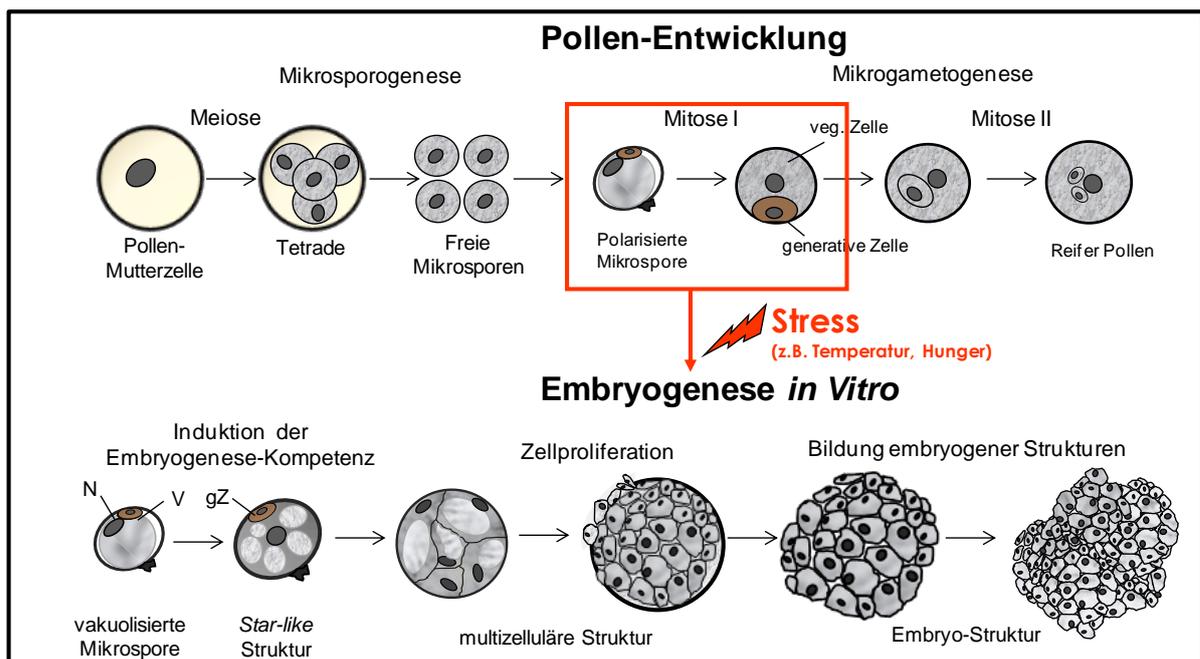


Abbildung 1: Verlauf und Entwicklungsstadien der Pollenembryogenese.

Oben) Optimaler Zeitpunkt (rote Box) für die Isolierung und Stressapplikation zur Herstellung Embryogenese-kompetenter Zellen während der gametophytischen Entwicklung

Unten) Entwicklungsstadien während der Pollenembryogenese von Zellen des Typ I gegliedert in die entsprechenden 3 Phasen der Embryogenese in *Hordeum vulgare*. gZ - Generative Zelle, V - Vakuole, N - Nukleus

### 1.1.2 Gametophytische Pollenentwicklung

Für ein besseres Verständnis der Unterschiede zwischen Pollenembryogenese und männlicher Gametogenese soll an dieser Stelle ein kurzer Überblick über die gametophytische Pollenentwicklung gegeben werden. Diese kann in zwei Phasen, die Mikrosporogenese und Mikrogametogenese, unterteilt werden. In zwei meiotischen Teilungen entsteht dabei aus einer diploiden Mikrosporenmutterzelle eine Tetrade mit vier haploiden Zellen, welche von Callose ( $\beta$ -1,3-Glucan) umgeben sind. Anschließend wird diese Zellwand durch Tapetumsekretierte Proteine (Callasen) abgebaut und die Mikrosporen freigegeben (Honys et al., 2006). Während der Meiose kommt es bereits zur Restrukturierung des Zytoplasmas und Degradierung von Ribosomen in der Zelle (Clement et al., 2011). Des Weiteren kommt es zu einer Vergrößerung der Vakuole (Yamamoto et al., 2003), was mit einer Polarisierung der Zelle einhergeht.

Anschließend erfolgt die Mikrogametogenese, in der die Mikrosporen eine erste Pollen-Mitose (PM I) durchlaufen, woraus zwei unterschiedlich große Zellen - die größere vegetative und eine kleine generative Zelle - entstehen (Eady et al., 1995; Borg et al., 2009). Die vegetative Zelle lagert Speichermetabolite (Kohlenhydrate/Lipide), Transkripte und Proteine

ein (Pacini, 1996), die für die spätere Ausbildung des Pollenschlauchs notwendig sind. Die vegetative Zelle ist außerdem nicht mehr teilungsaktiv und verbleibt in der G1-Phase.

Im Gegensatz dazu ist die metabolische Aktivität in der generativen Zelle stark unterdrückt. Außerdem besitzt sie nur wenige Zellorganellen und stark kondensiertes Chromatin. Es wurde bereits beschrieben, dass die generative Zelle nur wenige Plastiden enthält (Cresti et al., 1992). Letztendlich durchläuft die generative Zelle eine weitere mitotische Zellteilung (Pollenmitose II) um zwei Spermazellen zu generieren. Dabei hängt es von der Pflanzenart ab, ob die Zellteilung erst im Pollenschlauch (bizellularer Pollen) oder bereits in den Antheren (trizellularer Pollen) geschieht. Letzteres trifft für die Getreidearten zu. Für weitere Details zur Pollenentwicklung siehe auch Honys et al. (2006).

## 1.2 Induktion der Pollenembryogenese-Kompetenz

Eine effiziente Induktion der Pollenembryogenese-Kompetenz ist generell nur mit einer Stressbehandlung (abiotisch) der unreifen Pollen möglich (Touraev et al., 1997), welche die notwendigen „molekularen Schalter“ und strukturellen Änderungen zu induzieren scheint. Dabei ist es eher sekundär, um welchen Stressor es sich handelt. Jedoch eignen sich einige Stressbedingungen für einzelne Pflanzenspezies besser als andere. In der Literatur sind für die einzelnen Arten verschiedene Protokolle zu finden, die teilweise auch widersprüchliche Angaben beinhalten. Vorwiegend werden jedoch Behandlungen mit Kälte-, Hitze- oder Hungerstress vor der eigentlichen Mikrosporenkultivierung verwendet. Kältebehandlung wurde 1973 zuerst in *Datura* beschrieben (Nitsch and Norreel, 1973). Weitere repräsentative Protokolle und Referenzen sind in Tabelle 1 zusammengefasst. Es existieren auch Protokolle für andere Kulturpflanzen wie *Secale cereale* (Immonen and Anttila, 1999, 2000), *Capsicum annum* (Lantos et al., 2009), oder aber ökonomisch wichtige Baumarten wie *Populus* (Deutsch et al., 2004), welche Temperatur- oder Hungerstress verwenden. Die Ursachen für die Induktion der Embryogenese-Kompetenz sind jedoch zum jetzigen Zeitpunkt wenig verstanden. Es gibt lediglich Hypothesen bzw. Indizien, welche auf bestimmte Faktoren hinweisen. In kältebehandelten Antheren trennen sich die Mikrosporen vom Tapetium, so dass eine Art Hungerzustand hervorgerufen wird (Sunderland and Xu, 1982) was gewisse Parallelen zu den Mechanismen des Hungerstresses impliziert.

Während der Hitzestress Applikation in *Brassica* Mikrosporen wurde gezeigt, dass sich das Zytoskelett restrukturiert (Hause et al., 1993) und Veränderungen im Zytoplasma, den Zellwänden und Vesikeln stattfanden (Telmer et al., 1993). Da unter Hitzestress eine erhöhte Expression bestimmter Hitzeschockproteine stattfindet, zählen vermutlich auch diese Proteine

---

---

zu wichtigen Signalen während der embryogenen Induktion. So nimmt man beispielsweise an, dass HSP70 eine Apoptose verhindert (Jaattela et al., 1998). Hitzestress kann auch die Regulation bzw. Expression einzelner Gene beeinflussen. Aktuelle Arbeiten von Pecinka et al. (2010) zeigten einen Einfluss von Hitzestress auf die Aktivierung einzelner Gene die bei *Arabidopsis thaliana* nicht direkt in die Signalkaskaden während Hitzestress involviert sind. Diese transkriptionale Aktivierung ist offenbar weniger von epigenetischen Faktoren, wie z.B. einer Demethylierung abhängig. Vielmehr postulieren Pecinka et al. (2010) eine Reduktion der gebundenen Nukleosomen und somit auch eine Lockerung des Heterochromatins. Diese neueren Ergebnisse sind auch im Hinblick auf die Induktion der Pollenembryogenese durch Stress interessant.

Hungerstress bzw. die Kultivierung in Medium ohne verwertbare Kohlenstoffquelle ist eine weitere effektive Behandlung der Mikrosporen. Auch hier konnten in früheren Studien strukturelle Veränderungen des Zytoplasmas und des Nukleus detektiert werden (Garrido et al., 1995). Zusätzlich fanden Garrido et al. (1993) auch eine Reduktion der RNA-Synthese und Proteinkinase-Aktivität in Tabakmikrosporen. Für eine detailliertere Zusammenfassung der verschiedenen Stressapplikationen und der Veränderungen während dieser Stressinduktionen wird auf Übersichtsartikel verwiesen (Touraev et al., 1997; Shariatpanahi et al., 2006).

Zusätzlich wurden in den letzten Jahren auch andere „exotische“ Applikationen verwendet. Unter anderem verwendeten Barinova et al. (2004) einen erhöhten pH-Wert um eine Embryogenese in *Nicotiana tabacum* und *Antirrhinum majus* zu induzieren. Dies wird mit einer entsprechenden Reduzierung der Invertase-Aktivität unter hohem pH-Wert begründet. Der daraus resultierende Nährstoffmangel führt wie bei anderen Kultivierungen in denen Hungerstress verwendet wird zur embryogenen Induktion. Andere Applikationen beruhten auf reduziertem Atmosphärendruck, hypertonischem Schock oder „induzierenden“ Chemikalien, wie beispielsweise 2-Hydroxynikotinsäure, BT-5-Carbonsäure oder Anthranilinsäure (Zheng et al., 2001; Liu et al., 2002).

---

**Tabelle 1: Ausgewählte Protokolle und Referenzen für die Stressinduktion der Pollenembryogenese in verschiedenen Pflanzenspezies und entsprechende Referenzen modifiziert nach Touraev *et al.* (2006). MSP - Mikrosporensuspension**

Spezies	Stressapplikation	Protokoll	Referenz
<i>B. napus</i>	Hitze	32°C; 72 h; MSP	(Custers et al., 1994)
<i>B. napus</i>	Colchicin	25 µM Colchicin; 42 h; MSP	
<i>Brassica oleracea</i>	Hitze	32,5°C; 24 h; MSP	(Dias, 2001)
<i>Citrus</i>	Kälte	4°C; 8-15 d; Blüte	(Germana and Chiancone, 2003)
<i>H. vulgare</i>	Kälte/Hungerstress	4°C; 0,3 M Mannitol; 4d; Ähren	(Kasha et al., 2001)
<i>H. vulgare</i>	Kälte	4°C; 2-4 Wochen; Ähren	(Davies and Morton, 1998)
<i>H. vulgare</i>	Kälte	4°C; 3-4 Tage; Antheren	
<i>H. vulgare</i>	Kälte	4°C; 21-28 d; Ähren	
<i>H. vulgare</i>	Hungerstress	0,7 M Mannitol; 24°C; 4 d; Antheren	(Castillo et al., 2000)
<i>M. domestica</i>	Kälte/Hungerstress	4°C; 1-2 Wochen; Blüten danach 2-3 d MSP bei 4°C	(Hofer et al., 1999)
<i>N. tabacum</i>	Hitze/Hungerstress	33°C; 6 d; MSP	(Touraev et al., 1996)
<i>O. sativa</i>	Kälte	8-10°C; 8 d; Rispe	
<i>S. tuberosum</i>	Kälte	4-6°C; 72 h; Blüten	
<i>T. aestivum</i>	Kälte	4°C; 7 d; Ähre	
<i>T. aestivum</i>	Colchicin/Hitze	0,04 % Colchicin; 29°C; 3d; Anthere	
<i>T. aestivum</i>	Hitze/Hungerstress	33°C; 4 d; Antheren	(Touraev et al., 1996)
<i>T. aestivum</i>	Kälte/Hungerstress	4°C; 0,4 M Mannitol; 5-7 d; Ähren	(Kasha and Shim, 2003)
<i>T. aestivum</i>	Kälte	4°C; 14 d; Ähren	(Tuveesson et al., 2000)
<i>Triticale</i>	Kälte	4°C; 14 d; Ähre	(Pauk et al., 2000)
<i>Triticale</i>	Kälte	7°C; 14 d; Ähre	(Tuveesson et al., 2000)
<i>Zea Mays</i>	Kälte	7°C; 7 d; Rispe	
<i>Zea mays</i>	Colchicin	0,02 % Colchicin; 3d; Anthere	(Obert and Barnabas, 2004)

### 1.3 Pollenembryogenese und deren Potential in der modernen Pflanzenzüchtung

*In Vitro* Kulturen, ursprünglich entwickelt um die bereits 1902 von Gottlieb Haberlandt vorhergesagte Totipotenz von Pflanzenzellen zu beweisen, wurden bereits seit Anfang des 20. Jahrhunderts für Regenerationsversuche verwendet. 1922 wurde dann das natürliche Vorhandensein von haploiden Sporophyten in *Datura stramonium* beschrieben (Blakeslee et

al., 1922). Jedoch konnten erst 1964 erstmalig haploide Pflanzen erfolgreich aus *Datura innoxia* Antheren produziert werden. Ein weiterer Meilenstein war die Generierung von fertilen doppelhaploiden Kulturpflanzen wie *Brassica napus* (Thompson, 1972) oder *Hordeum vulgare* `Mingo` (Ho and Jones, 1980). Mittlerweile existieren für >200 Pflanzenarten entsprechende Protokolle zur Induktion der Pollenembryogenese-Kompetenz (Maluszynski et al., 2003). In der Pflanzenzüchtung sind homozygote, d.h. reinerbige Linien von großer Bedeutung. Auf herkömmliche Weise werden diese durch aufwändige Rückkreuzungsserien generiert (Morrison and Evans, 1988). Die Verwendung der Haploidentechnologie ermöglicht eine sofortige Selektion und Fixierung aller genotypischen sowie phänotypischen Merkmale. Weiterhin ist die Haploidentechnologie aber auch für Grundlagenforschung von hoher Relevanz, da z.B. eine effizientere Generierung homozygot transgener Pflanzen oder rekombinanter Inzuchtlinien ermöglicht wird. Doppelhaploide Pflanzen können auch durch Gynogenese erzeugt werden, was erstmals durch San Noeum (1976) in Gerste gezeigt wurde. Diese Methode hat jedoch den Nachteil hohen Aufwandes, da viel weniger weibliche als männliche Gametophyten pro Pflanze oder Blütenstand zur Verfügung stehen. Für die Pollenembryogenese ist es hingegen möglich, aus einer Pflanze eine hohe Anzahl an Mikrosporen zu isolieren und für die Embryogenese-Induktion zu verwenden.

Trotz dieser enormen Einsatzmöglichkeiten und des hohen Potentials sind die biochemischen, physiologischen und genetischen Prozesse während der Pollenembryogenese und deren Induktion bis jetzt wenig untersucht worden. In der Literatur sind dazu vor allem Untersuchungen zur Optimierung des Mediums, der besten Stressapplikation oder zu strukturellen Veränderung während der Pollenembryogenese zu finden.

#### **1.4 Effekt von Co-Kulturen auf die Pollenembryogenese**

Der positive Effekt von „Ammenkulturen“ und deren „konditioniertes“ Medium während der Pollenembryogenese ist in der Literatur bereits für mehrere Pflanzenspezies beschrieben. Köhler & Wenzel beschrieben bereits 1985 erstmalig die stimulierende Wirkung von Co-Kulturmedium unreifer Pistillen auf die Pollenembryogenese bei Gerste. Der sogenannte *Feeder*-Effekt war allerdings bereits von der Kultivierung von somatischen Zellsuspensionskulturen bekannt. Weitere Studien mit co-kultivierten Pistillen als Helferzellen oder konditioniertem Medium von solch heterologen Geweben zeigten ähnliche Ergebnisse (Li and Devaux, 2001; Lu et al., 2008) auch für Weizen (Nitsch and Nitsch, 1969), Raps (Huang et al., 1990) oder Mais (Kasha et al., 2001). In allen diesen Untersuchungen

---

---

konnte ein positiver Effekt auf die embryogene Entwicklung unreifer Pollen beobachtet werden. Es ist auch nicht zwingend notwendig, dass das heterologe Gewebe der gleichen Spezies entspringt. So kann die Pollenembryogenese in Weizen durch Gersten Pistille gefördert werden (Castillo et al., 2000). Auch in der entgegengesetzten Richtung ist ein *Feeder*-Effekt von Weizenpistillen auf die Embryoproduktion insbesondere bei recalcitranten Gerstengenotypen detektierbar (Coronado et al., 2005). All diese Co-Kultivierungseffekte gehen hierbei von heterologem Gewebe aus.

Ein *Feeder*-Effekt ist aber auch innerhalb des gleichen Zelltyps möglich, wie bereits bei Suspensionskulturen erwähnt wurde. Dieser Populationseffekt kann auch bei Pollenkulturen detektiert werden, was beispielsweise von Huang et al. (1990) in Gerste beschrieben wurde. Wie bereits erwähnt, ist dieser Effekt maßgeblich von der Zell- bzw. Populationsdichte innerhalb des Systems abhängig.

Seit Köhler & Wenzel (1985) eine erste fundierte Studie über den Effekt von co-kultivierten Pistillen auf die Pollenembryogenese beschrieben haben und einhergehend versuchten den verantwortlichen Faktor in dem konditioniertem Medium zu identifizieren, wurden viele verschiedene Moleküle/Molekülklassen als potentielle Kandidaten postuliert. Jedoch war es bis jetzt nicht möglich genaue Aussagen darüber zu treffen. Die meisten Hypothesen oder Resultate stammen aus Studien, welche weniger die Aufklärung der verantwortlichen Substanz fokussierten, sondern lediglich durch „Versuch und Irrtum“ eine höhere Ausbeute an Regeneraten erreichen wollten.

Einige potentielle Kandidaten sollen an dieser Stelle genannt werden. Hauptsächlich zählen zu diesen, Proteine wie Chitinasen, Peroxidasen oder Arabinogalaktanproteine oder Peptide wie CLAVATA3/ ENDOSPERM SURROUNDING REGION (CLE3) und Phytosulfokine aber auch Metabolite wie IAA-Derivate (Xu and Sunderland, 1981; Köhler and Wenzel, 1985; De Jong et al., 1992; Van Engelen and De Vries, 1992; Mordhorst et al., 1997; Touraev et al., 1997; Ouedraogo et al., 1998; Hanai et al., 2000; Kelley et al., 2002; Chiancone et al., 2006; Kasha et al., 2006; Forster et al., 2007). Die genaue(n) *Feeder*-Substanz(en) und damit auch der genaue Wirkungsmechanismus ist/sind jedoch auch nach jahrzehntelanger Forschung unbekannt. Da Pflanzenzellen grundsätzlich durch Signale benachbarter Zellen beeinflusst werden, wirken in diesem Fall wahrscheinlich ähnliche Mechanismen und besitzen bestenfalls eine Art stimulierende Funktion.

---

## 1.5 Zielstellung

Wie bereits beschrieben stellt die Pollenembryogenese zum einen für Pflanzenzüchter (Anwendungsforschung) als auch für die Grundlagenforschung ein enormes Potential dar. Die biochemischen und molekularbiologischen Veränderungen sind jedoch zum jetzigen Zeitpunkt noch weitgehend unverstanden. Dies gilt sowohl für die Induktion der Pollenembryogenese-Kompetenz als auch für die anschließende embryogene Entwicklung. Daraus ergeben sich folgende Zielstellungen für diese Arbeit.

- Identifizierung potentieller Biomarker während der Induktion der Pollenembryogenese-Kompetenz.
- Identifizierung von funktionellen Änderungen im Primärmetabolismus während der Induktion der Pollenembryogenese-Kompetenz und im weiteren Verlauf der embryogenen Entwicklung *in Vitro*.
- Identifizierung von Proteinen die nach der Stressinduktion eine veränderte Abundanz aufweisen. Dabei sollten Kandidaten-Proteine identifiziert werden, die für weitere gezielte Untersuchungen interessant erscheinen.
- Identifizierung von regulatorischen Elementen wie Transkriptionsfaktoren und Evaluierung der Abundanz während der Pollenembryogenese im Vergleich zur Pollenentwicklung.

Weiterhin wurde bereits erwähnt, dass Co-Kulturen einen positiven Einfluss auf Zellkulturen und hier embryogene Pollen besitzen. Die chemische Natur dieses Effektes ist bis heute nicht aufgeklärt. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war daher:

- Die Identifizierung und Charakterisierung der im Medium akkumulierenden Substanzen und Etablierung entsprechender Methoden anhand einer Zellkultur, da hierbei ausreichend Material zur Verfügung steht.
  - Die Eingrenzung und mögliche Identifizierung der verantwortlichen Substanzen für den stimulierenden Effekt während der Co-Kultivierung.
  - Die Untersuchung spezifischer Gewebeteile der Pistille, um den Einfluss unterschiedlicher Gewebe auf den *Feeder*-Effekt festzustellen.
-

## 2 Material & Methoden

### 2.1 Pflanzenmaterial und –Aufarbeitung

Für alle Experimente der Pollenisolierung wurde, wenn nicht anders angegeben mit Pflanzenmaterial der Wintergerste Kultivar ‚Igri‘ (*Hordeum vulgare* L. cv. Salome) verwendet. Die Anzucht erfolgte in einer Klimakammer unter Langtagbedingungen (14/12 °C Tag/Nacht Zyklus und 16 h Licht). Die Vernalisation erfolgte acht Wochen bei 2 °C und 9 h Licht. Anschließend wurden die Pflanzen im Gewächshaus kultiviert (18/14 °C Tag/Nacht & 16 h Licht). Weitere Kultivare waren *Hordeum vulgare* cv. Golden Promise. Für die Pistill-Isolierung verwendeter Weizen cv. Bobwhite wurde analog kultiviert.

#### 2.1.1 Pistillisolierung aus Weizenähren

Verwendet wurden Pflanzen bei denen das Hüllblatt die Ähre noch umschließt aber die Grannen schon 1-2 cm herausragen (Abbildung 2). Zur Oberflächensterilisierung der Ähren wurden diese mit 70% (v/v) EtOH besprüht. Danach konnte das Hüllblatt und die Grannen entfernt werden. Anschließend wurde restliches Ethanol mit einem sterilen Tuch entfernt und die Ähren in einem geschlossenen Gefäß bis zur Isolation gelagert. Um die Pistillen aus der Ähre zu isolieren wurden zunächst Deck- und Hüllspelze entfernt (Abbildung 2 (1-3)), um schließlich die freiliegenden Antheren abzutrennen (4-5). Die freiliegenden Pistille konnten dann mit einer Pinzette aus der Ähre isoliert (6) und anschließend in Kumlehns Barley Pollen Medium kultiviert werden.

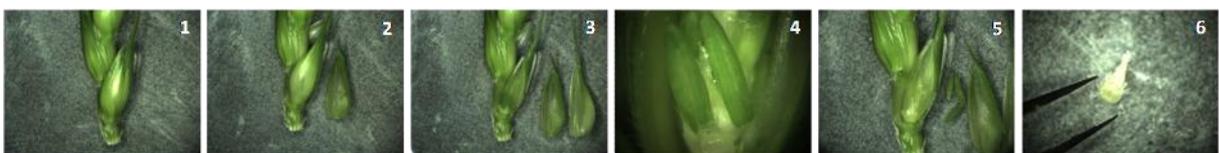


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Pistill-Isolation aus Weizenähren.

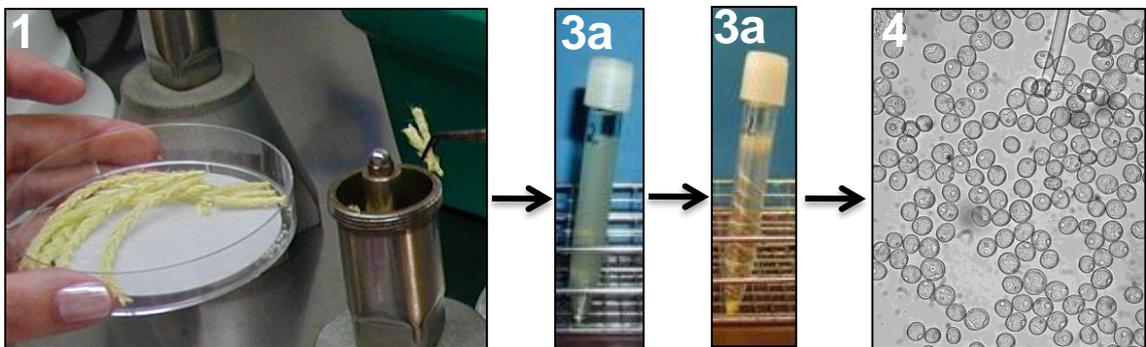
Gezeigt sind vergrößerte Aufnahmen der jeweiligen Isolationsschritte. Die entsprechenden Bilder sind im Text beschrieben.

#### 2.1.2 Isolierung und Kultivierung unreifer Pollen aus *Hordeum vulgare*

##### 2.1.2.1 Isolierung

Die Isolierung der unreifen Pollen erfolgte nach Kumlehn et al. (2006). Es wurden Kältestress-induzierte Gerstenähren mithilfe eines Standmixers in 20 mL 0,4 M Mannitol 2x10 s aufgeschlossen (Abbildung 3) und die Suspension anschließend durch ein 100 µm Sieb filtriert. Dabei wurden nur Ähren mit vakuolisierten unreifen Pollen verwendet. Das Retentat wurde erneut mit 10 mL 0,4 M Mannitol extrahiert (2x5 s). Das Filtrat wurde 10 min bei 4 °C

und 100xg zentrifugiert, anschließend der Überstand verworfen und das Pellet in 0,55 M Maltose resuspendiert. Nach Überschichtung der Maltoselösung mit 0,4 M Mannitol (2) wurde der Gradient 10 min bei 4°C und 100xg zentrifugiert. Die Interphase (3) wurde isoliert und anschließend die Zelldichte bestimmt (4). Nach erneuter Zentrifugation wurde entsprechend der gewünschten Zelldichte mit KPB-Medium aufgefüllt. Für die Isolation der Pollen zur Untersuchung der gametophytischen Entwicklung wurden Ähren mit identischen Stadien markiert und lediglich für die entsprechende Zeit von 1-4 Tagen weiter in *planta* kultiviert. Danach erfolgte die Isolierung analog der oben beschriebenen Methode des Aufschlusses. Die Stadien wurden alle mikroskopisch vor den Analysen evaluiert.



**Abbildung 3:** Darstellung der Pollenisolation aus Ähren (*Hordeum vulgare*).

Die entsprechenden Arbeitsschritte sind im Text detailliert erläutert. 1- kälteinduzierte Ähren, 2/3- Dichtegradientenzentrifugation der Pollen (2 vorher & 3 nachher), 4- isolierte kompetente Pollen im vakuolisierten Zustand

### 2.1.2.2 Kultivierung

Die Kultivierung der isolierten Pollenembryogenese induzierten Pollen erfolgte in Kumlehns Barley Pollen Medium (KPB) nach Kumlehn et al. (2006) in 3,5 cm Kulturschalen in Dunkelheit bei 24°C für 3-4 Wochen. Zu Golden Promis Kulturen wurde nach einer Woche erneut 1 mL KPB Medium hinzugegeben und die Kulturen im Folgenden bis zum Transfer der Kalli bei 80 rpm geschüttelt.

### 2.1.2.3 Regeneration

Die Kallus-Strukturen wurden für die Regeneration zunächst auf festes KBPDC Medium transferiert und in Dunkelheit bei 24°C für 7-10 d inkubiert. Anschließend wurden diese auf das Regenerationsmedium K4NBT gegeben, für weitere 5 Tage in Dunkelheit inkubiert und schließlich unter Langtagbedingungen kultiviert.

### 2.1.2.4 Co-Kultivierung von heterogenem *Feeder*-Gewebe

Als Positivkontrolle dienten bei diesen Versuchen eine Embryogenese-kompetente Pollen Kultur mit  $50.000 \text{ Pollen mL}^{-1}$ , die außerhalb des *Millicell*-Inserts (Millipore, Deutschland) kultiviert wurden, wobei die analysierten, ca. 75 Pollen pro mL (150 Pollen pro Kultur bei 2 mL Gesamtvolumen) wie bei den zu vergleichenden Varianten direkt in die *Millicell*-Inserts inkubiert wurden. Die entwickelten Kalli wurden in verschiedene Größenkategorien unterteilt, wobei im Weiteren Strukturen mit einer Mindestgröße von  $100 \mu\text{m}$  als Mikrokalli und jene größer  $500 \mu\text{m}$  als Makrokalli bezeichnet werden. Eine schematische Darstellung der Kulturführung ist in Abbildung 4 dargestellt.

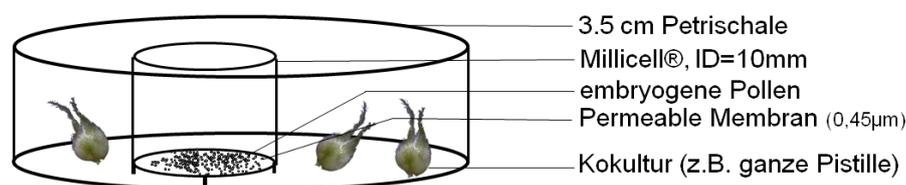


Abbildung 4: Aufbau des Biotest für Co-Kultivierungsexperimente anhand von *Millicell*®-Einsätzen.

Die Einsätze (Millipore, Deutschland) haben eine  $0,45 \mu\text{m}$  Porengröße. 150 unreife Pollen wurden innerhalb des *Millicell*®-Einsatzes kultiviert. Im äußeren Bereich erfolgte die Zugabe der Co-Kulturen oder embryogenen Pollenkulturen mit einer sonst verwendeten Zelldichte als Kontroll-Kultur.

### 2.1.3 Tabaksuspensionskultur S2LS3

Die Zell-Suspensionskultur entstammt eines Wurzelkallus von *N. tabacum* L. cv Havana SR1 (Maliga et al., 1973). Die Zellen wurden in Linsmaier-Skoog Medium (Linsmaier and Skoog, 1965) LS-3 unter Zugabe von Saccharose  $30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$   $\alpha$ -Naphthalensäure (NAA) and  $0,3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  Kinetin kultiviert. Die Inokulation erfolgte durch 4 mL einer 7 d alten Hauptkultur und Kultivierung für 7 d bei  $25^\circ\text{C}$  und 110 rpm. Für die Analyse des Sekretoms wurde das Medium durch Filter mit unterschiedlichen Porengrößen ( $5\text{-}0,45\mu\text{m}$ ) vakuumfiltriert. Um auszuschließen, dass es sich bei den extrazellulären Substanzen nicht hauptsächlich um Bestandteile abgestorbener Zellen handelt, wurde die Vitalität der Zellen mittels Fluoresceindiacetat bestimmt (Widholm, 1972; Huang et al., 1986).

## 2.2 Integrative Extraktion von Proteinen und Metaboliten

Die Extraktion erfolgte mit einer modifizierten Methode nach Morgenthal et al. (2007). Dabei wurden jeweils 20-25 mg Frischmasse mit 750  $\mu\text{l}$  Metabolit-Extraktionspuffer aufgeschlossen (Precellys, 50 s, 4.000 rpm) und anschließend 15 min bei  $4^\circ\text{C}$  geschüttelt. Nach Zentrifugation bei  $4^\circ\text{C}$  (14.000 g, 10 min) wurde der Überstand für die Metabolitextraktion in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bis zur Weiterverarbeitung auf Eis gelagert.

Das Pellet wurde in 200 µL HEPES-Puffer aufgenommen und nach Zugabe von 600 µL TE-Puffer äquilibriertes Phenol 30 min bei 4 °C geschüttelt. Die Proben wurden anschließend zentrifugiert (4.000 g, 10 min, 4 °C) und die obere Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die gelösten Proteine konnten dann mithilfe von 5 Vol. Aceton über Nacht bei -20 °C gefällt werden. Das Pellet wurde nach Zentrifugation 3x mit Methanol gewaschen und schließlich getrocknet.

Der Überstand für die Metabolitextraktion wurde mit 0,5 mL H<sub>2</sub>O versetzt und zur Phasentrennung für 2 min bei 14.000 g zentrifugiert. Entsprechende Aliquots wurden für die Analysen bei 30 °C unter Vakuum getrocknet.

## 2.3 Metabolitanalytik

### 2.3.1 GC-TOFMS

#### 2.3.1.1 Derivatisierung und GC-MS Analyse

Die getrockneten Extrakte wurde vor der Analyse modifiziert nach Lisec et al (2006) in einem 1. Schritt mit 40 µL Methoxyamin-Hydrochlorid (20 mg mL<sup>-1</sup> in Pyridin) für 2 h bei 37 °C inkubiert, um Monosaccharide in ihre entsprechenden O-Methyloximderivate zu konvertieren. In einem 2. Schritt erfolgte die Zugabe von 80 µL MSTFA + Alkane (Retentionszeitstandard) zur Derivatisierung aller funktionellen Gruppen der Metabolite.

Die Trennung der derivatisierten Proben erfolgte modifiziert nach Lippmann et al. (2009) mittels einer Rxi<sup>®</sup> 5Sil MS Integra Säule (30m, 0,25 mm ID, 250 µm Film) an einem GC-MS System, bestehen aus einem Gaschromatograph A7890 (Agilent, Böblingen, Deutschland), einem automatischen Probengeber Twister XL (GERSTEL, Mülheim an der Ruhr, Deutschland) und einem Massenspektrometer GCT Premier (TOF) der Firma Waters (Eschborn, Deutschland). 1 µl wurde im *splitless* Modus mittels *hot-needle* Technik (240°C, 500ms) injiziert. Die Trennung erfolgte mittels Temperaturgradient bei 80°C 3 min isothermal gefolgt von einer Erhöhung von 5°C min<sup>-1</sup> bis 310°C für 5 min. Das System wurde jeweils für 3 min nach jedem Lauf equilibriert. Die Datenaufnahme erfolgte mit Mass Lynx 4.1 der Firma Waters (Eschborn, Deutschland) und einer Rate von 10 Spektren s<sup>-1</sup> in einem Bereich von 65-650 m/z im zentrierten Modus.

Die Identifizierung der Metabolite erfolgte durch Spektren und Retentionszeitvergleich von Referenzsubstanzen wenn vorhanden oder durch Annotierung mithilfe der Spektren der NIST 05 Bibliothek und der *Golm Metabolit Database* (<http://csbdb.mpimp-golm.mpg.de/csbdb/gmd/gmd.html>) und Abgleich des Retentionszeitindex.

### 2.3.1.2 Ungerichtete Analyse und Multidimensionale Datenanalyse

Für die Hauptkomponentenanalyse wurden folgende Parameter in der Software MarkerLynx<sup>®</sup> (Waters Corporation) verwendet. 20 Masse-Retentionszeitpaare wurden mit einem *Threshold* von 5 % der Basissignalintensität je Aufnahmezeitpunkt isoliert. Das Zeitfenster wurde dabei zwischen 6,5 und 39 min gewählt und der Massenbereich zwischen 100 und 850 mit einer Massentoleranz von 0,05 Da. Die Datensätze wurde entweder in der gleichen Software visualisiert oder für eine weitere multivariate Analyse mit der Software CoMet der Firma Nonlinear Dynamics (Großbritannien) und den vorgegebenen Standardparametern durchgeführt.

### 2.3.2 Analyse phosphorylierter Metabolite und organischer Säuren (IC-ESI-MS)

Die IC-ESI-MS Experimente wurden an einem Ionenaustausch Chromatographiesystem und einem konduktiven Detektor (Dionex, Deutschland) kombiniert mit einer massenspektrometrischen Datenaufnahme durch ein QQQ6490-Detektor (Agilent). Die Steuerung und Datenaufnahme erfolgte mit der Firmensoftware "Chromeleon" V 6.8 (Dionex) und MassHunter V B.04.00. Die Trennung erfolgte mittels IEX-Säule AS11-HC (250x2mm) verbunden mit einer AG 11-HC Vorsäule (10x2mm). Eine ATC-1 Säule (Anionenfalle) wurde zwischen Eluenten- und Trennsäule geschaltet, um Anionen in der Lösung zu entfernen.

#### HPLC Parameter

Mobile Phase:	A: deionisiertes Wasser (Millipore) B: 100mM NaOH
Flussrate:	0,2 mL min <sup>-1</sup>
Temperatur:	30°C
Injektionsvolumen:	5µl
Equilibrierung:	96% Puffer A / 4 % Puffer B

Die Trennung erfolgte mit folgendem Gradienten: 0-8 min (4% Puffer B), 8-28 min (30 % Puffer B), 28-38 min (60 %), 38-51 min (100 %). Danach wurde innerhalb 3 min auf Ausgangsbedingungen gespült und die Säule für weitere 10 min equilibriert.

#### MS/MS Parameter

Source temperature [°C]	350°C
Cone Gas Flow [L/h]	720
Nano Tip Voltage [kV]	3,5
Polarity	ESI negativ
Dwell Time	20 s
Mass monitoring	1 amu [M-H] <sup>-</sup>

Collision Energy [eV]                      Metabolit abhängig

*Mass selection Monitoring* (MRM) wurde verwendet um die Sensitivität zu erhöhen und parallele Interferenzen zu minimieren.

### 2.3.3 Protein-Expressionsanalyse mittels nanoLC-MS/MS

#### 2.3.3.1 Extraktion der Proteine und tryptischer Verdau

Für die Proteomanalyse der einzelnen Stadien der Pollenembryogenese (Abbildung 7) wurden die gesamten Proteinextrakte mittels Trypsin, nach Solubilisieren in 0,1 % RapiGest™-Puffer (Waters) (50mM NH<sub>4</sub>(CO<sub>2</sub>)<sub>3</sub> verdaut. Das Proteingemisch wurde für 10 min bei 60°C unter Zugabe von 2.5mM DTT inkubiert und anschließend erfolgte die Alkylierung der freien Cysteinseitenketten mit Iodoacetamid (7,5 mM) bei Raumtemperatur in Dunkelheit. Der Proteinverdau erfolgte durch Zugabe von Trypsin V511 (Promega) bei 37°C über Nacht. Anschließend wurde RapiGest™ unter Zugabe von 1N HCl bis pH 2 präzipitiert und das Pellet durch Zentrifugation entfernt (20min, 20.000 g, 4°C).

#### 2.3.3.2 Trennung der Peptide mittels LC-MS/MS

Die Trennung des tryptischen Verdaus erfolgte auf einer RP18-Säule (BEH 1,7µm, 100 mm x 100 µm) gekoppelt an eine RP-18 Vorsäule (Symmetry 5µm, 20mm x 180 µm) an einer nanoLC-ESI-QTOF-MS/MS (Waters) modifiziert nach Kaspar et al. (2010) mit einem MeCN Gradient 3-40 % bei 600nl min<sup>-1</sup>. Detaillierte Parameter sind in Tabelle 2 aufgeführt. Die Datenaufnahme erfolgte in einem Daten unabhängigen Modus mittels einem alternierenden Niedrigenergie- und Hochenergie-Aufnahmemodus, wobei zum einen die Peptidmassen und zusätzlich durch die weitere Datenspur mit hoher Kollisionsenergie entsprechend ungerichtet Fragmentmassen detektiert wurden.

**Tabelle 2: MS Parameter für die multiPlexed Expressionsanalyse der Peptidproben**

Quelle	
Source temperature [°C]	80
Cone Gas Flow [L/h]	30
Nano Tip Voltage [kV]	2.9
Polarity	ESI positive
TOF Mode	V-Mode
Kalibrant [Glu1]-Fibrinopeptide	B
Scan Frequency [s]	20
Scan Time [s]	1

---

Reference Cone Voltage(V)	35
Collision Energy [eV]	21
Temperature Correction	disabled

**MS Parameter**

Scan Time [sec]	0.95
Interscan Time [s]	0.05
Start Mass	50
End Mass	1700
Resolution	9.000
Trigger Threshold	750
Signal Threshold	20
Collision low Energy [eV]	4
Collision high Energy [eV]	10-28

**2.3.3.3 Prozessierung der *Multiplexed* LC-MS Daten**

Die Prozessierung der LC-MS Daten erfolgte nach Silva et al. (2006) mit der Software „Proteinlynx Global Server“ PLGS 2.3. Für die Identifizierung wurden sowohl die kompletten Peptidmassen als auch die Fragmentinformationen mit dem in der PLGS Software implizierten *Identity Algorithm* verwendet und die Proteinannotierung erfolgte gegen die HarvEST Datenbank (<http://www.harvest-web.org>) und entsprechende zusätzliche Sequenzen für Keratin (*Homo sapiens*) und Enolase (*S. cerevisiae*). Die Proteinidentifizierung erfolgte mit automatischer Peptidfragment-Toleranz, 3 Ionen Übereinstimmungen pro Peptid und folgenden erlaubten Modifikationen: Carbamidomethyl und Propionamid an Cystein, Oxidation an Methioninresten. Eine weitere Auswertung der Chromatogramme wurde mit dem Programm LC-MS Progenesis (Nonlinear, Großbritannien) durchgeführt. Hierbei wurden zunächst alle Proben durch ein automatisches *Alignement* innerhalb der Retentionszeit prozessiert und anschließend nur die Signale prozessiert, welche 2-5 fach geladen waren und innerhalb des Retentionszeitbereichs von 5-90 min eluierten. Die minimale Signalintensität wurde automatisch bestimmt. Beide Programme haben hinsichtlich der so prozessierten Daten entsprechende Vorteile. Ein detaillierter Vergleich eines identischen Datensatzes ist in Matros et al. (2011) beschrieben worden. Für die weiteren Auswertungen wurden jedoch die Daten der LC-MS Progenesis Software verwendet und nur zur manuellen Überprüfung auf die Datensätze des PLGS Servers zurückgegriffen.

---

### 2.3.3.4 Quantifizierung, multidimensionale und statistische Analyse der Daten

Die Quantifizierung auf Proteinebene erfolgte durch die kombinierte Auswertung der Peptide für einen Protein-*Identifier*. Dabei musste das Protein mit mindestens einem charakteristischen (*unique*) Peptid identifiziert werden. Der so gefilterte und reduzierte Datensatz wurde für die weitere statistische Auswertung verwendet.

Visualisierung mit MapMan nach Thimm et al. (Thimm et al.): Hierfür wurden die erhaltenen Expressionsdaten aller technischen Replikate zunächst gemittelt und das Verhältnis zu regulären Mikrosporen gebildet. Nach Log<sub>2</sub>-Transformation wurden die Werte aller drei biologischen Replikate vereint und entsprechend in MapMan (Thimm et al., 2004) visualisiert. Dazu wurden die Harvest35 *Identifier* den MapMan Bins, wenn möglich zugeordnet.

#### Statistische Auswertung signifikant regulierter Proteine:

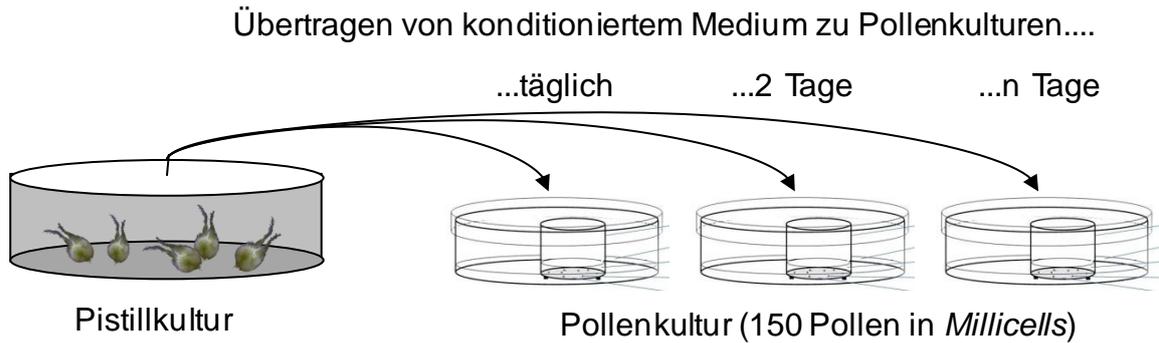
Um die in allen drei biologischen Replikaten signifikant regulierten Proteine zu ermitteln wurden die Expressionsdaten der identifizierten Proteine zunächst Quantil normalisiert. Anschließend wurden die Daten Log<sub>2</sub>-transformiert. Diese Werte fanden anschließend Verwendung für die statistische Auswertung mit dem R-Skript Limma (Smyth, 2005). Das Skript wurde für die Proteinexpressionsdaten entsprechend modifiziert.

## 2.4 Fraktionierung von konditioniertem Pistill-Medium

KPB Medium wurde mit isolierten Weizen-Pistillen inokuliert und anschließend wenn nicht anders angegeben 7 Tage bei 24°C im Dunkeln kultiviert. Anschließend wurde das konditionierte Medium abgenommen und bis zur weiteren Fraktionierung bei -80°C gelagert.

### 2.4.1 Etablierung eines Bio-Assay zur Validierung der Fraktionen

Es war nicht möglich einen *Feeder*-Effekt konditionierten Mediums nach einmaliger Inokulation zu erreichen. Daher wurde zunächst das gesamte Medium im Vergleich zu einer dauerhaften Co-Kultur in bestimmten Zeitintervallen mit frischem konditioniertem Medium substituiert. Dadurch konnte ein entsprechend günstiges Intervall im Hinblick auf Häufigkeit und Effizienz gefunden werden. Dazu wurde der gleiche Kultivierungsaufbau der Co-Kultivierungsexperimente verwendet, nur das keine Gewebe im Äußeren Bereich kultiviert wurden. Siehe hierzu auch das Schema in Abbildung 5.



**Abbildung 5: Schematische Darstellung der Zugabe konditionierten Mediums von Pistillkulturen.**

Zu Pollenkulturen die ohne Zugabe von *Feeder* nicht Embryogenese-fähig wären wurden jeweils 1 mL (50 % des Gesamtvolumens) an konditioniertem Medium in variierter Häufigkeit substituiert (täglich, aller 2, 4, 7 Tage).

#### 2.4.2 Größenfraktionierung durch Zentrifugation

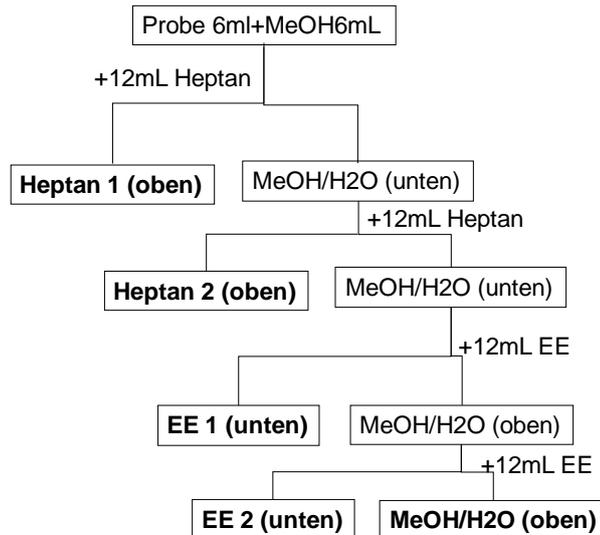
Das konditionierte Medium wurde durch Größenausschluss Zentrifugation in die einzelnen Fraktionsgrößen separiert. Dazu wurden Zentrifugalkonzentratoren „Vivaspin 6“ von Sartorius (Göttingen, Deutschland) in verschiedenen Ausschlussgrößen verwendet. Das dabei entstandene Retentat mußte anschließend in äquivalenter Menge an frischem Medium aufgenommen werden, dass diese Fraktionen durch die Filtrierung aufkonzentriert wurden. Beide Fraktionen wurden vor Verwendung in den Biotests sterilfiltriert (0,2 µm).

#### 2.4.3 Größenfraktionierung mittels Gelfiltration

Konditioniertes Medium wurde gefriergetrocknet und in 6-10-fach geringerem Volumen dd-H<sub>2</sub>O resuspendiert und jeweils 100 µl des entsprechenden Konzentrats an einem FPLC<sup>®</sup>-System (ÄKTA, GE Healthcare) mit einer Superdex Peptid 10/300 GL chromatographisch getrennt. Die Trennung erfolgte isokratisch in 100 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> und einer Flussrate von 1 mL min<sup>-1</sup>, wobei Fraktionen von 2 mL gesammelt wurden. Die Detektion erfolgte bei 215 und 280 nm. Nach Vereinigung von mehreren Replikaten einer Fraktion wurden diese zur weiteren Verwendung in den Biotests gefriergetrocknet und in frischem KPB-Medium resuspendiert.

#### 2.4.4 2 Phasen Extraktion

Konditioniertes Medium wurde in äquivalenten Volumen Methanol aufgenommen und entsprechend dem Schema in Abbildung 6 aufgearbeitet. Die Fraktionen wurden anschließend durch Vakuumzentrifugation (30°C) bis zur Trockenheit reduziert und für die weitere Analyse in frischem KPB-Medium aufgenommen.



**Abbildung 6: Schema der Aufarbeitung von konditioniertem Medium mittels 2 Phasen-Extraktion.**

**Fett hervorgehobene Phasen wurden für die Untersuchung im Bio-Assay verwendet. EE - Essigsäureethylester**

#### 2.4.5 Festphasenextraktion

Für die Festphasenextraktion des konditionierten Mediums wurden HLB Kartuschen (30mg, Waters) verwendet. Die entsprechende Durchführung der graduellen Fraktionierung ist in Tabelle 3 dargestellt. Die einzelnen Fraktionen bis auf den Durchfluss des Pistillmediums wurden nach Reduktion unter Vakuum und anschließender Resuspendierung in frischem KPB Medium für entsprechende Biotests verwendet.

**Tabelle 3: Übersicht der einzelnen Schritte während der Festphasenextraktion von konditioniertem Medium.**

	Eluent	Volume [ml]
Konditionierung 1	MeOH	1
Konditionierung 2	0.1% TFA	1
Durchfluss	Pistillmedium 6x	1,5
Waschen	0.1% TFA	1
Eluat 1	10% MeCN	1
Eluat 2	20% MeCN	1
Eluat 3	30% MECN	1
Eluat 4	40% MECN	1
Eluat 5	60% MECN	1
Eluat 6	100% MECN	1

## 2.5 Sekretomanalysen des Kulturmediums

### 2.5.1 Metabolitanalyse mittels GC-MS

Abgenommenes Kulturmedium wurde zunächst mit einem 0,45 µm Filter filtriert. Nach Trocknung dessen erfolgte eine Derivatisierung durch 40 µL Methoxyamin-Hydrochlorid (20 mg mL<sup>-1</sup> in Pyridin) für 2 h bei 37 °C inkubiert. In einem 2. Schritt erfolgte die Zugabe von 80 µL MSTFA + Alkane (Retentionszeitstandard) zur Derivatisierung aller funktionellen Gruppen der Metabolite. Die Trennung der derivatisierten Proben erfolgte modifiziert nach Lippmann et al. (2009) mittels einer Rxi<sup>®</sup> 5Sil MS Integra Säule (30m, 0,25 mm ID, 250 µm Film) an einem GC-MS System, bestehen aus einem Gaschromatograph A7890 (Agilent, Böblingen, Deutschland), einem automatischen Probengeber Twister XL (GERSTEL, Mülheim an der Ruhr, Deutschland) und einem Massenspektrometer GCT Premier (TOF) der Firma Waters (Eschborn, Deutschland). 1 µl wurde im *splitless* Modus mittels *hot-needle* Technik (240°C, 500ms) injiziert. Die Trennung erfolgte mittels Temperaturgradient bei 80°C 3 min isothermal gefolgt von einer Erhöhung von 5°C min<sup>-1</sup> bis 310°C für 5 min. Das System wurde jeweils für 3 min nach jedem Lauf equilibriert. Die Datenaufnahme erfolgte mit Mass Lynx 4.1 der Firma Watres (Eschborn, Deutschland) und einer Rate von 10 Spektren s<sup>-1</sup> in einem Bereich von 65-650 m/z im zentrierten Modus.

Die Identifizierung der Metabolite erfolgte durch Spektren und Retentionszeitvergleich von Referenzsubstanzen wenn vorhanden oder durch Annotierung mithilfe der Spektren der NIST 05 Bibliothek und der *Golm Metabolit Database* (<http://csbdb.mpimp-golm.mpg.de/csbdb/gmd/gmd.html>) und Abgleich des Retentionszeitindex.

### 2.5.2 Quantitative Analyse von Aminosäuren

Die Analyse der Aminosäuren in Kulturmedium embryogener Pollen erfolgte durch Derivatisierung mit Aminoquinolyl-N-hydroxysuccimidylcarbamate modifiziert nach Cohen & Michaud (1993). Dazu wurden nach Optimierung 10 µl an Kulturmedium verwendet.

#### 2.5.2.1 Derivatisierung

Die Derivatisierung erfolgte durch ACQ Reagenz (0,3 % (w/v) in MeCN). Hierzu wurden 10 µl Probe mit 80 µl 0,2 M Boratpuffer (pH 8,8) versetzt und mit 10 µl ACQ-Lösung 10 min bei 55 °C inkubiert. Nach Zentrifugation für 10 min (15.000 g) erfolgte die Analyse mittels HPLC-Fluoreszenz Detektion.

### 2.5.2.2 Chromatographische Trennung

Die Auftrennung der Proben erfolgte auf einer RP-18 Säule (Phenomenex Aqua, 250 x 4,6 mm) an einem Waters *Aliance*-System (Deutschland, Eschborn) und die Analyten wurden mittels einen Fluoreszenzdetektor (JASCO) detektiert. Die quantitative Analyse der Aminosäurequinonderivate erfolgte bei den Wellenlängen  $\lambda_{\text{ex}}=300\text{nm}$  und  $\lambda_{\text{em}}=400\text{nm}$ .

#### HPLC-Bedingungen

Mobile Phase:                   A: 140 mM Natrium Acetate, pH 5.8 und 7 mM Triethanolamin  
   B: MeCN  
   C: Wasser (reinst. Merck)

Flussrate:                        1 mL min<sup>-1</sup>

Injektionsvolumen:            10 µl

Gradient:

Zeit [min]	%A	%B	Kurve
0,01	30,0	70,0	6
8,00	30,0	70,0	6
13,00	0,0	100,0	6
21,00	0,0	100,0	6
25,00	30,0	70,0	6

Kalibrierkurvengleichung:  $c(\text{Prolin})=\text{Peakfläche}/1693$ ,  $R^2=0,9847$

### 2.5.3 Polyaminanalyse – HPLC

#### 2.5.3.1 Derivatisierung

Die Derivatisierung erfolgte modifiziert nach Silveira et al. (2004). 20 µl filtriertes Medium wurde mit 20 µl 5 % HClO<sub>4</sub>, 20 µl Diaminoheptan (0,05 mM) als internen Standard und 50 µl gesättigtem NaCO<sub>3</sub> gemischt. Die Derivatisierung erfolgte anschließend durch Zugabe von 100 µl Dansylchlorid (5mg ml<sup>-1</sup>) und Inkubation bei 70 °C für 50 min in Dunkelheit. Der Ansatz wurde unter Zugabe von 25 µl Prolin (100mg ml<sup>-1</sup>) für weitere 30 min bei 70 °C inkubiert und um überschüssiges DCI zu Dansylprolin umzuwandeln. Die Probe wurde mit 200µl Toluol versetzt und extrahiert. 150 µl der Toluolphase wurden im Vakuum getrocknet und in gleichem Volumen MeCN resuspendiert.

#### 2.5.3.2 Chromatographische Trennung

Die Auftrennung der Proben erfolgte auf einer RP-18 Säule (Phenomenex Aqua, 250 x 4,6 mm) an einem Waters *Aliance*-System (Deutschland, Eschborn). Die Analyten wurden mittels einen Fluoreszenzdetektor (JASCO) detektiert. Die quantitative Analyse der Dansylderivate erfolgte bei den Wellenlängen  $\lambda_{\text{ex}}=340\text{nm}$  und  $\lambda_{\text{em}}=510\text{nm}$ .

#### HPLC-Bedingungen

Mobile Phase: A: 10% MeCN in H<sub>2</sub>O reinst (pH 3,5)  
 B: MeCN  
 Flussrate: 1 mL min<sup>-1</sup>  
 Injektionsvolumen: 10 µl  
 Gradient:

Zeit [min]	%A	%B	Kurve
0,01	30,0	70,0	6
8,00	30,0	70,0	6
13,00	0,0	100,0	6
21,00	0,0	100,0	6
25,00	30,0	70,0	6

### 2.5.4 Analyse extrazellulärer Proteine mittels LC-MS/MS

Ein mL konditioniertes Medium sowohl der Pollen- als auch Pistill-Kulturen wurde über einen 3kDa-Größenausschluss-Filter gegeben und zentrifugiert. Das Retentat wurde mit 300 µL einer 20 mM DTT-Lösung in Denaturierungspuffer (6M Guanidin, 0,1M Tris, 5 mM EDTA, pH ~8,0) bei 60°C für 1 h denaturiert und reduziert. Die Alkylierung erfolgte anschließend durch Zugabe von 100 µL 80mM Jodacetamid Lösung in Denaturierungspuffer und Inkubation für 30 min bei 37 °C. Anschließend wurde die Lösung durch Zentrifugation (ca. 15 min) entfernt und die gebundenen Proteine Zwei mal mit 0,2 M Ammoniumbicarbonat gewaschen. Die Proteine wurden mit einer Trypsinlösung in 0,2 M Ammoniumbicarbonat mit einem Trypsin/Protein-Verhältnis von ca. 1:50 verdaut über Nacht bei 37 °C verdaut. Das komplexe Peptidgemisch wurde schließlich abzentrifugiert, das Filtrat bis zur Trockenheit reduziert und bis zur weiteren Analyse bei -80 °C gelagert. Das Lösen der Peptide erfolgte in 0,1 % Ameisensäure. Die Trennung und Analyse der Peptide sowie die Auswertung der erhaltenen massenspektrometrischen Daten erfolgte wie in 2.3.3 beschrieben.

## 2.6 Mikroskopische Untersuchungen

### 2.6.1 Fluoreszenzmikroskopie

GFP markierte Mikrosporen der Transgenen NLS-GFP Linie wurden mit einem Konfokalen *Laser Scanning* Mikroskop, LSM 510 META (Carl Zeiss, Jena, Germany) untersucht. Zur Detektion der GFP Signale wurde eine Laser ( $\lambda_{EX}=488$  nm) und ein Bandpassfilter (505-530 nm) verwendet.

### 2.6.2 Transmissionselektronenmikroskopie

Die Probenvorbereitung und Generierung der Ultradünnschnitte der Pollenproben erfolgte nach Daghma et al. (2011). Die Färbung erfolgte mittels LEICA EM STAIN (Leica Microsystems, Wien, Austria). Zur Färbung wurden die Dünnschnitte mit 0,5 % Uranylacetat

(Ultrastain 1, Laurylab, Sain-fons, France) für 30 min und anschließend 90 s mit 3 % Blei-Citrat citrate (Ultrastain 2, Laurylab, Sain-Fons, France) inkubiert. Die Bildaufnahme erfolgte mit einem Transmissionselektronenmikroskop Tecnai 20 Sphera G2 (FEI, Eindhoven, Netherlands) bei 120 kV.

---

### 3 Ergebnisse

Die Ergebnisse dieser Arbeit sind in drei Hauptteile gegliedert und sollen hier zur Übersicht dargestellt werden.

In 3.1 werden physiologische und bioanalytische Untersuchungen während der **Induktion der Pollenembryogenese-Kompetenz** in 3.1.1 sowie während der **frühen Pollenembryogenese** (Abbildung 7) in 3.1.2 präsentiert. Eine Übersicht der Stadien ist in Abbildung 7 dargestellt.

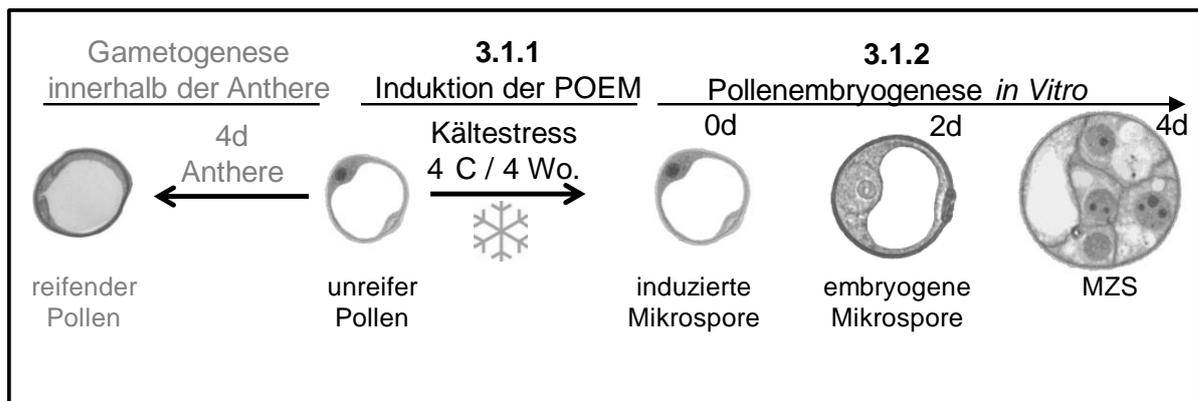


Abbildung 7: Übersicht der untersuchten Stadien innerhalb dieser Arbeit.

Vergleiche wurden jeweils während der Induktion der Pollenembryogenese-Kompetenz (3.1.1) und der frühen Pollenembryogenese (3.1.2) durchgeführt. Als Ausgangspunkt dienten immer unreife Pollen (2.v.1). Zum Vergleich wurden auch reifende gametophytische Pollen nach 4 d untersucht und hier in grau dargestellt. dargestellt.

Unter 3.2 sind die Ergebnisse der **Sekretomanalysen** aufgeführt. Hier konnten zahlreiche Substanzen identifiziert werden, die als potentielle Kandidaten für eine stimulierende Wirkung während der Pollenembryogenese in Frage kommen. Die **Reduzierung möglicher Substanzklassen durch Fraktionierung**, die essentiell für den stimulierenden Effekt sind, wird in 3.2.4 dargestellt. Die Überprüfung der Fraktionen erfolgte mit dem, in dieser Arbeit etablierten Biotest.

Im dritten Teil (3.3) werden die Ergebnisse der **Untersuchung spezifischer Gewebeteile der Pistille** und deren Einfluss auf die Co-Kultivierung vorgestellt.

### **3.1 Physiologische und bioanalytische Untersuchungen der Pollenembryogenese**

Innerhalb der Pollenembryogenese spielen zwei Abschnitte eine wesentliche Rolle. Zum einen ist dies die Induktion der Pollenembryogenese-Kompetenz durch Stress-Applikation. Und zum anderen ist der Verlauf der Entwicklung der ersten Tage während der Pollenembryogenese wichtig für die erfolgreiche Bildung von Kallus bzw. Embryonen.

Die Ergebnisse beziehen sich im ersten Teil auf die Induktion der Pollenembryogenese-Kompetenz und im zweiten Teil auf ausgewählte Aspekte während der ersten Tage der Pollenembryogenese.

#### **3.1.1 Untersuchung der Induktion der Pollenembryogenese-Kompetenz**

Ziel dieser Untersuchung war es, Veränderungen während der Induktion der Embryogenesekompetenz durch Stress auf zellulärer Ebene im Primärstoffwechsel und auf Proteinebene zu identifizieren. Daraus abgeleitete Ergebnisse können als Biomarker der Pollenembryogenese verwendet werden und können die bereits existierenden Transkriptdaten komplementieren. Daraus gewonnene Erkenntnisse können helfen, die zugrunde liegenden Mechanismen der Induktion der Pollenembryogenese-Kompetenz besser zu verstehen.

##### **3.1.1.1 Veränderungen des Primärstoffwechsels während der Induktion der Pollenembryogenese-Kompetenz**

Bis heute sind Änderungen im Primärstoffwechsel während der Induktion der Embryogenesekompetenz bei Gerste nicht genauer untersucht. Es ist lediglich bekannt, dass es nicht zu einer Einlagerung von Stärke kommen darf. Zusätzlich muss eine Art Hungerzustand induziert werden. Aus diesem Grund war das Ziel dieser Untersuchung zunächst einen Überblick über die Veränderungen des Primärstoffwechsels zu erhalten.

GC-MS Analysen sind besonders geeignet, um zunächst einen Überblick der relativen Abundanz verschiedener Primärmetabolitklassen zu messen. Zunächst sollte durch eine multivariate Hauptkomponentenanalyse untersucht werden, ob überhaupt Unterschiede zwischen den Proben der sich regulär entwickelnden und den induzierten Mikrosporen bestehen. Hierdurch konnten potentielle Embryogenese-spezifische Marker identifiziert werden. Zusätzlich wurden gametophytische Pollen untersucht um falschpositive Ergebnisse, die lediglich entwicklungspezifisch sind, auszuschließen. Repräsentative Totalionen-chromatogramme (TIC) der untersuchten Stadien sind in Abbildung 8 dargestellt, in denen bereits einige Unterschiede in den Signalintensitäten zu erkennen waren.

---

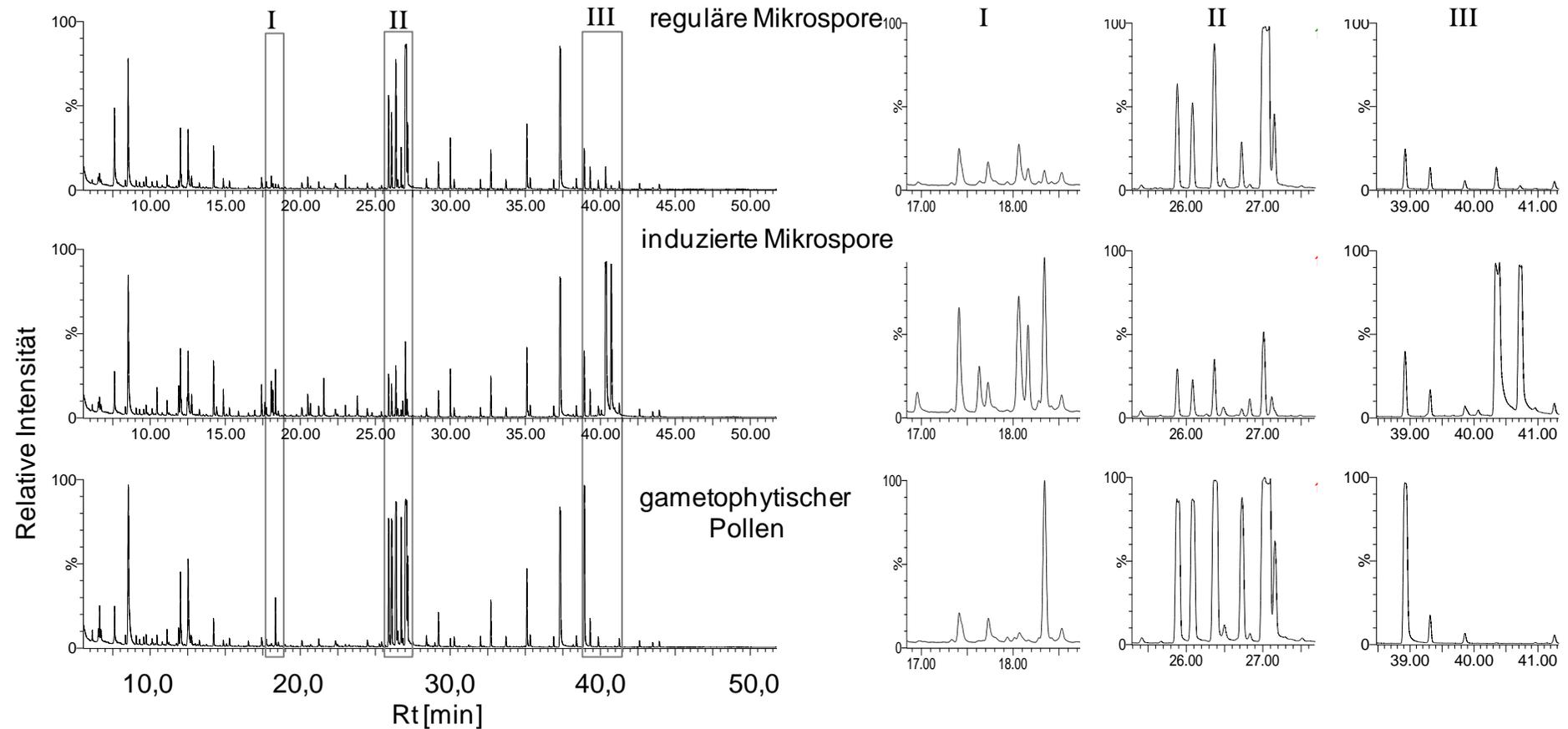


Abbildung 8: Repräsentative GC-MS Total Ionen Chromatogramme (TIC) polarer Metabolit-Extrakte von Mikrosporen.

Die Profile zeigen Chromatogramme von Kulturen vor (reguläre MS) und nach (induzierte MS) der Kältestressbehandlung und gametophytischen Pollen. Die relativen Intensitäten in 100 % betragen jeweils  $1,15 \cdot 10^5$  in allen Chromatogrammen. Die grau unterlegten Boxen (I-III) sind vergrößert rechts dargestellt um die ausgewählten Bereiche besser zu veranschaulichen.

Zur besseren Veranschaulichung wurden 3 ausgewählte Retentionszeitbereiche vergrößert abgebildet. Abschnitt I enthält einige organische Säuren. Im Zeitfenster des Abschnitts II eluierten Monosaccharide und Abschnitt III enthält die Gruppe der Disaccharide. Zur Visualisierung der Ergebnisse der einzelnen Stadien und eventuelle Gruppierungen diente eine Hauptkomponentenanalyse (HCA) (Abbildung 9).

Es konnte eine deutliche Gruppierung zwischen frisch isolierten, regulären Mikrosporen (RMS, blau) und kältestressbehandelten, induzierten Mikrosporen (IMS, grün) detektiert werden. Die gametophytisch entwickelten Mikrosporen unterscheiden sich deutlich von den induzierten Pollen. Es kann davon ausgegangen werden, dass ein Großteil der induzierten Mikrosporen auch tatsächlich Embryogenese-kompetent ist und keine falschpositiven Kulturen isoliert wurden.

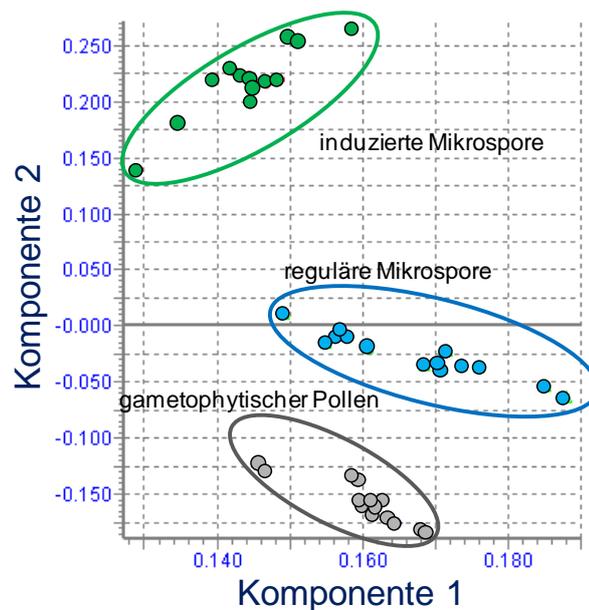


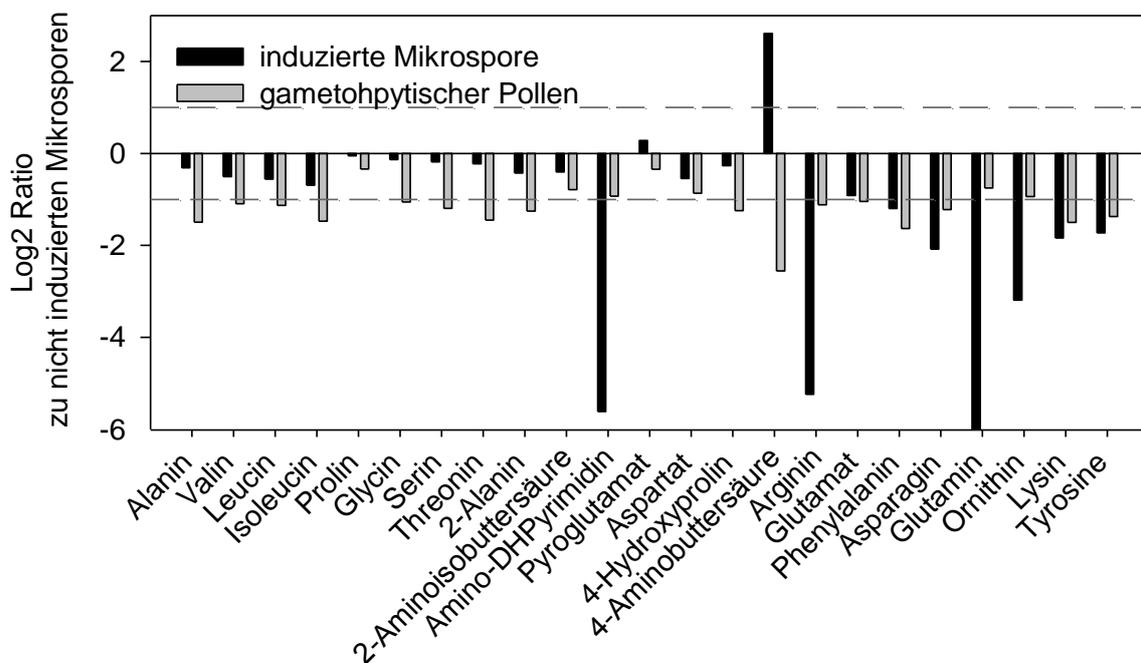
Abbildung 9: Hauptkomponentenanalyse der GC-MS Daten von Mikrosporen.

Metabolitprofile von Kulturen vor (reguläre MS, blau) und nach (induzierte MS, grün) der Kältestressbehandlung sowie 4 Tage älteren gametophytischen Pollen (schwarz) wurden gegeneinander aufgetragen. Die einzelnen Gruppen entsprechen jeweils 3 biologischen und 5 technischen Replikaten. Deutlich zu sehen ist eine Gruppierung der einzelnen Stadien. Die Auswertung der Daten erfolgte mit MarkerLynx (Waters, Deutschland) und einem Paretoplot.

Die Exakte-Masse-Retentionzeitpaare, die im Wesentlichen für die Separierung der einzelnen Gruppen verantwortlich sind, konnten als Aminosäuren (z.B. Glutamin, GABA) und Zuckerderivate, wie Galactinol, Saccharose oder Maltose annotiert werden. Im Weiteren soll auf die einzelnen Substanzklassen des Primärstoffwechsels, die mithilfe der GC-MS Messung detektiert und annotiert wurden, näher eingegangen werden. Insgesamt konnten 65 Metabolite detektiert werden und relativ quantifiziert werden. Neun Metabolite sind bis jetzt nicht

identifiziert worden und konnten so keiner Substanzklasse zugeordnet werden. Die einzelnen Metabolitklassen sind im darauffolgenden Abschnitt näher beschrieben.

**Aminosäuren** sind wichtige Edukte der Proteinbiosynthese und Speichermetabolite für Stockstoff. Es konnten 17 proteinogene und 6 nichtproteinogene Aminosäuren oder Derivate eindeutig identifiziert werden. In den induzierten Mikrosporen wurde für keine proteinogene Aminosäure eine höhere Abundanz gegenüber regulären Mikrosporen festgestellt. Glutamin, Arginin und ein Aminoderivat (5Aminocarboxy-4,6-Dihydroxypyrimidin) zeigten eine deutliche verringerte Konzentration nach Kältestressbehandlung. Auch Ornithin, Tyrosin und Lysin waren mindestens 2-fach geringer abundant. Als einzige Aminosäure, die eine höhere Konzentration nach Induktion aufwies, ist die  $\gamma$ -Aminobuttersäure (GABA) zu nennen. Diese nichtproteinogene Aminosäure war in 4-fach höherer Abundanz in induzierten Mikrosporen detektiert worden.



**Abbildung 10: Relative Abundanz der annotierten Aminosäuren im Verhältnis zu regulären nicht induzierten Mikrosporen.**

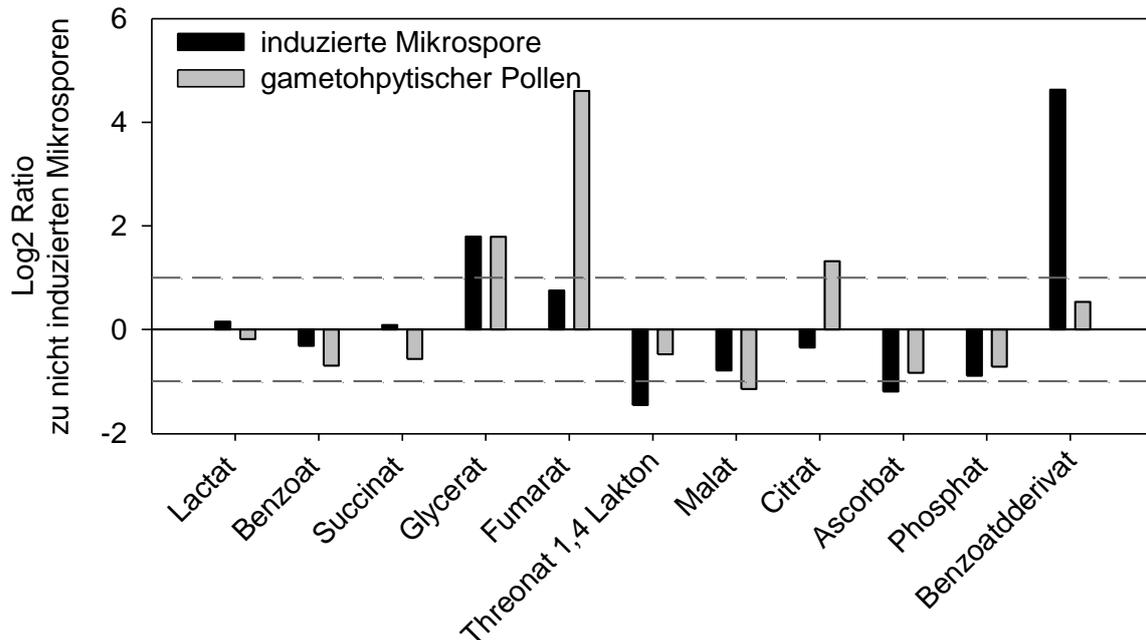
Die  $\text{LOG}_2$ -Verhältnisse sind jeweils für die induzierten Mikrosporen (schwarz) und für gametophytische Pollen (grau) aufgetragen. Als regulierte bzw. veränderte Konzentrationen wurden nur die gewertet, welche über der dem Schwellenwert einer 2-fachen Regulation (graue gestrichelte Linie) detektiert wurden. Die Werte beinhalten jeweils 3 biologische Replikate. (Amino-DHPyrimidin = 5 Aminocarboxy-4,6-dihydropyrimidin)

Wie bereits angemerkt, wurden auch die Verhältnisse der gametophytischen Pollen mit regulären Mikrosporen verglichen. Diese Werte sind von Interesse, weil somit spezifische Stoffwechselveränderungen durch die Stressbehandlung und mit der normalen Pollenentwicklung verglichen werden können. Bei gleicher Regulation kann davon

ausgegangen werden, dass es sich nicht um spezifische Änderungen handelte. Es zeigte sich, dass die nach Kältestress deutlich geringer abundanten Aminosäuren Arginin, Glutamin, und Ornithin während der regulären Pollenentwicklung nicht so stark abnahmen. Für die anderen Aminosäuren wurden ähnliche Verhältnisse detektiert, auch wenn für den Großteil eine tendenziell geringere Konzentration gefunden wurde. Auffällig ist die konträre Regulation von GABA, welche in induzierten Mikrosporen höher und in gametophytischem Pollen geringer abundant ist gegenüber nicht induzierten Mikrosporen. Somit könnte das eine spezifische Regulierung durch die Kältestressbehandlung sein und als potentiell spezifischer Marker für eine Pollenembryogenese-Kompetenz postuliert werden.

**Organische Säuren** welche mithilfe dieser Messung detektiert wurden, sind unter anderem Intermediate des TCA-Zyklus sowie andere Säuren wie Benzoesäure und ein bis jetzt nicht näher charakterisiertes Derivat davon. Auch Glycerinsäure, Phosphat oder Lactat konnten detektiert werden. Die relativen Abundanzen im Verhältnis zu regulären Mikrosporen sind in Abbildung 11 dargestellt. Bei Glycerinsäure könnte es sich auch um ein Artefakt von Phosphoglycerat handeln könnte, welches durch die Derivatisierungsprozesse entstanden ist. Nach Kältestressbehandlung konnte für die Säuren des TCA-Zyklus keine Regulation über dem definierten Schwellenwert detektiert werden (Abbildung 11). Somit ist durch diese Untersuchung keine eindeutige Aussage über Veränderungen innerhalb des Zitronensäurezyklus und der Änderung dieses Stoffwechselabschnitts möglich. Verglichen mit den Werten in der gametophytischen Entwicklung waren Intermediate des TCA-Zyklus und somit auch des Energiestoffwechsels in Kältestress behandelten Kulturen weniger abundant. Dies wird durch die wesentlich höheren Verhältniswerte von gametophytischen Pollen bei Fumarat (16-fach) und Citrat (2-fach) deutlich. Phosphat, Lactat und Benzoat lagen auch unterhalb des definierten Schwellenwertes. Ein als Benzoesäurederivat annotierter Metabolit war 16-fach höher abundant nach Kältestressinduktion, jedoch nicht in der gametophytischen Pollenentwicklung. Somit könnte dieser Metabolit einen spezifischen Marker der Embryogeneseinduktion darstellen. Leider war es bis zum jetzigen Zeitpunkt nicht möglich, die genaue Struktur dieses Metaboliten zu bestimmen. Somit ist eine Zuordnung zu bestimmten Stoffwechselwegen und deren mögliche Bedeutung während der Induktion nicht möglich.

---



**Abbildung 11: Relative Abundanz der annotierten Säuren im Verhältnis zu regulären nicht induzierten Mikrosporen.**

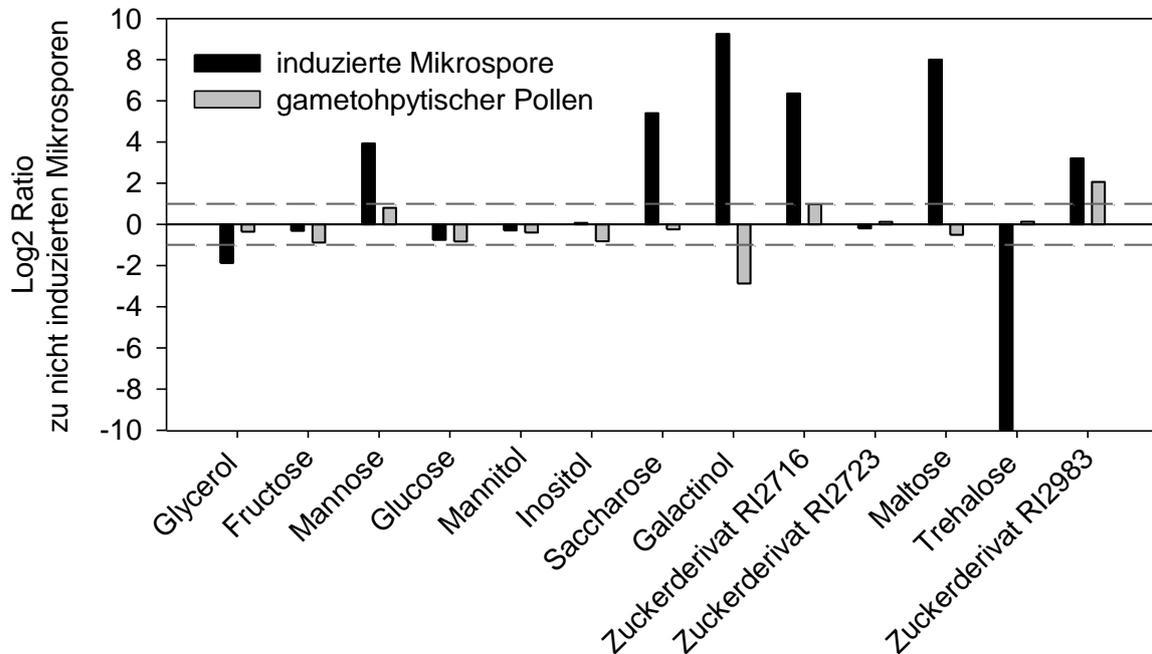
Die LOG<sub>2</sub>-Verhältnisse sind jeweils für die induzierten Mikrosporen (schwarz) und für gametophytische Pollen (grau) aufgetragen. Als regulierte bzw. veränderte Konzentrationen wurden nur die gewertet, welche über der dem Schwellenwert einer 2-fachen Regulation (graue gestrichelte Linie) detektiert wurden. Die Werte beinhalten jeweils 3 biologische Replikate.

### Zucker und Zuckerderivate

Da Zucker und die entsprechenden Intermediate eine wesentliche Rolle im Metabolismus der Stärke spielen, waren diese Metabolite von besonderem Interesse. Dreizehn Metabolite konnten in diese Gruppe eingeordnet werden. Die Hauptedukte der Glykolyse, Glucose und Fruktose zeigten keine Änderung nach Kältestressbehandlung, was darauf hindeutet, dass es hier zu keiner Änderung im Stoffwechsel kommt. Allerdings konnten in dieser Untersuchung keine Zuckerphosphate detektiert werden, die innerhalb der Folgereaktionen in der Glykolyse entstehen. Die Dissaccharide Saccharose, Maltose das Hauptabbauprodukt der Stärke oder der Zuckeralkohol Galactinol waren nach der Kältestressbehandlung in deutlich höheren Konzentrationen zu finden. Dabei scheint es sich auch um spezifische Änderungen zu handeln, da eine solche Veränderung in gametophytischen Pollen nicht zu erkennen war. Bei Galactinol, konnte sogar eine gegensätzliche Regulation festgestellt werden.

Auffällig ist auch, dass Trehalose, ein bei Stress typischerweise induziertes Signalmolekül, nach Stressbehandlung in einer geringeren Konzentration vorlag. Allerdings ist diese Regulation auch Pollenembryogenese-spezifisch, da sich innerhalb der gametophytischen

Entwicklung die Trehalose-Konzentration nicht änderte. Zusätzlich konnten in diese Gruppe drei Zuckerderivate eingeordnet werden, die noch nicht weiter annotiert wurden. Aber anhand der charakteristischen Fragmentmassen für Zucker ist die Annotierung dieser Metabolite als Zucker, jedoch keine Zuordnung zu bestimmten Stoffwechselwegen möglich.



**Abbildung 12: Relative Abundanz der annotierten Zucker(derivate) im Verhältnis zu regulären nicht induzierten Mikrosporen.**

Die  $\text{LOG}_2$ -Verhältnisse sind jeweils für die induzierten Mikrosporen (schwarz) und für gametophytische Pollen (nach 4d, grau) aufgetragen. Als regulierte bzw. veränderte Konzentrationen wurden nur die gezählt, welche über der dem Schwellenwert einer 2-fachen Regulation detektiert wurde. Die Werte beinhalten jeweils 3 biologische Replikate.

Weitere Primärmetabolite, die in dieser Untersuchung detektiert wurden gehören zu Fettsäuren, Aminen und bis zum jetzigen Zeitpunkt nicht identifizierten Substanzen. Die unbekannt Metabolite sind daher nur mit ihrem spezifischen Retentionszeitindex annotiert. Die Fettsäuren waren tendenziell unterhalb der Konzentration in regulären Mikrosporen detektiert. Außer für Laureat, lagen diese Werte jedoch unterhalb des signifikanten Schwellenwertes (graue Linie) und scheinen somit nicht nachweisbar in die Induktion der Pollenembryogenese involviert zu sein.

Ein wichtiger regulatorischer Metabolit mit vielseitigen Wirkungen, Putrescin, zeigte auch keine Änderung. Die Konzentration von Harnstoff als weiteres Amin war hingegen in den induzierten Kulturen niedriger. In der gametophytischen Entwicklung fand keine Konzentrationsänderung statt.

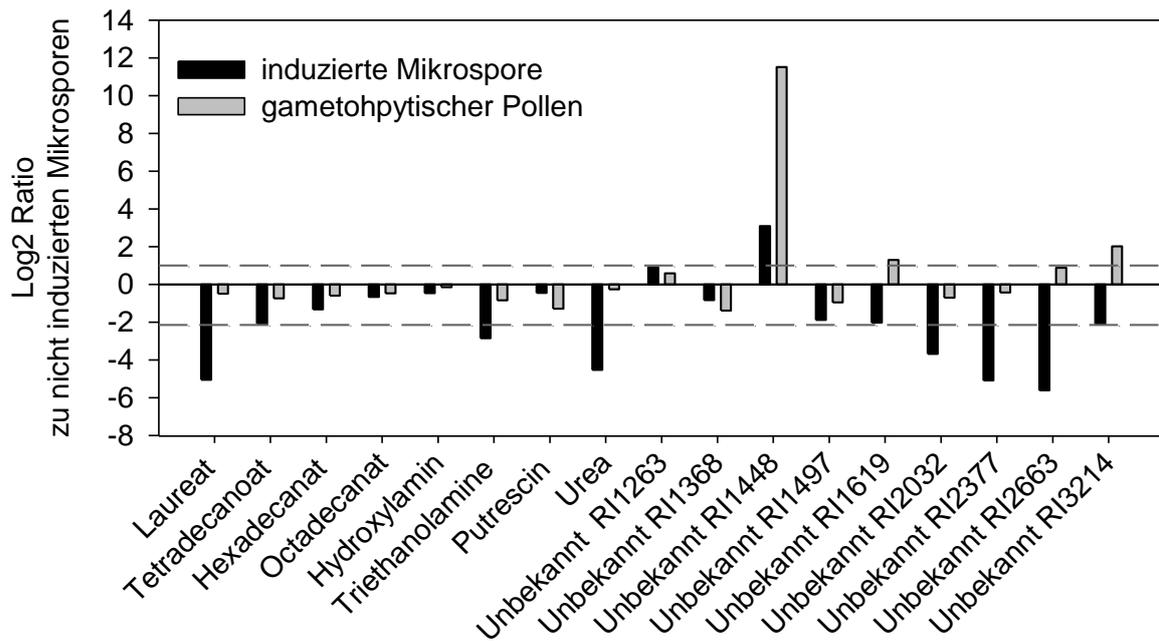


Abbildung 13: Relative Abundanz weiterer detektierter Primärmetabolite (Fettsäuren, Amine, nicht annotierte Substanzen) im Verhältnis zu nicht induzierten Mikrosporen und gametophytischen Pollen.

Die  $\text{LOG}_2$ -Verhältnisse sind jeweils für die induzierten Mikrosporen (schwarz) und für gametophytische Pollen (grau) aufgetragen. Als regulierte bzw. veränderte Konzentrationen wurden nur diejenigen gezählt, welche über der dem Schwellenwert einer 2-fachen Regulation detektiert wurde. Die Werte beinhalten jeweils 3 biologische Replikate.

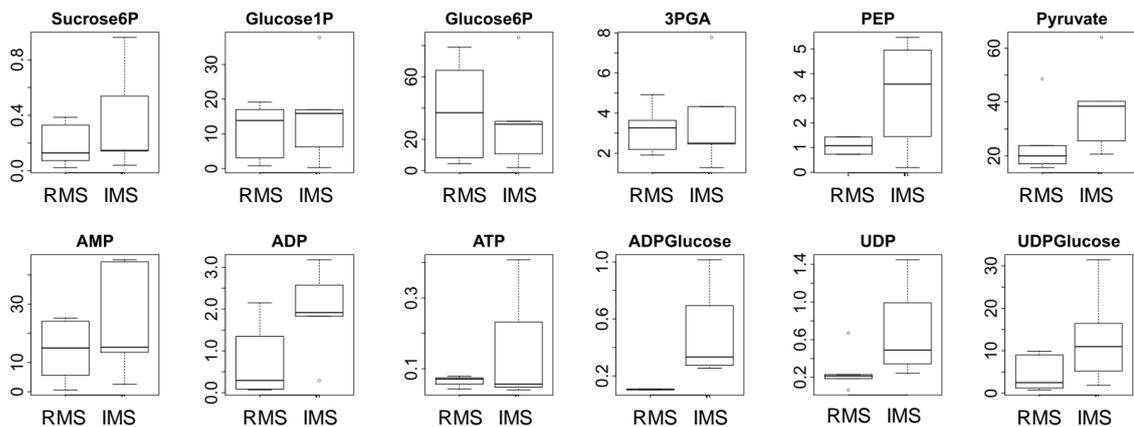
Anhand des Profils primärer Stoffwechselprodukte und deren Änderung während der induzierten Pollenembryogenese-Kompetenz konnte folgendes gezeigt werden.

- Eine deutliche Gruppierung der einzelnen Entwicklungszustände innerhalb der HCA
- Die meisten Aminosäuren wiesen keine signifikante Regulation nach Kältestressbehandlung im Vergleich zu regulären Mikrosporen auf.
- Das Verhältnis von GABA im Gegensatz zu den anderen Aminosäuren in Embryogenese induzierten Mikrosporen positiv reguliert war.
- Intermediate des TCA-Zyklus waren nach der Kältestressbehandlung nicht signifikant verändert.
- Citrat und Fumarat zeigten aber deutlich unterschiedliche Abundanzen im Vergleich zur gametophytischen Entwicklung.
- Abbauprodukte von Stärke, wie Maltose und Saccharose waren höher abundant in induzierten Mikrosporen.

In der vorangegangenen Untersuchung war es nicht möglich phosphorylierte Intermediate des Energiestoffwechsels (Glykolyse/TCA-Zyklus/Stärkebiosynthese) zu detektieren. Zur Komplementierung der Daten wurden phosphorylierte Metabolite gezielt analysiert. Die phosphorylierten Metabolite spielen eine wichtige Rolle bei der Bereitstellung und

Speicherung von Energie. Da die Induktion der Pollenembryogenese-Kompetenz in Verbindung mit einem Hungerzustand erfolgt, sind diese Metabolite von zusätzlichem Interesse.

In Abbildung 14 sind die verschiedenen Intermediate aufgeführt. Eine signifikante Änderung der Hexosephosphate nach Stressinduktion war nicht zu erkennen. Auch die Konzentrationen an Glucose-1-P und Saccharose-6-P waren nicht verändert. Die nachgelagerten Intermediate der Glykolyse, 3PGA, PEP und Pyruvat zeigten im Mittel eine leicht erhöhte Konzentration nach Stressinduktion, welche jedoch nicht signifikant ist. Auch die Nukleotide und -zucker zeigten keine signifikante Regulierung. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die gemessenen Konzentrationen keine eindeutige Aussage über den Energiestatus und die Regulation der Glykolyse bzw. Stärkemetabolismus zulassen.



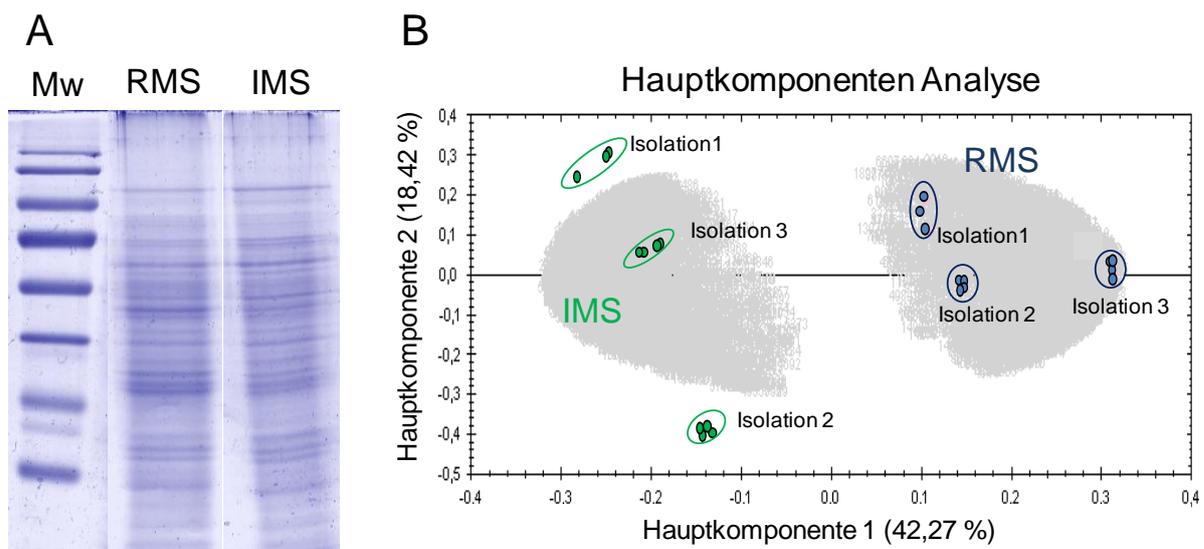
**Abbildung 14:** Relative gemessene Intensitäten (pmol/µl Injektionsvolumen) phosphorylierter Metabolite des Primärstoffwechsels von regulären Mikrosporen (RMS) und Stress-induzierten Mikrosporen (IMS).

Gezeigt sind jeweils die Werte von 4 unabhängigen Messungen als Boxplot mit dem dazugehörigen Median. Die Messungen wurden mittels HPLC-IC-MS durchgeführt und die entsprechenden Massensignale für die Berechnung der Intensitäten verwendet.

### 3.1.1.2 Proteinmuster während der Induktion der Pollenembryogenese-Kompetenz

#### 3.1.1.2.1 Vergleich der Proteinmuster zeigt eine eindeutige Gruppierung regulärer vs. induzierter Pollenembryogenese-kompetenter Mikrosporen

Zunächst sollte einen Überblick der Proteinmuster vor und nach Induktion der Pollenembryogenese-Kompetenz erhalten werden. Damit konnte überprüft werden, ob es auf Proteinebene generell zu Veränderungen während der Induktion durch Kältestress kommt. Abbildung 15A zeigt zunächst die Auftrennung der Proteine mittels 1D SDS-PAGE. Mit dieser Methode waren zunächst keine deutlichen Unterschiede im Bandenmuster zwischen den beiden Mikrosporenkulturen zu erkennen. Eine wesentlich bessere Auftrennung und sensitivere Detektion des komplexen Proteingemischs wurde anschließend mit LC-MS durchgeführt. Die Hauptkomponentenanalyse der tryptisch verdauten Peptide drei unabhängiger Isolierungen ergab eine deutliche Gruppierung von regulären und induzierten Mikrosporen in der Hauptkomponente 1 (Abbildung 15B).



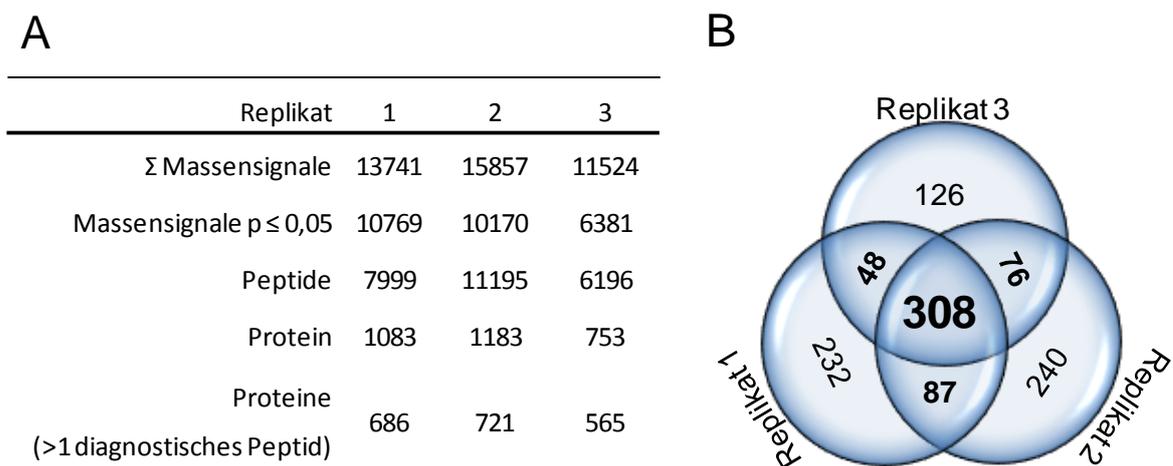
**Abbildung 15:** Vergleich der Proteinmuster regulärer, frisch isolierter (RMS) und induzierter Pollenembryogenese-kompetenter Mikrosporen: A) Auftrennung der Proteine für Isolation 1 mittels 1D SDS-PAGE (12 %) und anschließender Färbung durch colloidales *Coomassie Brilliant Blue* (cCBB). Mw - Proteinmarker, RMS - reguläre Mikrospore, IMS - induzierte Mikrospore.

B) Hauptkomponentenanalyse von regulären Mikrosporen (RMS) und kältevorbehandelten induzierten embryogenen Mikrosporen (IMS). Tryptisch verdaut Peptide des kompletten isolierten Proteoms 3 unabhängiger Ernten mit jeweils 3 oder 4 technischen Replikaten wurden mit nanoUPLC-QTOF-MS analysiert und für die HCA verwendet. Die Varianz zwischen RMS und IMS als auch der biologische Einfluss zwischen unabhängigen Isolationen ist dabei zu sehen.

Diese bildete mit 42,27 % die größte Varianz ab. Allerdings divergierten auch die biologischen Replikate eines Zustandes untereinander (Abbildung 15B). Diese Unterschiede tragen mit 18,42 % (Hauptkomponente 2) zu der Verteilung bei. Bei induzierten Pollen ist dieser Unterschied besonders groß. Das verdeutlicht wie stark die Veränderung auf

Proteinebene während der Induktion der Pollenembryogenese-Kompetenz auch vom ursprünglichen Ausgangsmaterial abhängt.

Die weitere Auswertung der Daten erfolgte deshalb zunächst innerhalb der biologischen Replikate um anschließend die Ergebnisse der einzelnen Experimente nach Prozessierung der technischen Replikate zu vereinen. Die Auswertung der einzelnen biologischen Replikate ergab 13741, 15857 und 11524 sogenannte *Massensignale*. 10769, 10170, 6381 hatten einen p-Wert  $\leq 0,05$  und wurden für die weiter Auswertung verwendet. Diese konnten zunächst 7999, 11195 und 6196 Peptiden zugeordnet werden. Daraus ergab sich eine Anzahl annotierter Proteine von 1083, 1183 bzw. 753. Für die weitere Auswertung wurden jedoch nur Proteine verwendet, die mit mindestens einem diagnostischen Peptid identifiziert wurden (Abbildung 16A). Nach Vereinigung dieser Daten, konnten 308 Proteine in allen 3 biologischen Replikaten gefunden werden (Abbildung 16B).



**Abbildung 16: Anzahl der identifizierten Proteine aus allen 3 biologischen Replikaten.**

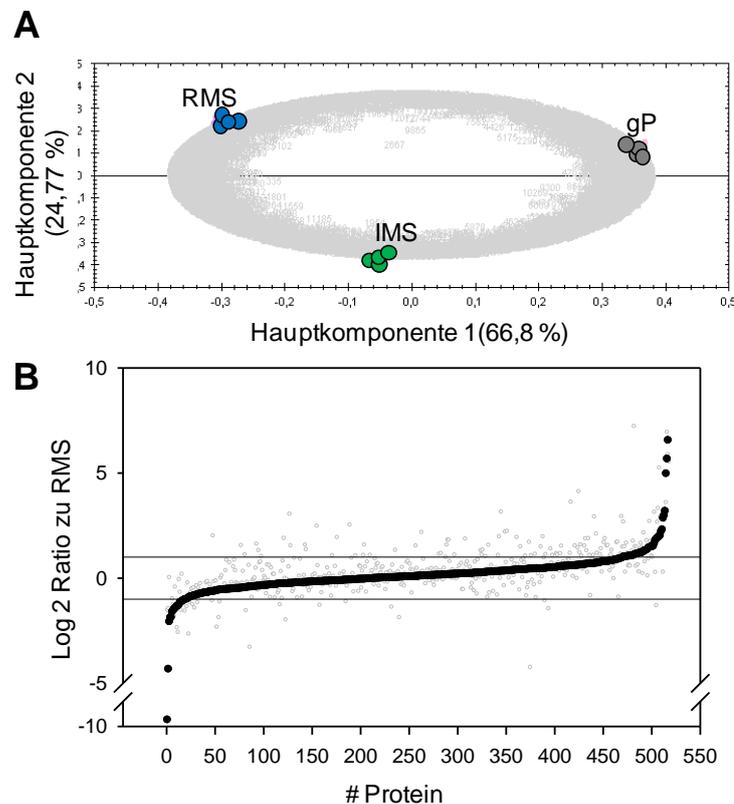
**A) EMRT-Cluster der 3 biologischen Replikate mit jeweils 4 technischen Wiederholungen. Die Summe der Massensignale sind alle in 4 technischen Replikaten identifizierten EMRT Paare. Nur Signale mit einem p-Wert kleiner 0,05 wurden für die weitere Prozessierung verwendet. Peptide sind nur die Signale, welche entsprechenden Aminosäuresequenzen zugeordnet wurden. Für die weitere Auswertung wurden nur Proteine mit mindestens einem diagnostischen Peptid verwendet.**

**B) Überlappung der Proteine die mit mindestens einem diagnostischen Peptid in den drei biologischen Replikaten identifiziert wurden.**

### 3.1.1.2.2 Änderungen während der Pollenembryogenese die spezifisch oder auch in der gametophytischen Entwicklung vorhanden sind

Es konnte durch mikroskopische Untersuchungen festgestellt werden, dass nicht 100 % der Zellen eine embryogene Entwicklung durchlaufen. Um falschpositive Rückschlüsse zu vermeiden, wurde zusätzlich eine Varianzanalyse durchgeführt, bei der die Proben einer gametophytischen Entwicklung mit integriert sind. Wie in Abbildung 15A bereits

beschrieben, kommt es innerhalb der biologischen Replikate zu erheblichen Abweichungen. Deshalb wurden für diese Überprüfung die Isolationen mit drei technischen Replikaten einzeln betrachtet. Dabei zeigte sich eine klare Separierung der einzelnen Entwicklungsstadien. In der Hauptkomponentenanalyse für Isolation 1 (Abbildung 17A) ist die Hauptkomponente 1 mit 66,8 % für die Varianz zwischen den Stadien verantwortlich. Die weiteren HCA der anderen biologischen Replikate können dem Anhang Abbildung 57 entnommen werden. Auch hier zeigen sich ähnliche Verteilungen. Zusätzlich ist die Auftragung aller identifizierten Proteine aus den 3 unabhängigen Isolationen in Abbildung 17B gezeigt. Hier zeigt sich, dass die meisten Proteine eine andere Expression in der gametophytischen Entwicklung gegenüber PollenEmbryogenese-kompetenten Kulturen aufwiesen.



**Abbildung 17:** Vergleichende Proteinanalyse zwischen regulären (RMS) und induzierten Mikrosporen (IMS) sowie der gametophytischen Pollenentwicklung.

**A)** Hauptkomponentenanalyse eines biologischen Replikates mit jeweils 4 technischen Replikaten. Aufgetragen wurden alle EMRT-Werte, mit einem  $p$ -Wert  $< 0,05$  (ANOVA).

**B)** Log<sub>2</sub> transformierte Mittelwerte der Verhältnisse aller biologischen Replikate von induzierten Mikrosporen zu regulären Mikrosporen (schwarz). Zur Überprüfung einer unterschiedlichen Regulation in gametophytischen Pollen sind die entsprechenden Verhältnisse der gleichen Protein # in grau hinterlegt.

### 3.1.1.3 Veränderungen des Primärstoffwechsels auf Proteinebene – Enzyme der Glykolyse und des TCA-Zyklus

Es sollten eventuelle Korrelationen mit den Metabolitdaten des Primär-Energiestoffwechsel speziell der Glykolyse und des TCA-Zyklus identifiziert werden. Die Gruppierung der annotierten Proteine in funktionellen Kategorien zeigte eine hohe Abdeckung der Enzyme des Energiestoffwechsels (siehe dazu Anhang Abbildung 56). Verdeutlicht wird dies auch durch Abbildung 18.

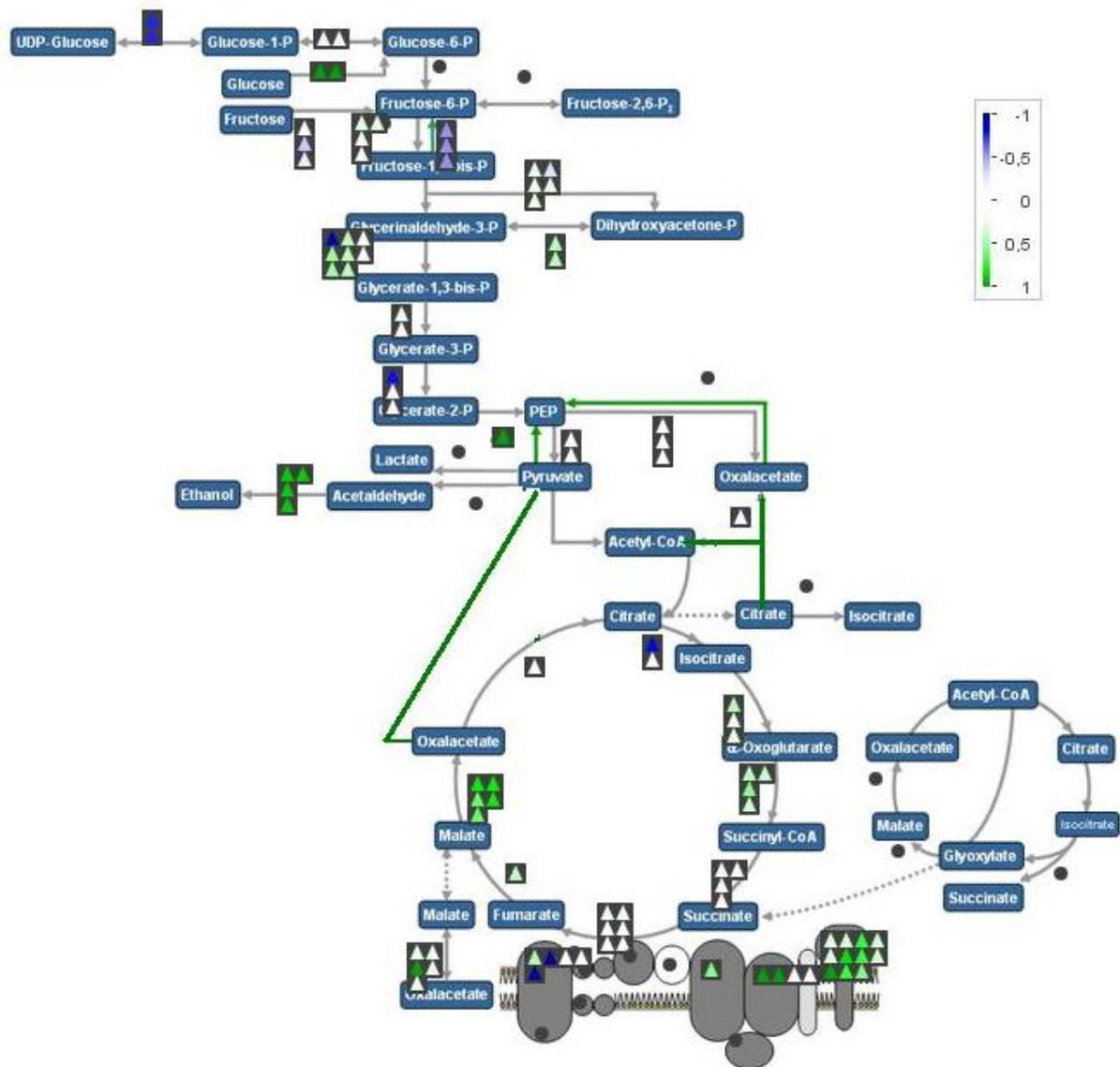


Abbildung 18: Abdeckung und Regulierung der annotierten Proteine aus Glykolyse, Krebszyklus und der Atmungskette.

Der Stoffwechselweg sowie die Enzymannotierung wurde dargestellt nach der Vorlage von MapMan 3.5Beta. Proteine mit einer erhöhten Abundanz sind grün dargestellt und blau entsprechend Proteine mit geringeren Intensitäten. Graue Kreise stellen nicht identifizierte Proteine dar.

Innerhalb des Krebszyklus sind einige Enzymgruppen höher abundant oder zeigen eine gleichbleibende Abundanz. Lediglich die Aconitase, welche mit zwei Isoformen annotiert

wurde, zeigte innerhalb einer Isoform eine geringere Abundanz. Im Gegensatz dazu wurden erhöhte Intensitäten bei Protein-ID der Malatdehydrogenase detektiert.

Hier kann jedoch aufgrund der unvollständigen Sequenzierung, keine genaue Aussage über die Lokalisierung getroffen werden. Die Zuordnung der jeweiligen Harvest\_35 IDs zu den entsprechenden Contig-Bins für MapMan deuten jedoch darauf hin, dass sowohl die cytosolische Form als auch die mitochondriale eine stärkere Expression in den embryogenen Kulturen aufwiesen.

#### **3.1.1.4 Signifikant unterschiedlich abundante Proteine in allen biologischen Replikaten**

In Tabelle 4 sind die Proteine zusammengefasst, welche innerhalb aller biologischen und technischen Replikate eine signifikante Regulation und innerhalb der Replikate einen p-Wert  $< 0,05$  aufwiesen. Neben den bereits aufgezeigten Proteinen der Glykolyse und des TCA Zyklus, konnten weitere interessante Kandidaten annotiert werden, die eventuell als Biomarker während der Induktion der Embryogenese-Kompetenz postuliert werden können.

Darunter zählen Proteine die eine wichtige Rolle in der Reduktion bzw. Regulation von oxidativem Stress spielen. So konnte eine erhöhte Abundanz einer Ascorbat-Oxidase (35\_21226), von Disulfidisomerasen (35\_14571& 35\_15052) und einer Thioredoxin-Peroxidase (35\_837), detektiert werden. Weitere Proteine spielen innerhalb der Signaltransduktion eine wichtige Rolle. So wurden beispielsweise ein *Rac GDP-dissociation inhibitor* (35\_9360) und das Calcium-bindende Protein Calmodulin (35\_9360) annotiert, die in Embryogenese-kompetenten Kulturen eine höhere Expression zeigten. In einer weiteren Gruppe, den Translationsinitiation-Faktoren, konnten auch einige Proteine in höherer Abundanz nach Kältestressbehandlung identifiziert werden. Im Gegensatz zu den bereits genannten Proteinen zeigten Proteine des Energiestoffwechsels, wie ATPasen und Proteine des Primärstoffwechsels eine geringere Abundanz. Proteine des Proteasomes und deren Co-Proteine zeigten ein differentielles Bild. Auch ribosomale Proteine konnten sowohl in höherer als auch niedrigerer Abundanz identifiziert werden.

Weiterhin wurde eine höhere Abundanz der Alkoholdehydrogenase (35\_14205) nach Stressbehandlung detektiert. Dies weist auf mögliche anaerobe Bedingungen während der induktiven Behandlung hin. Die Veränderung der Abundanz an detektiertem Histon (35\_24034) nach der Stressbehandlung war am stärksten ausgeprägt, was auch auf eine Remodellierung der DNA hinweist.

Tabelle 4: Proteinidentifizierung der am stärksten regulierten Proteine nach Induktion der Pollenembryogenese-Kompetenz mittels Kältestress.

Identifizierer der Harvest Datenbank (Harvest\_35 ID) wurden mit dem *Basic Local Alignment Tool* (BLAST) gegen die UniRef\_90 Datenbank Akzessionen gesucht. Die dazugehörige Beschreibung wurde dem entsprechenden UniRef\_90 Eintrag entnommen. Log2 Wert ist das Verhältnis der Mittelwerte aus embryogenen Pollen zu regulären gametophytischen Mikrosporen.

Harvest_35 ID	UniRef90 ID	log2 Ratio			Mittelwert	Proteinname	Organismus
		n1	n2	n3			
<u>Höhere Abundanz nach Induktion</u>							
35_24034	Q7XUC9	1.49	5.00	5.06	3.85	HISTONE H4	<i>Oryza sativa</i>
35_9360	Q8S081	2.83	0.14	1.56	1.51	Putative Rac GDP-dissociation inhibitor	<i>Oryza sativa</i>
35_14178	Q7F8I8	1.72	1.43	1.22	1.45	Calmodulin-1	<i>Oryza sativa</i>
35_3755	Q2R8U1	2.00	1.41	0.85	1.42	Expressed protein (Serine Endopeptidase)	<i>Oryza sativa</i>
35_18901	P22285	1.28	0.66	2.00	1.32	Pollen allergen KBG 41 precursor	<i>Poa pratensis</i>
35_22826	Q94JN3	1.42	1.26	1.08	1.25	Profilin	<i>Musa acuminata</i>
35_17646	Q6EPR4	1.03	0.97	1.49	1.16	Putative chaperone GrpE type 2	<i>Oryza sativa</i>
35_16260	P92683	0.90	1.53	0.75	1.06	Cytochrome c oxidase subunit Vb	<i>Oryza sativa</i>
35_15295	Q7XXS0	1.14	0.24	1.61	1.00	Hypothetical protein (ATP Synthase)	<i>Oryza sativa</i>
35_39891	P20359	0.94	0.97	1.00	0.97	Actin	<i>Oryza sativa</i>
35_15404	Q8L808	1.25	1.15	0.50	0.97	Putative cytochrome C oxidase subunit	<i>Triticum aestivum</i>
35_13640	Q00Y36	0.67	0.33	1.75	0.92	Ubiquitin/60s ribosomal protein L40 fusion	<i>Ostreococcus tauri</i>
35_39122	Q8W2Z9	0.73	1.41	0.51	0.88	Unnamed protein product - <i>Oryza sativa</i>	<i>Oryza sativa</i>
35_366	P50299	1.44	0.92	0.09	0.82	S-adenosylmethionine synthetase 1	<i>Hordeum vulgare</i>
35_14205	P05336	0.33	1.11	1.01	0.82	Alcohol dehydrogenase 1	<i>Hordeum vulgare</i>
35_15614	Q5Z6P9	0.29	2.03	0.06	0.79	Putative RAD23 protein	<i>Oryza sativa</i>
35_41584	P29546	0.34	0.94	0.91	0.73	Elongation factor 1-beta	<i>Triticum aestivum</i>
35_665	P41377	0.58	0.91	0.70	0.73	Eukaryotic initiation factor 4A	<i>Arabidopsis thaliana</i>
35_165	Q7FSL4	1.00	0.90	0.29	0.73	Malate dehydrogenase	<i>Oryza sativa</i>
35_39325	Q8W2Z9	0.69	1.25	0.20	0.71	Unnamed protein product	<i>Oryza sativa</i>
35_16812	Q9XGY5	0.67	0.44	1.02	0.71	Mitochondrial import inner membrane translocase subunit Tim13	<i>Oryza sativa</i>

Harvest_35 ID	UniRef90 ID	log2 Ratio				Mittelwert	Proteinname	Organismus
		n1	n2	n3				
35_14680	Q5XUV7	1.07	0.67	0.36	0.70	20S proteasome beta 4 subunit -	<i>Triticum aestivum</i>	
35_15958	Q6K456	0.59	0.91	0.50	0.66	Putative plastid protein	<i>Oryza sativa</i>	
35_14477	Q3S4I1	1.02	0.36	0.56	0.65	Eukaryotic translation initiation factor 5A1	<i>Triticum aestivum</i>	
35_15224	Q2QV45	0.84	0.36	0.71	0.63	Stromal 70 kDa heat shock-related protein	<i>Oryza sativa</i>	
35_15350	Q6IY71	0.67	0.23	0.93	0.61	Mitochondrial ATP synthase	<i>Wheat</i>	
35_14571	P52589	0.64	0.47	0.68	0.60	Protein disulfide-isomerase precursor	<i>Triticum aestivum</i>	
35_21226	Q942J6	0.56	0.68	0.55	0.60	Putative L-ascorbate oxidase	<i>Oryza sativa</i>	
35_14329	P18026	0.26	0.55	0.92	0.58	Tubulin beta-2 chain	<i>Zea mays</i>	
35_7460	P22285	0.76	0.32	0.62	0.57	Pollen allergen KBG 41 precursor	<i>Poa pratensis</i>	
35_1043	Q5TKF4	0.34	0.26	1.09	0.56	Putative nucleoside diphosphate kinase	<i>Oryza sativa</i>	
35_556	Q2R4A1	0.28	1.12	0.24	0.55	40S ribosomal protein S5	<i>Oryza sativa</i>	
35_15202	Q08480	0.50	0.54	0.59	0.54	Adenylate kinase B	<i>Oryza sativa</i>	
35_837	Q6ER94	0.23	0.37	0.96	0.52	Putative thioredoxin peroxidase	<i>Oryza sativa</i>	
35_966	P52428	1.01	0.04	0.48	0.51	Proteasome subunit alpha type 1	<i>Oryza sativa</i>	
35_15052	Q75M08	0.54	0.39	0.61	0.51	Putative disulfide-isomerase	<i>Oryza sativa</i>	
35_16251	Q05737	1.10	0.00	0.32	0.48	GTP-binding protein YPTM2 (Ras related)	<i>Zea mays</i>	
35_15866	Q0DX85	0.39	0.17	0.83	0.46	Os02g0768600 protein	<i>Oryza sativa</i>	
35_14270	Q7XV86	0.79	0.10	0.50	0.46	OSJNBb0012E08.10 protein	<i>Oryza sativa</i>	
35_17731	Q9FU80	0.27	1.01	0.09	0.46	Hypothetical protein P0019D06.31	<i>Oryza sativa</i>	
35_46128	P37211	0.13	0.08	1.16	0.46	ATP synthase subunit alpha	<i>Hordeum vulgare</i>	
35_15548	Q69K00	0.32	0.18	0.77	0.42	Putative Triosephosphate isomerase	<i>Hordeum vulgare</i>	
35_16829	P37900	0.44	0.23	0.59	0.42	Heat shock 70 kDa protein	<i>Hordeum vulgare</i>	
35_14470	Q24581	0.19	0.81	0.18	0.39	Luminal-binding protein 3 precursor	<i>Zea mays</i>	
35_15130	Q6B6M1	0.41	0.11	0.65	0.39	UDP-D-glucuronate decarboxylase	<i>Hordeum vulgare</i>	
35_14175	P10987	0.38	0.70	0.07	0.39	Actin-5C	<i>Drosophila melanogaster</i>	
35_13980	Q43215	0.25	0.66	0.20	0.37	Histone H2B.4	<i>Triticum aestivum</i>	
35_31034	Q4WGP3	0.53	0.14	0.37	0.35	Malate dehydrogenase	<i>Hordeum vulgare</i>	

Harvest_35 ID	UniRef90 ID	log2 Ratio				Mittelwert	Proteinname	Organismus
		n1	n2	n3				
35_14382	P29305	0.38	0.35	0.27	0.33	14-3-3-like protein A	<i>Hordeum vulgare</i>	
<u>Geringere Abundanz nach Induktion</u>								
35_16870	Q5NBQ0	-0.05	-0.03	-0.30	-0.13	Putative pyruvate kinase	<i>Hordeum vulgare</i>	
35_1287	Q6DQL1	-0.06	-0.32	-0.16	-0.18	Succinyl-CoA ligase alpha 2 subunit	<i>Solanum lycopersicum</i>	
35_14211	Q7XPY2	-0.24	-0.10	-0.34	-0.23	Plasma membrane ATPase - <i>Oryza sativa</i>	<i>Oryza sativa</i>	
35_15040	Q9SNX2	-0.28	-0.32	-0.13	-0.24	Phosphoglucomutase	<i>Hordeum vulgare</i>	
35_1065	Q6AT27	-0.17	-0.44	-0.13	-0.25	Putative fibrillarin protein	<i>Oryza sativa</i>	
35_10965	P00828	-0.03	-0.41	-0.32	-0.25	ATP synthase subunit beta - <i>Hordeum vulgare</i>	<i>Hordeum vulgare</i>	
35_15893	Q6K669	-0.33	-0.06	-0.41	-0.26	Leucine aminopeptidase 2	<i>Hordeum vulgare</i>	
35_15127	Q2QXR8	-0.18	-0.40	-0.31	-0.30	Pyruvate kinase family protein	<i>Hordeum vulgare</i>	
35_465	Q8H3I3	-0.03	-0.74	-0.17	-0.31	Putative 40S ribosomal protein	<i>Oryza sativa</i>	
35_2228	Q75M19	-0.47	-0.28	-0.22	-0.32	Putative 26S proteasome regulatory subunit	<i>Oryza sativa</i>	
35_272	P80607	-0.62	-0.12	-0.28	-0.34	Alpha-1,4-glucan-protein synthase [UDP-forming]	<i>Triticum aestivum</i>	
35_14129	Q00NU9	-0.54	-0.25	-0.25	-0.34	Heat shock protein 90	<i>Triticum aestivum</i>	
35_14090	P17784	-0.47	-0.32	-0.27	-0.35	Fructose-bisphosphate aldolase cytoplasmic isozyme	<i>Oryza sativa</i>	
35_1953	Q653F6	-0.40	-0.15	-0.56	-0.37	Putative t-complex protein 1 theta chain	<i>Oryza sativa</i>	
35_14726	P35267	-0.63	-0.41	-0.09	-0.38	60S ribosomal protein L17	<i>Hordeum vulgare</i>	
35_14319	P29766	-0.48	-0.30	-0.35	-0.38	60S ribosomal protein L8	<i>Solanum lycopersicum</i>	
35_15495	Q6H660	-0.49	-0.43	-0.24	-0.39	Putative stress-induced protein sti1	<i>Oryza sativa</i>	
35_14081	P11139	-0.03	-1.04	-0.09	-0.39	Tubulin alpha-1 chain	<i>Arabidopsis thaliana</i>	
35_14581	Q9XET4	-0.45	-0.35	-0.42	-0.41	40S ribosomal protein S7	<i>Secale cereale</i>	
35_37455	Q0WRN6	-0.37	-0.37	-0.50	-0.41	Polyubiquitin 4 UBQ4	<i>Arabidopsis thaliana</i>	
35_1031	Q5XUV6	-0.27	-0.68	-0.35	-0.43	20S proteasome beta 5 subunit	<i>Triticum aestivum</i>	
35_19	P12782	-0.50	-0.48	-0.35	-0.44	Phosphoglycerate kinase	<i>Oryza sativa</i>	
35_3781	Q0ILZ4	-0.30	-0.76	-0.28	-0.45	Os12g0611200 protein	<i>Oryza sativa</i>	
35_1865	Q8GRU7	-0.54	-0.13	-0.70	-0.46	Putative xylulose kinase	<i>Oryza sativa</i>	

Harvest_35 ID	UniRef90 ID	log2 Ratio				Mittelwert	Proteinname	Organismus
		n1	n2	n3				
35_14282	Q25A95	-0.47	-0.19	-0.73	-0.46	B0812A04.3 protein	<i>Oryza sativa</i>	
35_31	Q6XZ79	-0.81	-0.20	-0.38	-0.46	Fructokinase-1	<i>Zea mays</i>	
35_531	P14656	-0.32	-0.26	-0.82	-0.47	Glutamine synthetase cytosolic isozyme 1-1	<i>Oryza sativa</i>	
35_14696	P41095	-0.25	-0.11	-1.08	-0.48	60S acidic ribosomal protein P0	<i>Oryza sativa</i>	
35_1974	Q43266	-1.07	-0.33	-0.10	-0.50	Proliferating cell nuclear antigen	<i>Zea mays</i>	
35_1241	Q65XA1	-1.06	-0.06	-0.45	-0.52	Putative legumin	<i>Oryza sativa</i>	
35_1200	Q9FNU9	-0.79	-0.43	-0.37	-0.53	Mitochondrial processing peptidase alpha-chain	<i>Dactylis glomerata</i>	
35_14677	P35686	-0.64	-0.62	-0.35	-0.53	40S ribosomal protein S20	<i>Oryza sativa</i>	
35_15784	Q6ASR1	-0.77	-0.52	-0.33	-0.54	Putative chaperonin	<i>Oryza sativa</i>	
35_15083	Q9LX88	-0.65	-0.26	-0.72	-0.54	40S ribosomal protein S15a-4	<i>Arabidopsis thaliana</i>	
35_14376	Q4LB12	-0.46	-0.60	-0.58	-0.54	Methionine synthase 2 enzyme	<i>Hordeum vulgare</i>	
35_21677	Q10LY9	-0.30	-0.31	-1.04	-0.55	2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase	<i>Oryza sativa</i>	
35_14558	O23255	-1.17	-0.14	-0.37	-0.56	Adenosylhomocysteinase 1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	
35_1507	Q6ZHC3	-0.77	-0.45	-0.49	-0.57	Putative aspartate-tRNA ligase	<i>Oryza sativa</i>	
35_15530	Q9SLX0	-0.90	-0.26	-0.63	-0.60	Importin alpha-1b subunit	<i>Oryza sativa</i>	
35_14637	Q5I7L2	-0.34	-0.57	-0.89	-0.60	Ribosomal protein L11	<i>Triticum aestivum</i>	
35_17471	Q6YX79	-1.22	-0.06	-0.53	-0.60	GHMP kinase-like protein	<i>Oryza sativa</i>	
35_14174	P10987	-0.28	-1.24	-0.37	-0.63	Actin-5C	<i>Drosophila melanogaster</i>	
35_15471	Q0JKM8	-0.43	-0.77	-0.69	-0.63	Os01g0663400 protein	<i>Oryza sativa</i>	
35_590	P49027	-0.89	-0.44	-0.60	-0.64	Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-like protein	<i>Oryza sativa</i>	
35_42074	P08735	-0.88	-0.10	-0.95	-0.64	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	<i>Hordeum vulgare</i>	
35_15188	O80414	-1.15	-0.38	-0.41	-0.64	Mitochondrial phosphate transporter	<i>Oryza sativa</i>	
35_651	Q01I11	-0.63	-0.86	-0.56	-0.68	OSIGBa0140J09.10 protein	<i>Oryza sativa</i>	
35_1092	Q40082	-1.33	-0.43	-0.46	-0.74	Xylose isomerase	<i>Hordeum vulgare</i>	
35_6	Q5I7L4	-0.58	-1.64	-0.16	-0.79	Ribosomal protein L6	<i>Triticum aestivum</i>	
35_14494	Q7SIC9	-0.93	-0.49	-0.97	-0.80	Transketolase	<i>Triticum aestivum</i>	

Harvest_35 ID	UniRef90 ID	log2 Ratio				Mittelwert	Proteinname	Organismus
		n1	n2	n3				
35_1056	P93616	-0.51	-1.17	-0.74	-0.81	A-binding protein	<i>Triticum aestivum</i>	
35_751	Q43772	-0.79	-0.65	-1.09	-0.84	UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase	<i>Hordeum vulgare</i>	
35_37662	P17784	-0.91	-1.66	-0.10	-0.89	Fructose-bisphosphate aldolase cytoplasmic isozyme	<i>Oryza sativa</i>	
35_8676	Q2QV42	-1.14	-0.81	-0.88	-0.94	Lysine and histidine specific transporter	<i>Triticum aestivum</i>	
35_15073	Q6YZX6	-1.60	-0.66	-0.57	-0.94	Putative aconitate hydratase	<i>Triticum aestivum</i>	
35_37521	Q2V9G1	-1.46	-0.58	-1.21	-1.08	Elongation factor 1-alpha	<i>Rhizophlyctis rosea</i>	
35_45951	Q05737	-1.43	-2.89	-0.17	-1.50	GTP-binding protein YPTM2	<i>Zea mays</i>	
35_16553	Q6H7M1	-1.82	-2.91	-0.72	-1.82	Putative fumarylacetoacetate hydrolase	<i>Oryza sativa</i>	
35_14451	P42895	-0.33	-1.56	-3.95	-1.94	Enolase 2	<i>Zea mays</i>	
35_10121	Q0DYP2	-2.31	-1.76	-1.82	-1.96	Os02g0678300 protein	<i>Oryza sativa</i>	
35_1064	Q6AT27	-1.87	-3.76	-1.17	-2.27	Putative fibrillar protein	<i>Oryza sativa</i>	

### 3.1.2 Änderungen zu Beginn der Pollenembryogenese im Vergleich zur gametophytischen Entwicklung

#### 3.1.2.1 Physiologische Änderungen innerhalb der Entwicklung

Mit der physiologischen Untersuchung sollte sichergestellt werden, dass die geernteten Stadien auch die entsprechenden bereits bekannten strukturellen Merkmale besitzen, die bereits in 1.1.1 beschrieben worden. Außerdem sollten zelluläre Veränderungen festgestellt werden. In den Untersuchungen mit dem Lichtmikroskop konnten keine Unterschiede zwischen regulären und induzierten Mikrosporen detektiert werden. In den ersten untersuchten Tagen der Pollenembryogenese sind einige Zellteilungen zu erkennen gewesen. Nach 4 Tagen konnten deutlich multizelluläre Strukturen beobachtet werden.

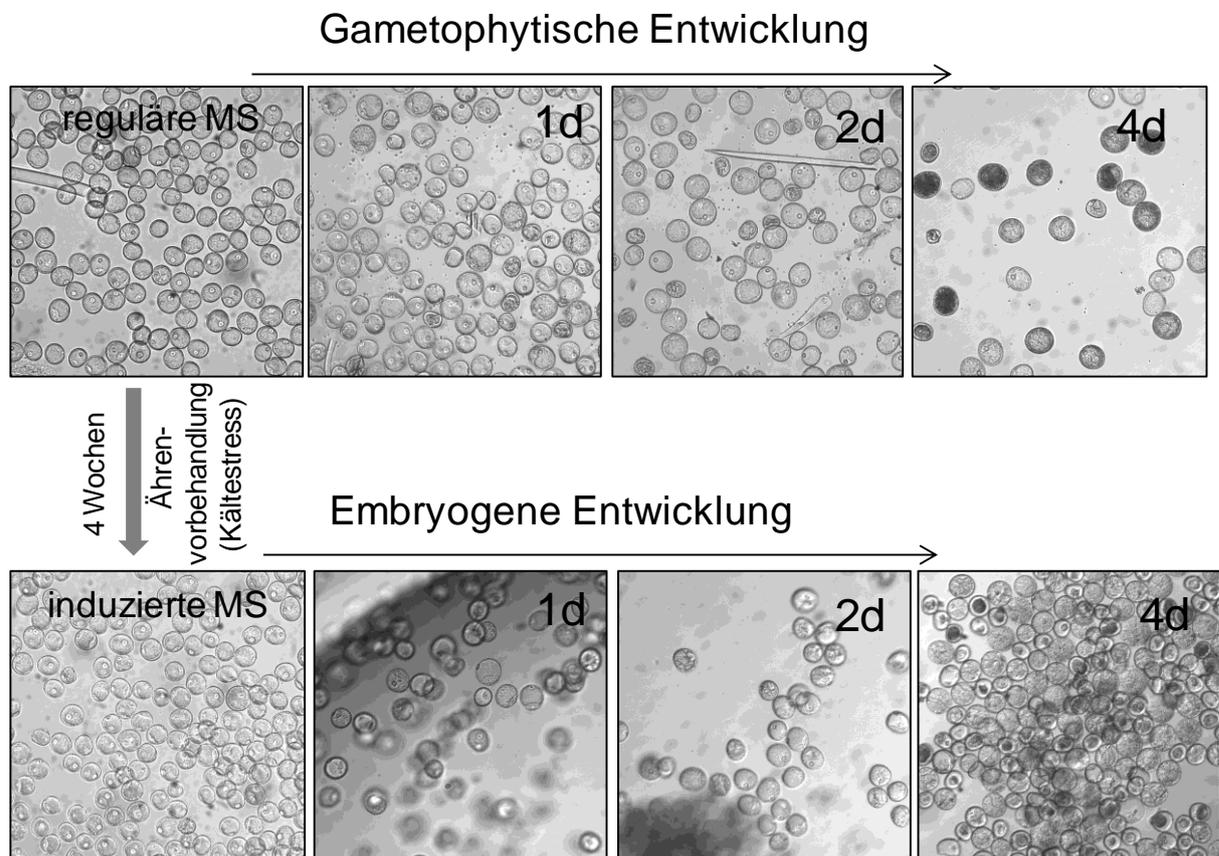


Abbildung 19: Untersuchte Stadien der gametophytischen und embryogenen Entwicklung von unreifen Pollen.

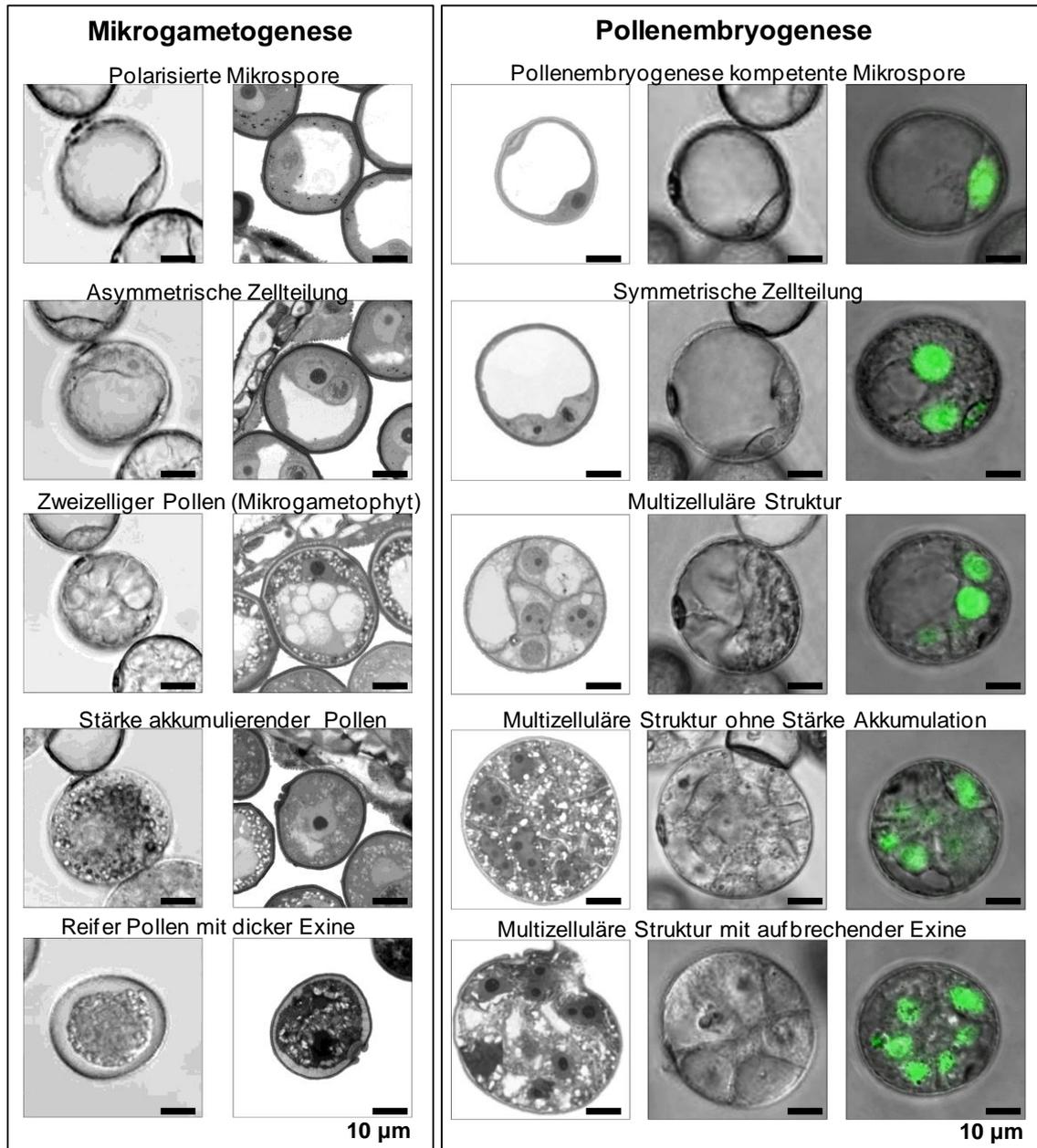
Die nicht induzierten regulären Mikrosporen (reguläre MS) wurden als Ausgangspunkt der gametophytischen Entwicklung gewählt und die weiteren Zeitpunkte entsprechend *in planta* markiert und jeweils 1, 2 oder 4 d später isoliert. Embryogenese-kompetente Mikrosporen (induzierte MS) waren nach 4 Wochen Ährenvorbehandlung (Induktion durch Kältestress) isoliert worden. Die weitere Kultivierung erfolgte in KBP-Medium (Embryogenese 1, 2 4d). Die markierten Stadien stellen die wichtigsten Zeitpunkte der beiden untersuchten Entwicklungen dar.

---

In der gametophytischen Entwicklung hingegen wurden Stärke-akkumulierende Pollen beobachtet (Abbildung 19), was in den embryogenen Kulturen nicht zu erkennen war. Hier konnten nach 4 Tagen multizelluläre Strukturen identifiziert werden.

Um die Entwicklungsstadien der Metabolit- und Proteinanalysen im Detail darzustellen sind in Abbildung 20 neben den Hellfeldaufnahmen mit höherer Vergrößerung, zusätzlich fixierte Pollen in der gametophytischen und embryogenen Pollenentwicklung abgebildet. Diese Aufnahmen wurden in Kooperation mit Diaa S. Daghma (IPK Gatersleben angefertigt). Zusätzlich werden Hellfeld-Aufnahmen von Mikrosporen mit einer kernlokalisierten GFP-Expression gezeigt. Zu beachten ist, dass es sich bei den Aufnahmen um individuelle Bilder handelt. Die NLS-GFP exprimierende Linie wurde freundlicherweise von den Kollegen Diaa S. Daghma und Götz Hensel zur Verfügung gestellt. Bereits nach kurzer Zeit war eine Zellteilung zu beobachten, was durch die beiden Fluoreszenz-Signale besonders deutlich wird. Diese Aufnahmen zeigen einen größeren Bereich der Entwicklung während der Pollenembryogenese, da die Bilder der verwendeten Kulturen (Abbildung 19) für die intrazellulären Analysen nur bis Tag 4 kultiviert wurden. Hier ist auch deutlich zu sehen, dass es nach einigen Tagen bei der Pollenembryogenese zu einem Aufbruch der Exine kommt und dadurch der Embryo freigesetzt wird. Ohne dieses Aufbrechen, stirbt die multizelluläre Struktur ab. Eine Stärke-Akkumulation war in den embryogenen Pollen nicht zu erkennen. Im Gegensatz wurde in der gametophytischen Pollenentwicklung die typische asymmetrische Zellteilung beobachtet. Anschließend fand eine Stärkeeinlagerung statt.

---

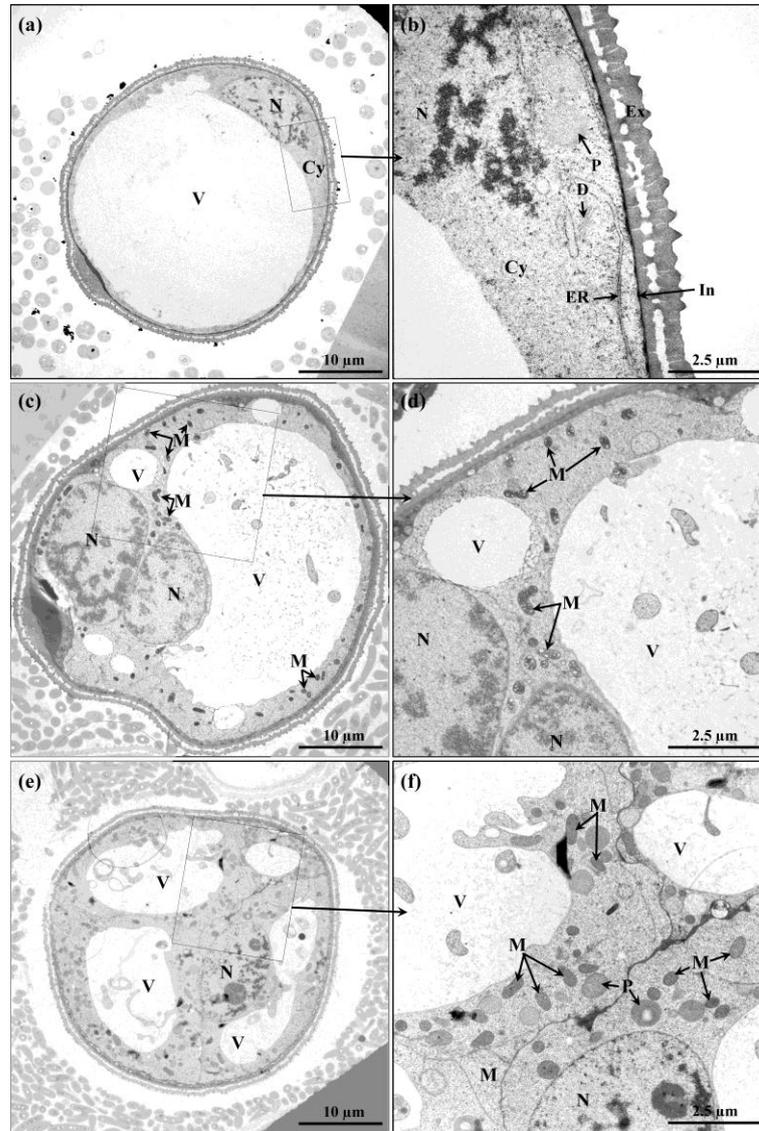


**Abbildung 20: Stadien der gametophytischen und embryogenen Entwicklung von Mikrosporen.**

Lichtmikroskopische Aufnahmen: 1. Spalte v. links & 2. Spalte von rechts, Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen: 2. Spalte v.l. & mittlere Spalte, Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen (GFP-Filterset) der Pollenembryogenese: rechte Spalte. Die Bilder spiegeln individuelle Pollen aus unabhängigen Kulturen wieder, repräsentieren jedoch typische Stadien während beider Entwicklungswege. Maßstabsbalken entspricht 10 µm

Mithilfe der Transmissionselektronenmikroskopie war es außerdem möglich, detailliertere Aufnahmen der Mikrosporen und deren Strukturen zu gewinnen. In den frisch isolierten unreifen Pollen (Abbildung 21a/b) ist eine große Zentralvakuole zu erkennen. Weiterhin ist das Zytoplasma klar und enthält keine komplexen Strukturen. Zellorganellen waren, wenn überhaupt nur in geringer Häufigkeit zu erkennen. Nach Stressinduktion und einer nachfolgenden Kultivierung in KPB-Nährmedium konnten im Zytoplasma zahlreiche Mitochondrien sowie kleinere Vakuolen und andere Organellen detektiert werden. Auch eine

erste Zellteilung war bereits bei einigen Pollen nach 2 Tagen sichtbar. Dieses Stadium ist in Abbildung 21c/d abgebildet. Nach 4 Tagen waren multizelluläre Strukturen erkennbar, die eine noch höhere Häufigkeit an Mitochondrien enthielten.



**Abbildung 21:** Transmissionselektronenmikroskop (TEM) Aufnahmen von Pollen während der Pollenembryogenese.

(a, b) vakuolisierte unreife Pollen, welche im geeigneten Stadium für die Pollenembryogenese-Induktion sind. (a) Mikrspore mit großer Zentralvakuole (b) Das Zytoplasma enthält nur wenige Organellen und eine dünne Intine. (c, d) Embryogene Pollen nach 2 Tagen Kultivierung in Nährmedium (c) Zweizelliger Pollen nach Pollenmitose I (d) Zytoplasma mit hoher Dichte an Zellorganellen, insbesondere Mitochondrien. (e, f) Embryogene Pollen nach 4 Tagen Kultivierung. (e) Frühe multizelluläre Strukturen. (f) Detaillierte Aufnahme zeigt eine weitere Erhöhung der Anzahl an Mitochondrien und Plastiden. Abkürzungen: D, Dictyosom; ER, Endoplasmatisches Reticulum; Ex, Exine; In, Intine; M, Mitochondrium; N, Nukleus; P, Plastid; V, Vakuole.

Es ist auch zu erkennen, dass bis zu diesem Entwicklungszeitpunkt die Mikrosporen bzw. unreifen Pollen eine Zellproliferation durchlaufen, aber keine wesentliche Zunahme am Gesamtvolumen festgestellt werden kann. Erst wenn die geringe Größe meristematischer

Zellen analog zur zygotischen Embryogenese in den proliferierenden Zellen erreicht ist, setzt ein exponentielles Wachstum der Embryonen ein.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass:

- die isolierten Stadien die charakteristischen Merkmale aufweisen, die bereits in der Literatur bekannt sind und somit die richtigen Entwicklungszeitpunkte für die weiteren Untersuchungen gewählt wurden.
- die frisch isolierten Mikrosporen durch ein klares Zytoplasma, eine große Vakuole und wenige Zellorganellen charakterisiert waren.
- es nach der Überführung in KPB-Medium zu einer höheren Dichte an Mitochondrien kommt, Embryogenese-kompetente Zellen nach 4 Tagen im Gegensatz zu gametophytischen Pollen keine Stärkekörner akkumulierten.
- bereits in den ersten Tagen in KPB Medium zu mehreren Zellteilungen kommt, ohne dass das Gesamtvolumen der Strukturen zugenommen hat. Somit verringert sich das Zellvolumen bis das geringe Volumen meristematischer Zellen erreicht ist.

### 3.1.2.2 Änderungen von Primärmetaboliten zu Beginn embryogener Entwicklung

In 3.1.2 sind strukturelle Veränderungen auf zellulärer Ebene während der ersten Tage der Pollenembryogenese dargestellt. Es kam zur Bildung von Zellorganellen und zu einer zunehmenden Zellteilung. Da diese Prozesse Vorläufermetabolite der Zellwand und Energie für die Biosynthese benötigen, wurden Metabolite der Glykolyse, des TCA-Zyklus und der Zellwandbiosynthese gemessen (Abbildung 22). Die biologischen Replikate wiesen teilweise starke Unterschiede auf. Durch die Abweichungen der Replikate waren jedoch keine statistischen Signifikanzen für die meisten Metabolite zu erkennen, auch wenn die veränderten Abundanzen deutliche Tendenzen aufwiesen. Lediglich Glukuronsäure zeigte eine signifikant höhere Abundanz innerhalb der Embryostadien nach 2 und 4 Tagen.

Die Gruppierung einzelner Metabolite wird in der Heatmap (Abbildung 22) deutlich. Diese erfolgte als Dendrogramm aufgrund ähnlicher Profile der Metabolite.

Drei verschiedene Muster bildeten sich dabei zwischen Pollenembryogenese und gametophytischer Entwicklung heraus: 1) Hexosephosphate, welche während der Embryogenese in geringeren Mengen vorhanden waren. 2) Organische Säuren des TCA-Zyklus, die keine eindeutigen Unterschiede zeigten und 3) Nukleotide, wie ATP und der Zellwand-*Präkursor* Glukuronsäure waren höher abundant während der Pollenembryogenese. Dabei lagen die höchsten Konzentrationen nicht direkt nach Kältestressbehandlung, sondern

---

nach einem oder zwei Tagen in KPB-Medium vor. Die relativen Konzentrationen der einzelnen Stadien sind in Abbildung 23 der besseren Übersicht einzeln dargestellt. Für Glukoronsäure wurde ein Anstieg der Konzentration um den Faktor Hundert gemessen.

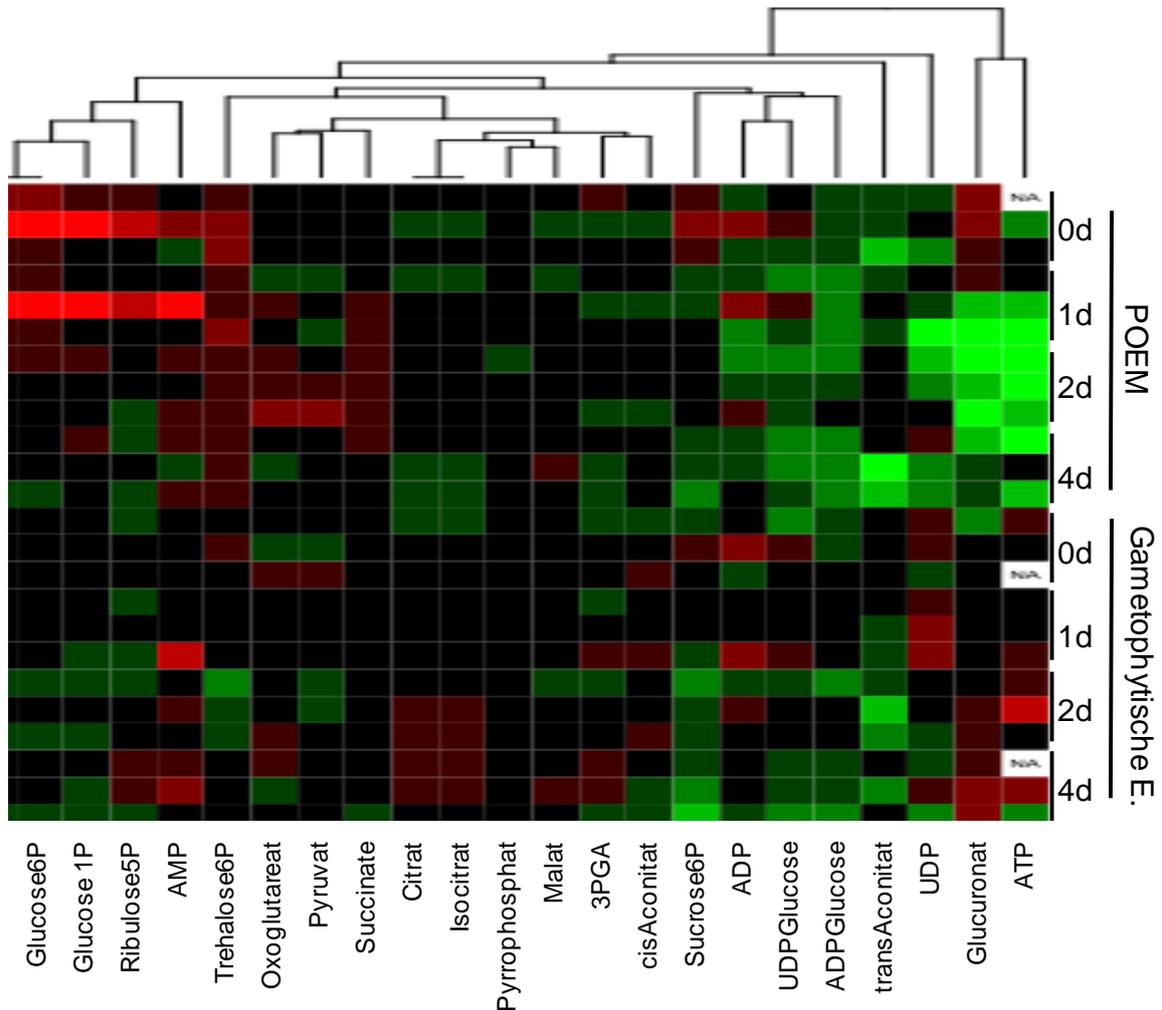
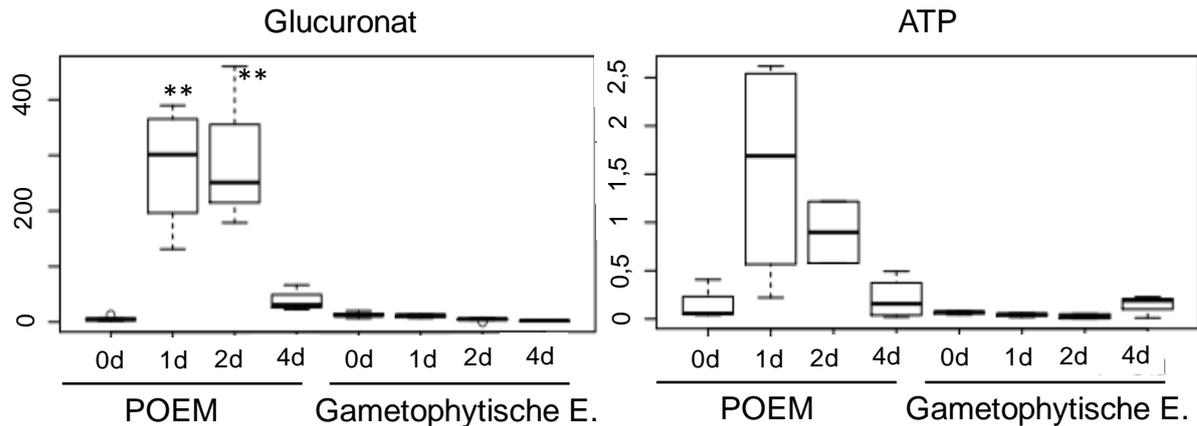


Abbildung 22: Relative Änderungen (LOG2) gemessener Primärmetabolite von embryogenen Kulturen (Pollenembryogenese) der ersten 4 Tage im Vergleich zur gametophytischen Entwicklung.

Gezeigt ist die *Heatmap* und hierarchische *Cluster* der LC-MS Daten Analyse. Ein biologisches Replikant beinhaltet jeweils Mittelwerte aus 3 technischen Replikaten. Grün ist stärker abundant und Rot geringer im Vergleich zu gametophytem Pollen. NA beinhalten nicht detektierte Werte. Die Gruppierung der Metabolite erfolgte mittels Dendrogramm.

Der Anstieg des Energieträgers ATP und der Glucoronsäure, einem Präkursor der Zellwandbiosynthese, korreliert dabei mit den physiologischen strukturellen Beobachtungen in 3.1.2. Die Aktivierung des Primär-Metabolismus nach 1 Tag ist auch als Folge der Überführung der induzierten Pollen aus dem Hungerzustand in nährstoffreiches Medium zu sehen. Im gametophytem Pollen hingegen beginnt die Reifung und Abnahme der Stoffwechsel-Aktivität. Nach 4 Tagen in KPB-Medium sanken die Konzentrationen jedoch wieder auf das Anfangsniveau nach Kältstressbehandlung.



**Abbildung 23: Veränderungen von Glucuronat und ATP vergleichend zwischen Pollenembryogenese und gametophytischer Entwicklung.**

Aufgetragen sind jeweils die relative Abundanzen der einzelnen Tage der Pollenembryogenese (Pollenembryogenese 0-4d) nach Kältestressinduktion und die Kinetik der Pollenreifung *in vivo* (Gametogenese). 3 biologische Replikate wurden jeweils mit zwei technischen Replikaten gemessen. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$

Zusammenfassend sind die interessantesten Ergebnisse aus dieser Untersuchung von Metaboliten des Primärstoffwechsels:

- Ein starker Anstieg an Glucuronat innerhalb des ersten und zweiten Tages während der Pollenembryogenese im Gegensatz der gametophytischen Entwicklung
- Ein Anstieg von ATP während der Pollenembryogenese. Dieser ist jedoch innerhalb der biologischen Replikate nicht signifikant, da die Werte stark variieren.
- eine Tendenz geringerer Konzentrationen von Hexosephosphaten in embryogenen Kulturen
- keine Änderung der TCA-Intermediate, abgesehen von einer leichten Verringerung von Malat während der Pollenembryogenese

### 3.1.2.3 Differentiell abundante Proteine zu Beginn der embryogenen Entwicklung

Neben der Induktion der Pollenembryogenese-Kompetenz durch Kältestress, war zusätzlich eine Veränderung der Expression während der Pollenembryogenese von Interesse. In diesem Stadium beginnt eine aktive Zellteilung (Abbildung 21) und Veränderungen in der Zellstruktur. In diesem Abschnitt sollen Proteine mit einer Funktion bei der Transkription besprochen werden, da diese regulatorischen Faktoren von besonderem Interesse sind.

Eine der interessantesten Kategorien innerhalb der Protein-Analysen war die Gruppe der Transkriptionsfaktoren, welche zum einen eine höhere Abundanz nach induzierter Pollenembryogenese-Kompetenz aufwiesen und zum Anderen während der Pollenembryogenese eine spezifische Regulation zeigten. Diese Faktoren könnten potentielle

Kandidaten für eine positive Regulation wichtiger Transkripte während der Pollenembryogenese darstellen. Transkriptionsfaktoren mit einer geringeren Abundanz sind jedoch auch von Interesse, da die Möglichkeit besteht, dass es sich bei diesen um wichtige bzw. spezifische TF während der gametophytischen Pollenentwicklung handeln könnte. Die während dieser Untersuchung in mehreren Replikaten identifizierten Transkriptionsfaktoren sind in Tabelle 5 zusammengefasst. Neben den entsprechenden Harvest\_35 EST-Datenbank Einträgen sind die Einträge nach *BLAST*-Homologiesuche der UniRef90\_Datenbank mit den dazugehörigen Proteinbeschreibungen aufgelistet. Insgesamt konnten 11 unterschiedliche Harvest\_35 Einträge entsprechenden spezifischen Peptiden zugeordnet werden, wobei die ID 35\_15306 und 35\_15310 nach Homologiesuche den gleichen UniRef\_90 Eintrag erhielten. Da beide EST Einträge jedoch mit spezifischen Peptiden identifiziert wurden, kann davon ausgegangen werden, dass es sich dabei um zwei verschiedene Isoformen handelt.

**Tabelle 5: Übersicht der identifizierten Transkriptionsfaktoren während der Pollenembryogenese.**

**Aufgelistet sind die identifizierten EST-Sequenznummern der Harvest35 Datenbank mit den dafür gefundenen Peptiden & spezifischen Peptiden in Klammern, welche für die Quantifizierung verwendet wurden, sowie die dazu annotierte UniProt Akkzessionsnummer mit Homologie e-Wert. Organismen und Proteinbeschreibungen wurden der UniProt Datenbank entnommen.**

Harvest35 ID	Peptide	Anova (p)	UniRef90 ID	Homologie [e-Wert]	Beschreibung	Organismus
35_1008	2 (2)	0,08	Q6ZAE3	3,00E-61	Putative ethylene-responsive transcriptional coactivator	<i>O. sativa</i>
35_1122	2 (2)	0,11	Q8H7V1	1,00E-79	Putative transcription factor	<i>O. sativa</i>
35_12901	3 (3)	0,31	Q6ZA58	3,00E-44	PHD finger transcription factor	<i>O. sativa</i>
35_1523	2 (2)	0,00	Q8GTP4	1,00E-127	MADS box transcription factor	<i>T. aestivum</i>
35_15306	1 (1)	0,01	Q6DQ93	4,00E-66	BTF3b-like transcription factor	<i>M. acuminata</i>
35_15310	3 (3)	0,01	Q6DQ93	9,00E-65	BTF3b-like transcription factor	<i>M. acuminata</i>
35_19585	1 (1)	0,01	Q6Z8S7	0	Putative signal transducer and activator of transcription interacting protein	<i>O. sativa</i>
35_19844	1 (0)		Q60EQ4	1,00E-74	Nuclear transcription factor Y subunit B-3	<i>Magnoliophyta</i>
35_46658	6 (6)	0,00	Q8H7V1	2,00E-64	Putative transcription factor	<i>O. sativa</i>
35_5700	2 (1)	0,10	Q60EQ4	7,00E-81	Nuclear transcription factor Y subunit B-3	<i>Magnoliophyta</i>
35_7218	2 (2)	0,04	Q5ZDL5	1,00E-154	Putative transcription factor X1	<i>O. sativa</i>

Abbildung 24 zeigt die Expressionen zu den verschiedenen Zeitpunkten sowohl während der Pollenembryogenese als auch der gametophytischen Entwicklung zum Vergleich im Verhältnis zu frisch isolierten Mikrosporen. Die meisten identifizierten Transkriptionsfaktoren zeigten kein auffallendes Expressionsmuster. Entweder die Abundanz änderte sich nicht signifikant nach der Kältestressbehandlung oder verlief während der gametophytischen Entwicklung ähnlich, so dass man nicht von einer Pollenembryogenese-

spezifischen Expression sprechen kann. Für eine genauere Aussage sollten hierzu jedoch gerichtete Analysen durchgeführt werden.

Besonders interessant erscheinen jedoch die EST-Sequenzen 35\_15306 mit Homologie zu einem BTF3b-*like* TF und stark erhöhter Expression nach Induktion durch Kältestress und während der Pollenembryogenese. Im Gegensatz dazu konnte für die Sequenz 35\_19585 eine geringere Abundanz detektiert werden. Hierbei auffällig ist weiterhin, dass sich, wenn auch nur schwach, die Expression innerhalb der gametophytischen Entwicklung konträr verhält. Dies könnte auf eine durch die Stressbehandlung wichtige Reduktion eines Faktors, der eine Rolle während der Gametogenese spielt, hindeuten. Auch das Protein 35\_1523 ein MADS-Box Transkriptionsfaktor zeigte tendenziell eine stärkere Expression in reiferen Pollen gegenüber der Expression in der Pollenembryogenese.

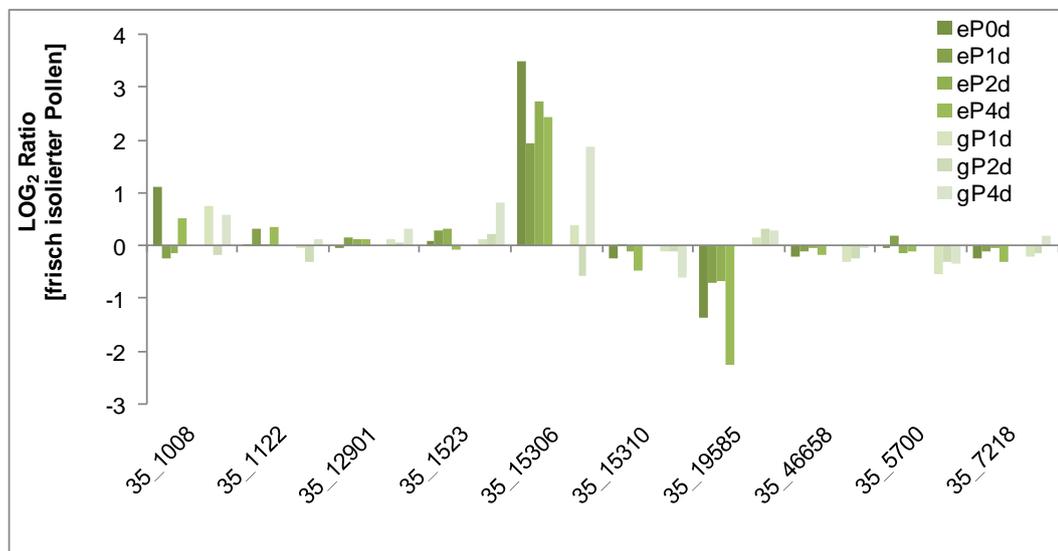


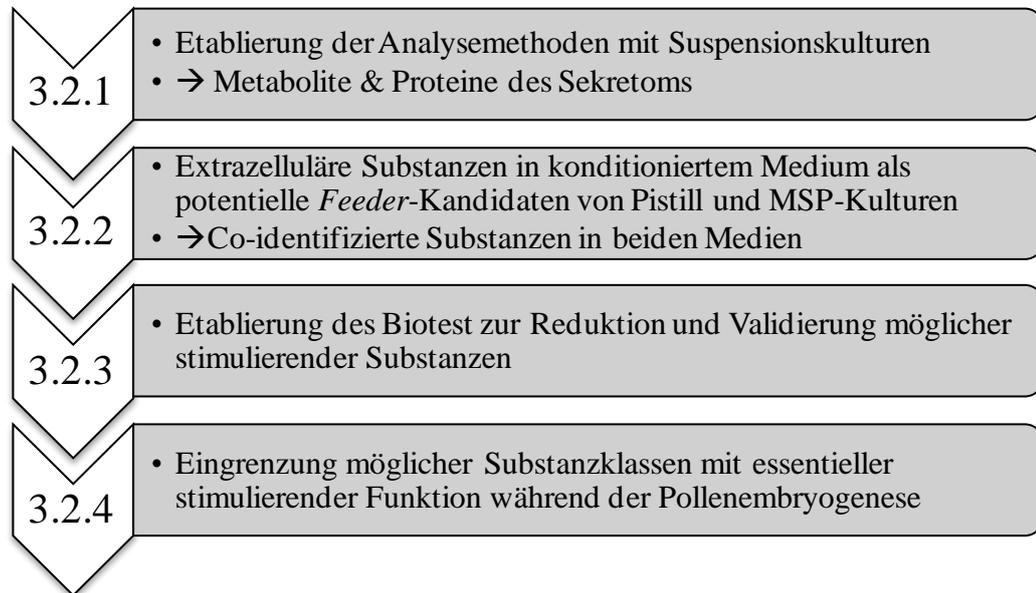
Abbildung 24: Regulation der identifizierten Transkriptionsfaktoren nach Induktion der Pollenembryogenese-Kompetenz und während der Pollenembryogenese sowie der gametophytischen Pollenentwicklung.

Aufgetragen sind die Verhältnisse  $\text{Log}_2$  jeweils zu frisch isolierten unreifen Pollen. eP bezeichnet dabei die verschiedenen Zeitpunkte der Pollenembryogenese und gP der gametophytischen Entwicklung, eP0d ist der Zeitpunkt direkt nach Stressinduktion durch Kälte. Die Annotationen der aufgeführten Harvest35 Datenbank Einträge sind Tabelle 5 zu entnehmen.

### 3.2 Identifizierung Pollenembryogenese-fördernder Substanzen im Sekretom von Pistill-, „Ammenkulturen“ und Embryogenese-kompetenten Pollenkulturen

Die chemische Natur beziehungsweise Klasse von Pollenembryogenese-fördernden Substanzen, ist bis heute unbekannt. Es wurden verschiedenste Ansätze erprobt um die Einordnung potentieller Kandidaten in ihre Substanzklassen zu erreichen. Hierfür mussten zunächst einige Methoden zur Analyse der extrazellulären Komponenten in Kulturmedium etabliert werden. Da eine hohe Ausbeute an Kulturmedium bei Mikrosporenkulturen schwer

möglich ist, wurden methodische Vorarbeiten zunächst anhand einer Tabakzellsuspensionskultur etabliert. Damit war innerhalb kürzerer Zeit eine Bereitstellung von ausreichend Zellmaterial für die Testanalysen möglich.



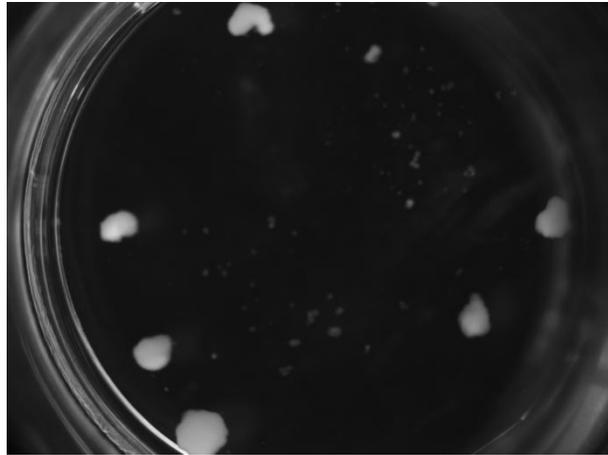
**Abbildung 25: Übersicht der Unterkapitel in 3.2 mit dem abschließenden Ziel extrazelluläre Substanzen als mögliche *Feeder*-Moleküle zu identifizieren und die möglichen Substanzklassen einzugrenzen.**

In diesem Abschnitt sollen zunächst die Ergebnisse der Zellsuspensionskultur als Etablierungssystem gezeigt werden. Im Hauptteil wird jedoch auf die Ergebnisse bezüglich der sekretierten Substanzen im Pollenkultivierungsmedium sowie der Pistill-Kulturen eingegangen. Abschließend werden die Ergebnisse der Etablierung eines Biotests, zur Überprüfung einzelner Substanzen und sowie die daraus resultierende Reduktion möglicher Substanzklassen gezeigt. Die einzelnen Punkte sind schematisch in Abbildung 25 aufgeführt.

### **3.2.1 Etablierung der analytischen Methoden anhand einer Tabak Zellsuspensionskultur - S2LS3**

Aufgrund der geringen zur Verfügung stehenden Menge an Biomaterial für die Etablierung der einzelnen Analysemethoden, wurde in ersten Versuchen eine Zellsuspensionskultur S2LS3 von Tabak verwendet. Das Medium dieser Zellkultur wies eine ähnliche Zusammensetzung auf. Dadurch konnten die so entwickelten Methoden anschließend auf das während der Pollenembryogenese verwendete KPB-Medium übertragen werden. Ein weiterer Grund der Verwendung dieser Zellkultur ergab sich aus dem Resultat, dass auch konditioniertes Medium dieser Tabak-Zellkultur einen *Feeder*-Effekt auf embryogene Pollenkulturen aus Gerste (Abbildung 26) hatte. Dieser war allerdings im Vergleich zu anderen *Feeder*-Gewebe (vgl. 3.3.1) geringer. Durch diese Tatsache ist es jedoch möglich in

späteren Analysen die Daten beider Kultursysteme zu verknüpfen und für eventuelle Aufreinigungen des/der *Feeder*-Molekül(e) eine Suspensionskultur zu verwenden, da diese eine schnellere Produktion an Kulturmedium verspricht.



**Abbildung 26: Kallus-Entwicklung während einer Co-Kultivierung mit einer Tabakzellsuspensionskultur.** Gezeigt ist die Entwicklung von Kallusstrukturen (weiß) innerhalb eines *Millicells*<sup>®</sup> (ID=10mm) mit 150 Pollen, welche ohne Co-Kultivierung keine Embryogenese durchlaufen (siehe hierzu auch 3.2.3.1).

### 3.2.1.1 Proteinanalytik des Kulturmediums der Suspensionskultur

Für die Aufarbeitung wurden verschiedene Methoden ausgetestet. Dabei wurden verschiedene Filtrierungsschritte zur Entfernung von Zellfragmenten untersucht und anschließend Proteinaufreinigungen wie zum Beispiel eine Chloroform/Methanol Fällung von frischen oder gefriergetrocknetem Material oder eine Größenausschlusszentrifugation durchgeführt. Dabei konnte die beste Proteinausbeute mit der Chloroform/Methanolfällung von zuvor durch Gefrierdrying aufkonzentriertem Material gemessen werden.

Insgesamt konnten nach Aufreinigung der Proteine aus Kulturmedium 60 Spots nach 2D-Auftrennung mittels IEF-SDS-PAGE detektiert werden. Nach tryptischen Verdau war eine Annotierung von 32 Proteinen möglich, wobei es sich hauptsächlich um bereits bekannte Proteinklassen, wie Chitinasen, Glucosidasen, Peroxidasen und *Pathogenesis-Related* (PR) Proteinen handelte. Es konnten dabei auch drei neue putative Isoformen einer Chitinase, einer Peroxidase und einer  $\beta$ -1,4-Xylosidase identifiziert werden, die für *Nicotiana* noch nicht in den Datenbanken enthalten sind. Die meisten Proteine wurden als  $\beta$ -1,4-Xylosidase identifiziert, wie z.B. in Spot #1 bis 4, #12, 14, 15 & #18, 20, 21, 22, 23 (Abbildung 27), jedoch mit jeweils unterschiedlichen Protein Akzessionen und Spezies. Für weitere Details siehe hierzu Lippmann et al. (2009).

Die Analyse der Peptide aus Spot #45, 46 und 47 führte zu der Identifizierung 3 verschiedener Chitinase-Isoformen aus *Nicotiana tabacum*. Dabei wurden Peptide für eine Isoform

(P17513) in allen drei Spots identifiziert, wobei in Spot #47 ein spezifisches Peptid zu der Annotierung einer Chitinase aus *Momordica charantia* führte, die lediglich eine Homologie von 54.2 % (P17513) und 55.1 % (P17514) besaß (*Alignment* siehe Anhang Abbildung 58). Das spezifische Peptid für die Isoform aus *Momordica charantia* deutet auf eine noch nicht annotierte Isoform in *Nicotiana tabacum* hin. Hierzu wären jedoch weitere Untersuchungen notwendig. Für weitere Details dieser Analyse siehe Lippmann et al. (2009).

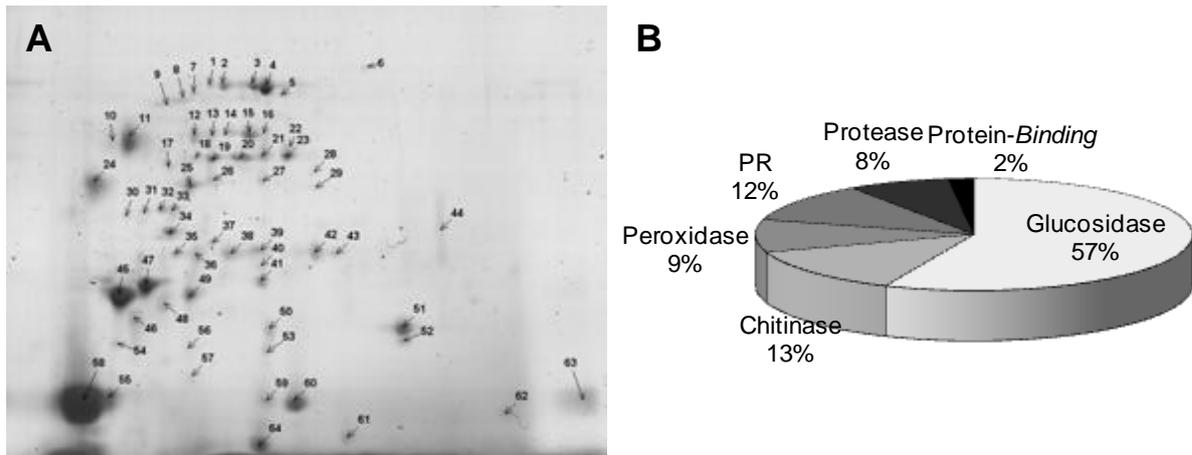


Abbildung 27: Proteinanalyse des Zellkulturmediums nach 7 Tagen.

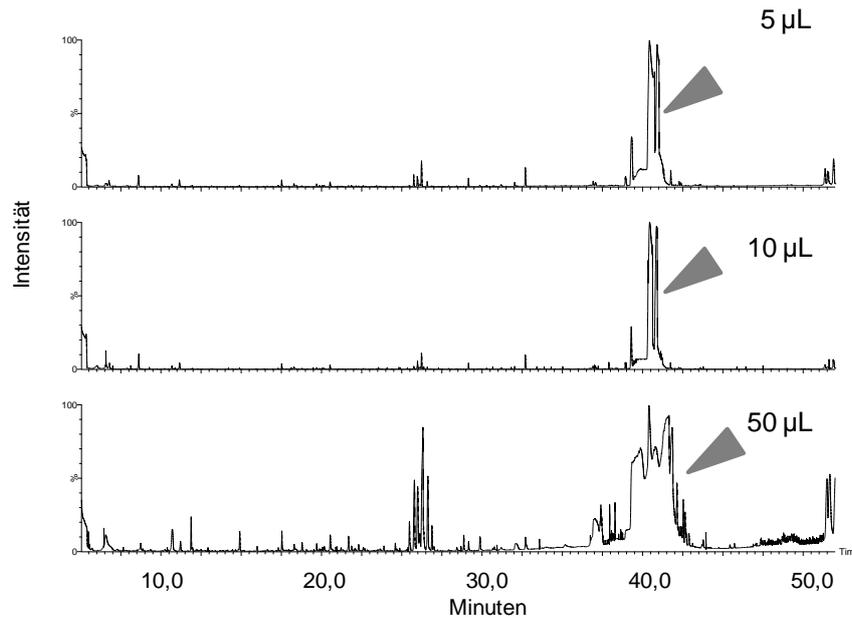
A) 2D-SDS-PAGE (repräsentativ) des Sekretoms der S2LS3 Kultur. Die Trennung erfolgte in der ersten Dimension durch isoelektrische Fokussierung bei pH 3-10 und innerhalb der zweiten Dimension durch denaturierende PAGE (11,25 %). Nach Färbung mit colloidalem *Coomassie Brilliant Blue* (cCBB) konnten mehr als 60 Spots detektiert werden.

B) Klassifizierung der identifizierten Proteine des S2LS3-Zellkultur Sekretoms nach Analyse der Spots mittels LC-MS/MS und MALDI-MS. PR – *Pathogenesis related Protein*

### 3.2.2 Untersuchung des konditionierten Kulturmediums auf akkumulierende Substanzen mit potenziellem *Feeder*-Effekt

#### 3.2.2.1 Extrazelluläre Metabolite Embryogenese-stimulierender Kulturen

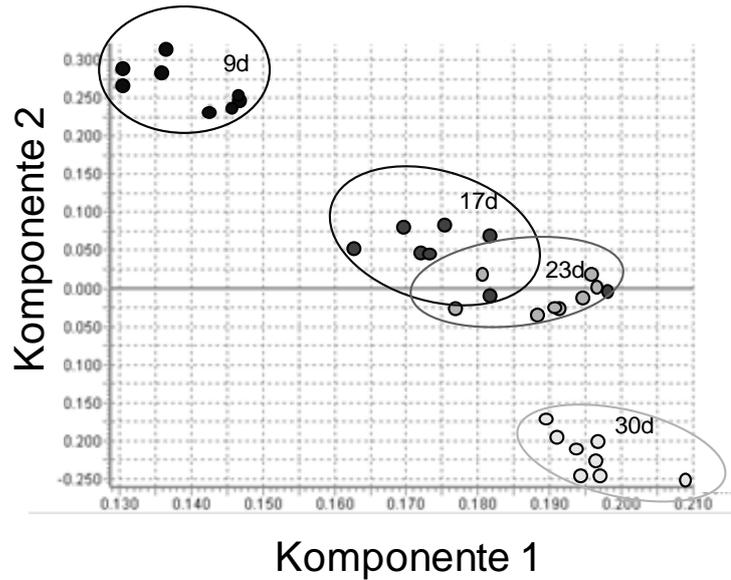
Um das optimale Volumen für ein Metabolit-*Profiling* des Pollenmediums zu finden, wurde zunächst das optimale Volumen für die Analyse mittels GC-MS ermittelt. Eine Hauptkomponente ist der in den Medien im Überschuss vorliegende Zweifachzucker Maltose, der somit ein limitierender Faktor für die mögliche Menge an Ausgangsmaterial war. Es zeigte sich, dass bereits eine Menge von 5 µl Medium zu einer Sättigung des Detektors für Maltose führt (Abbildung 28). Die getesteten weiteren Volumina (10 & 50 µl) führten zusätzlich zu einer Überladung der Säule. Für die weiteren Proben wurde daher ein Volumen von 5 µl verwendet, auch wenn hier eine quantitative Auswertung von Maltose nicht möglich ist. Das ist zu vernachlässigen, weil es sich um eine Ausgangssubstanz handelt. Kleinere Volumina konnten nicht verwendet werden, da dadurch bereits einige Signale unter das Detektionslimit fielen.



**Abbildung 28: Evaluierung der notwendigen Volumina an Medium für die GC-MS Analyse.**

Getestet wurden verschiedene Volumina an Medium die höchste Abdeckung an Metaboliten zu erreichen bei gleichzeitiger Vermeidung einer Sättigung des Detektors. Verwendet wurde ein Pool aller Erntezeitpunkte (9, 17, 23, 30d). Die grauen Pfeile markieren den Maltose-Peak, der bereits bei 5 µl Medium zur Sättigung des Detektors und bei 10/50 µl zu einer Überladung der Säule führt.

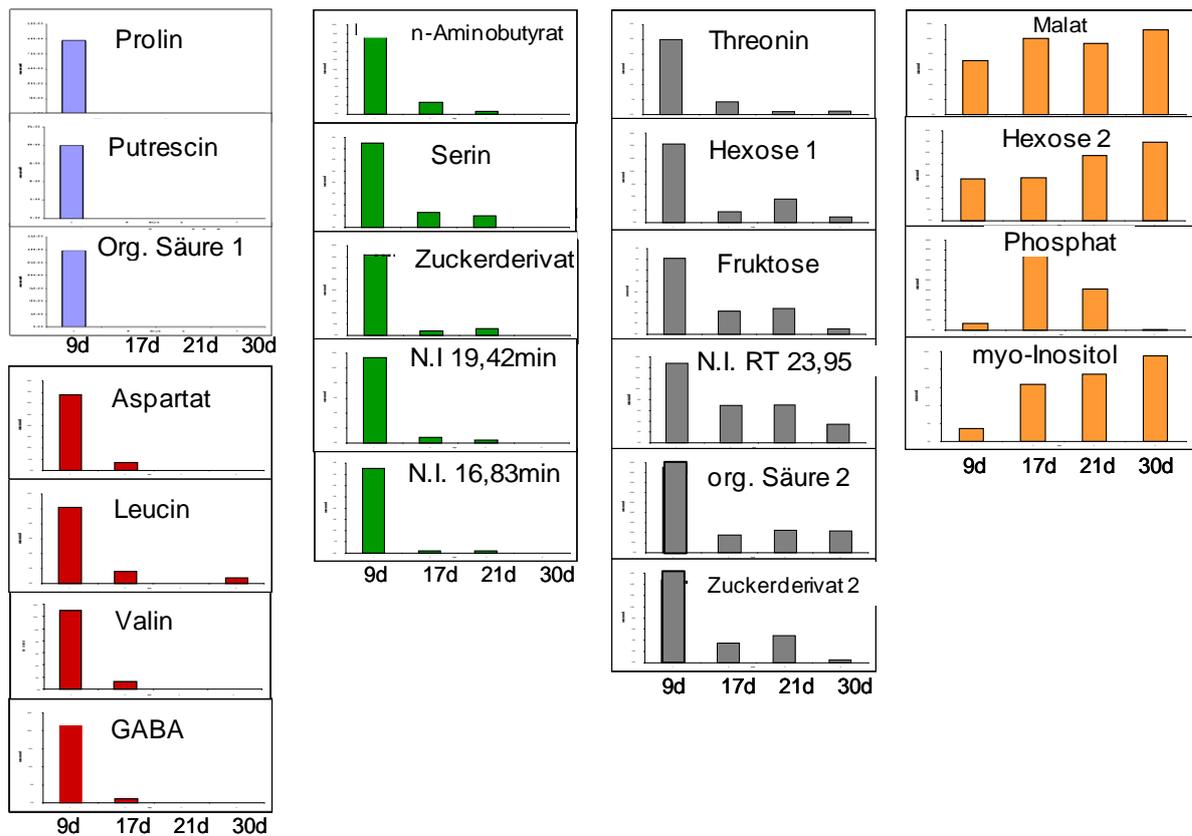
Um Veränderungen der Medienzusammensetzung während der gesamten Kultivierungsdauer zu bestimmen, wurden 4 verschiedene Zeitpunkte (9, 17, 23, 30d) geerntet und jeweils mit frischem Kulturmedium aufgefüllt. Die Rohdaten der Analyse aller verwendeten Zeitpunkte wurden in wie in 2.3.1 beschrieben, prozessiert und ausgewertet. Alle Exakte-Masse Retentionszeitpaare wurden in der Multidimensionalen Statistischen Analyse verwendet. Die Hauptkomponentenanalyse zeigte eine Gruppierung der biologischen Replikate der einzelnen Zeitpunkte (Abbildung 29). Es ist auch zu erkennen, dass die mittleren Zeitpunkte (17d & 23d) im Gegensatz zu den beiden anderen Zeitpunkten eine geringe Trennung aufweisen. Innerhalb dieser Analyse konnten so Marker extrahiert werden, welche spezifisch nach Kultivierung von Pollen in KPB Medium auftraten. Einige der Marker konnten als Aminosäuren, Organische Säuren oder nicht genau identifizierbare Zuckerderivate bzw. Amine annotiert werden.



**Abbildung 29: Extrazelluläre Metabolite und die Medienzusammensetzung nach verschiedenen Kultivierungszeiträumen in Mikrosporen-Kulturmedium.**

**Hauptkomponentenanalyse (PCA) der GC-MS Daten von KPB-Medium während der Pollenembryogenese nach 9d, 17d, 21d und 30d. Das Medium wurde jeweils zu den angegebenen Zeitpunkten zu 80% ersetzt. Eine deutliche Gruppierung der einzelnen Erntezeitpunkte ist zu sehen.**

Es konnte gezeigt werden, dass zahlreiche Primärmetabolite im Kulturmedium akkumulierten. Die identifizierten Metabolite und deren relative Abundanzen während unterschiedlicher Kultivierungszeiträume sind in Abbildung 30 dargestellt. Hierbei ist jedoch darauf zu achten, dass Inositol bereits im Medium vorliegt und es sich somit nicht um eine aktiv sekretierte Substanz handelte. Die meisten identifizierten Marker zeigten die höchste Intensität innerhalb der ersten Woche. Danach konnten sie entweder nicht detektiert werden oder waren nur in einer geringen Konzentration vorhanden. Lediglich Malat und ein nicht genau identifiziertes Zuckerderivat zeigten eine gleichbleibend hohe oder leicht ansteigende Akkumulation im Kulturmedium.



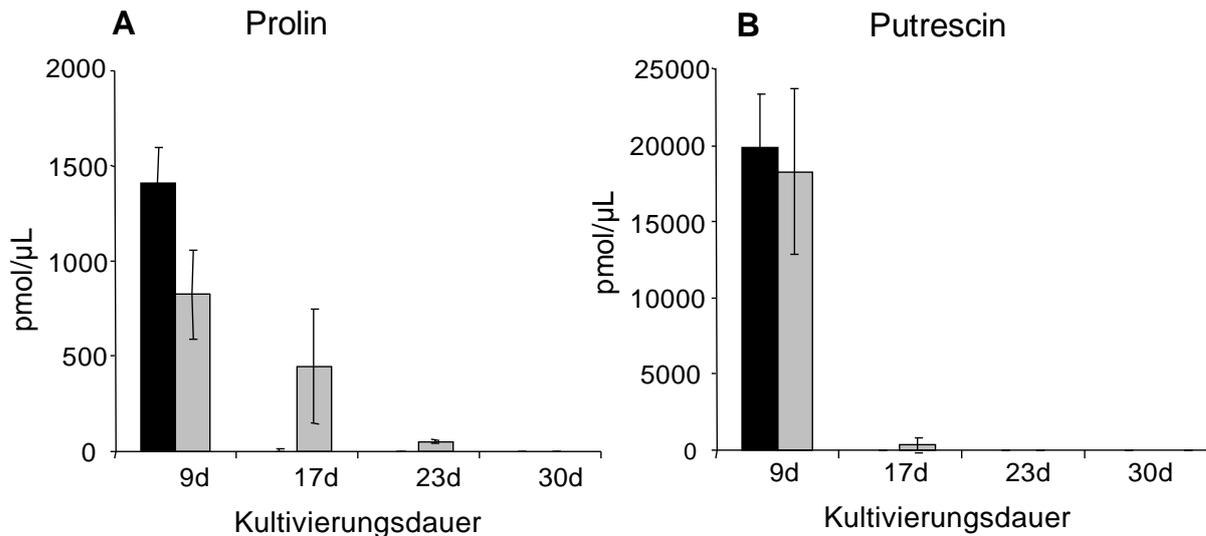
**Abbildung 30: Identifizierung und Quantifizierung von extrazellulär akkumulierenden Metaboliten des Pollenmediums nach verschiedenen Kultivierungszeiten.**

Die einzelnen Metabolite wurden in Gruppen eingeteilt, die den Konzentrationsverlauf über den Kultivierungszeitraum widerspiegeln. Die Skalierung der relativen Intensitäten ist in % (0-100) angegeben. Blau- Nur nach 9 d detektiert. Rot- Nach 9 d am stärksten und auch an einzelnen anderen Zeitpunkten detektiert. Grün- 9 d am stärksten und danach bis Tag 23 detektiert. Grau- Mit abnehmender Konzentration an allen Zeitpunkten detektiert. Orange – Gleichbleibende oder höhere Konzentration im Verlauf der Kultivierung.

Einige Substanzklassen wurden zur Bestätigung mit einer weiteren unabhängigen Methode nach der relativen Quantifizierung mittels spezifischer Messmethoden absolut quantifiziert. Als Beispiel werden an dieser Stelle Prolin und Putrescin gezeigt. Bei beiden Markern konnte innerhalb der ersten Woche in der die Entwicklung zu „Multizellulären Strukturen“ erfolgt, eine signifikant höhere Konzentration detektiert werden, als in den darauf folgenden Wochen (Abbildung 31A&B). Diese zusätzliche Messmethode unterstützt die Daten der relativen Quantifizierung mittels GC-MS.

Innerhalb dieser Untersuchungen wurde auch festgestellt, dass die Konzentrationen einiger Metabolite in unabhängigen Isolationen sich signifikant unterschieden. Dies verdeutlicht die Darstellung zwei unabhängiger Isolationen von Mikrosporen in Abbildung 31 A für Prolin und B für Putrescin (1. Isolation –schwarz, 2. Isolation –grau) mit jeweils 3 unabhängigen Kultivierungen je Isolation. Während in der ersten Isolation für Prolin zunächst eine höhere

Konzentration (1500pmol/ $\mu$ L) gegenüber der zweiten Isolation (800pmol/ $\mu$ L) detektiert werden konnte, so lag nach 2 Wochen die Konzentration in Isolation 1 bereits unter dem Detektionslimit. In Isolation 2 konnte jedoch noch zum dritten untersuchten Zeitpunkt eine geringe Akkumulation von Prolin festgestellt werden. Anders verhielt sich das Amin Putrescin. Hier lag bei beiden Isolationen zum zweiten Zeitpunkt die Konzentration bereits nahe dem Detektionslimit.



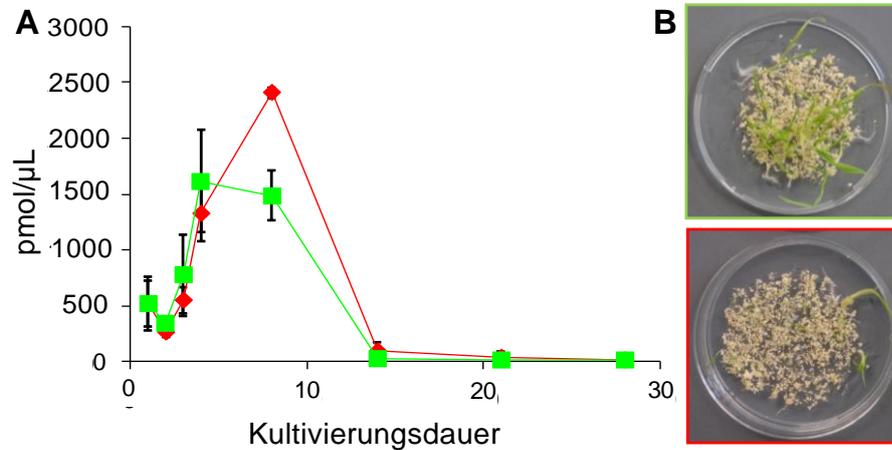
**Abbildung 31: Konzentration von ausgewählten extrazellulären Metaboliten gemessen durch gezielte Substanzanalyse.**

Es wurden jeweils zwei unabhängige Isolationen zu je 4 unabhängigen Kulturen untersucht. Die erste Isolation ist in schwarz und die zweite Isolation in grau dargestellt. A) Prolin in pmol je  $\mu$ L Kulturmedium B) Putrescin in pmol je  $\mu$ L Kulturmedium.

Es ist bereits bekannt, dass unabhängige Ernten zu sehr unterschiedlich hohen Ausbeuten an Multizellulären Strukturen und Regeneraten führen. Aus diesem Grund wurde in einer weiteren Untersuchung die Kinetik von Prolin in kürzeren Analyseintervallen gemessen. Zusätzlich sollte die Ausbeute an Regeneraten in Korrelation gesetzt werden, um die Hypothese, dass Prolin einen Einfluss auf die Regenerationsrate hat zu unterstützen oder zu widerlegen. Prolin wurde gewählt, weil hier die Schwankungen in den einzelnen Isolationen besonders stark ausfielen.

In Abbildung 32A ist der Konzentrationsverlauf von Prolin über 30 Tage dargestellt. Der grüne Graph repräsentiert hierbei Kulturen welche eine bessere Regenerationsrate aufwiesen als die anderen Kulturen, deren Konzentrationen rot dargestellt sind. Nach 7 Tagen

Kultivierungszeit unterscheiden sich die Konzentrationen deutlich voneinander. Dieser Unterschied relativierte sich jedoch in der weiteren Kultivierung wieder und konnten nach 14 Tagen nicht mehr detektiert werden.



**Abbildung 32: Assoziation von im Medium akkumuliertem Prolin mit der Regenerationseffizienz der Pollenkulturen.**

**A) Absolute Konzentrationen von Prolin als Mittelwert  $\pm$ SA während des gesamten Kultivierungszeitraums aller Kulturen mit hoher (grün) oder niedriger (rot) Regenerationsrate.**

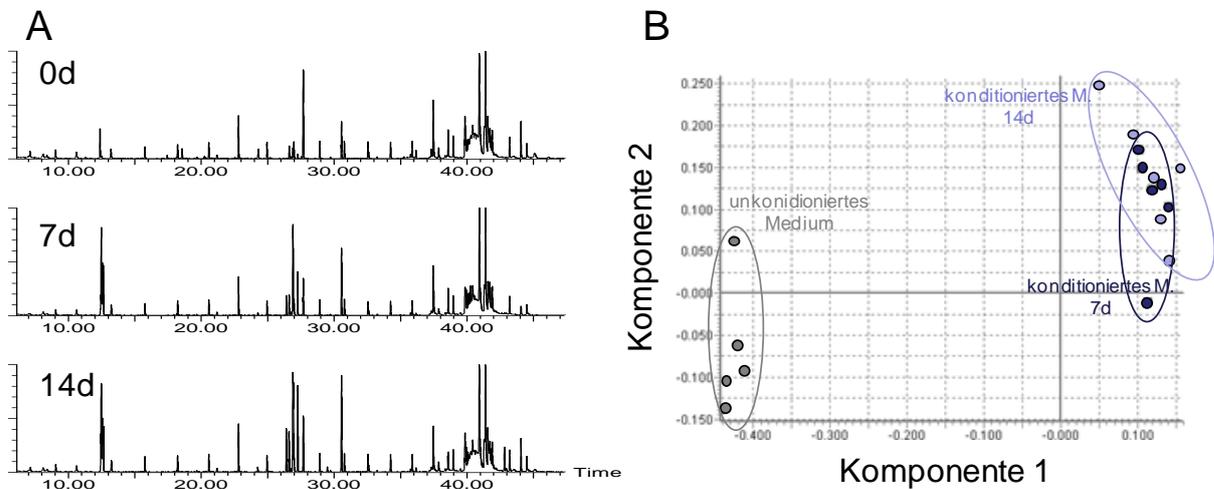
**B) Zwei repräsentative Regenerationskulturen mit jeweils guter (oben) und niedriger (unten) Regenerationsausbeute.**

### 3.2.2.2 Extrazelluläre Metabolite der Pistill-Feeder-Kultur

Da völlig unbekannt ist, welche niedermolekularen Metaboliten einen *Feeder-Effekt* besitzen könnten, wurde auch hier zunächst ein ungerichtetes *Metabolit-Profiling* des Mediums durchgeführt. Da die Zusammensetzung des Kulturmediums der Mikrosporen-Kultivierung entspricht, wurde auf Vorversuche verzichtet und wie in 3.2.25  $\mu$ L eingesetzt. In Abbildung 33A sind exemplarisch Chromatogramme aller drei untersuchten Zeitpunkte dargestellt. Auch hier konnten bei einigen Masse-Signalen deutliche Unterschiede gemessen werden. Dies ist vor allem im Bereich der Monosaccharide (Retentionszeit ca. 25-28 min) oder zum Elutionszeitpunkt von Prolin (Retentionszeit ca. 13 min) der Fall. Wie in 2.3.1.2 beschrieben wurden ca. 6500 detektierte Signale für eine Hauptkomponentenanalyse verwendet (Abbildung 33B). Die konditionierten Medien der Zeitpunkte 7 & 14 d unterscheiden sich innerhalb der ersten Komponente (höchste Varianz) am meisten von unkonditioniertem Medium.

Dies bestätigt, dass es sich bei den Unterschieden nicht um Varianzen der Replikate handelte, sondern vielmehr um tatsächliche Unterschiede in den detektierten Substanzen der einzelnen Medien. Die Unterschiede zwischen 7 und 14 d verwendetem Medium waren sehr gering und

die einzelnen Replikate überlappen miteinander. Dies deutet darauf hin, dass es keine markanten Unterschiede zwischen diesen beiden Zeitpunkten in dieser Untersuchung gab.



**Abbildung 33: Vergleich von unkonditioniertem mit 7 bzw. 14d Pistill-konditioniertem Medium .**

**A) Repräsentative Totalionenchromatogramme der drei untersuchten Medien (TIC Intensität entspricht  $10^6$ ). Zu sehen ist die Sättigung der Mono- und Disaccharide bei allen drei Proben.**

**B) Hauptkomponentenanalyse der entsprechenden Kulturmedien aufgetragen als Pareto-plot (n=6).**

Entsprechende Marker wurden anschließend für die Annotierung der entsprechenden Massen mithilfe der NIST Bibliothek verwendet. Hierbei wurden lediglich die Chromatogramme der konditionierten Medien verwendet, da nur die Substanzen interessant sind, welche ins Medium sekretiert werden. Die annotierten Metabolite sind in Tabelle 6 zusammengefasst. Es konnten nicht alle detektierten Massensignale entsprechenden Substanzen zugeordnet werden. Hierfür wären weitere strukturaufklärende Analysen notwendig.

**Tabelle 6: Annotierte Metabolite oder Derivate, welche sich bei frischem und konditioniertem Medium unterscheiden.**

**Phosphat sowie Inositol sind dabei grau markiert, da es sich bei beiden Substanzen um Komponenten des Kulturmediums handelt. Alle anderen Metaboliten wurden nur im konditionierten Medium identifiziert.**

Metabolit	RT [min]	charakteristisches TMS-Fragment
Lactat	7,0	147,1
Alanin	8,1	204,1
Oxalat	9,1	147,1
Phosphat	12,4	299,1
Harnstoff	11,7	171,1
Glycerol	12,5	204,9
Prolin	12,7	142,1
Metabolit	RT [min]	charakteristisches TMS-Fragment
Serin	14,7	204,1
Malat	17,4	245,1
Fumarat	18,1	245,1
Oxoprolin	18,5	157,1
GABA	18,8	174,1

Maleat	19,1	245,4
Arabinofuranose	20,3	218,1
Zuckerderivat	20,7	318,1
Zuckeralkohol	21,1	205,1
Pentitol	25,2	231,1
Fructose	26,4	307,1
Gluconsäure	26,6	314,1
Galaktose	26,8	319,1
Glucose	26,9	319,1
Inositol	30,1	318,1
Octadecanat	33,2	341,3

### 3.2.2.3 Extrazelluläre Proteine in Embryogenese-stimulierenden Kulturmedien

Die Datensätze der einzelnen Proben wurden zunächst einzeln prozessiert und die entsprechenden Peptide gegen die Datenbank UniRef\_90 gesucht. Je untersuchtem Zeitpunkt wurden nur Proteine berücksichtigt, welche mit mindestens 2 Peptiden in 2 von 3 Replikaten identifiziert wurden. Nach 7 d Kultivierung konnten 47 Proteine identifiziert werden, wohingegen in der 14 d alten Kultur 70 Proteine identifiziert wurden (Abbildung 34-B).

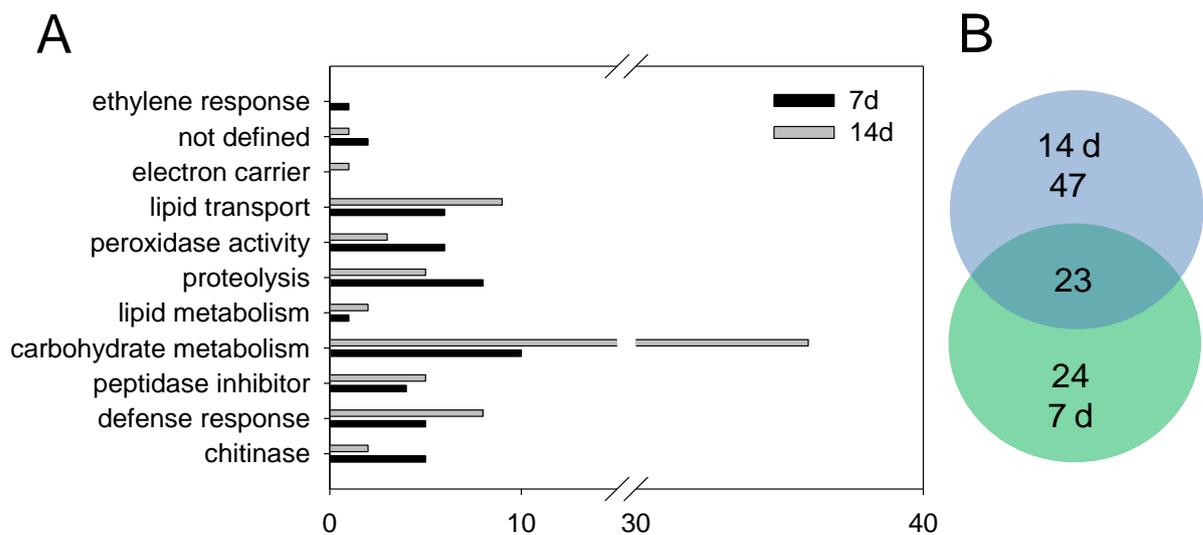


Abbildung 34: Vergleich der Protein-Sekretion von Pistillkulturen nach 7 & 14d.

A) Funktionelle Gruppierung und Gegenüberstellung der einzelnen Proteingruppen nach den entsprechenden Zeiträumen. Die Klassifizierung erfolgte durch *GeneOntology* Kategorisierung und wurde im Original übernommen.

B) Überlappung der annotierten Proteine aus 7 & 14 Tage altem Medium sowie die Anzahl der einzeln identifizierten Proteine.

Innerhalb der beiden Kulturzeiträume gab es eine Schnittmenge von 23 Proteinen. Die entsprechenden „Gruppen“ sind separat in Tabelle 7 aufgeführt. Eine Zusammenfassung der Funktionellen Gruppen ist in Abbildung 34-A dargestellt. Es wird deutlich, dass in beiden Zeitpunkten Proteine des Kohlenstoff/Zucker-Metabolismus am häufigsten vertreten waren. Dabei handelt es sich überwiegend um Glucosidasen oder putative Proteine, welche durch die

entsprechenden charakteristischen Domänen in *GeneOntology* als Glucosidase-Enzyme annotiert wurden. Weitere Proteine wurden unter anderem den Peroxidase-, Stress/Verteidigungs- oder Protease Proteinfamilien zugeordnet.

**Tabelle 7: Proteinidentifizierung der sekretierten Proteine in Pistill-Kulturmedium nach 7 bzw. 14d Kultivierungsdauer.**

Die Proteine sind in entsprechenden Gruppen sortiert, je nachdem ob diese nur zu einem Zeitpunkt identifiziert werden konnten oder in beiden vorhanden waren. Aufgelistet ist der in UniRef90 deklarierte Proteinname, die dazugehörige Akzessionsnummer & GI nummer, Spezies und die Gen-Annotierung (Englisch).

Proteinname	Akzession (GInummer)	Spezies	GO Term
<b>Gruppe 7 &amp; 14 d</b>			
Putative Lipase	UniRef90_A1C0L3 (118748148)	<i>H. vulgare</i>	lipid metabolism
Putative uncharacterized protein	UniRef90_A2YKW3 (125558188)	<i>O. sativa</i>	carbohydrate metabolism
non-specific lipid-transfer protein	UniRef90_A4GU98 (127519390)	<i>T. aestivum</i>	lipid transport
Xylanase inhibitor 725ACCN	UniRef90_A7UME2 (156186245)	<i>T. aestivum</i>	proteolysis
Xylanase inhibitor 801NEW	UniRef90_A7UME6 (156186253)	<i>T. aestivum</i>	proteolysis
Root peroxidase	UniRef90_B4F6E5 (194425583)	<i>T. aestivum</i>	peroxidase activity
Root peroxidase	UniRef90_B4F6E8 (194425589)	<i>T. aestivum</i>	peroxidase activity
Putative Bowman-Birk type wound-induced protease inhibitor	UniRef90_B7SKZ2 (163955788)	<i>T. turgidum</i>	peptidase activity
Putative uncharacterized protein	UniRef90_B9GEE7 (222617522)	<i>O. sativa</i>	not defined
Predicted protein	UniRef90_B9N7Z5 (222873630)	<i>P. trichocarpa</i>	carbohydrate metabolism
Xylanase inhibitor (Fragment)	UniRef90_C1KD96 (226427708)	<i>T. aestivum</i>	proteolysis
Putative uncharacterized protein	UniRef90_C5WXC7 (242039251)	<i>S. bicolor</i>	carbohydrate metabolism
Alpha-galactosidase (Fragment)	UniRef90_O04944 (2204226)	<i>H. vulgare</i>	carbohydrate metabolism
Basic pathogenesis-related protein PR5	UniRef90_O23997 (2344818)	<i>H. vulgare</i>	defense response
Wheatwin-2	UniRef90_O64393 (34925032)	<i>T. aestivum</i>	defense response
Probableon-specific lipid-transfer protein	UniRef90_P26913 (128381)	<i>T. aestivum</i>	lipid transport
Antifungal protein R (Fragment)	UniRef90_P33044 (417986)	<i>H. vulgare</i>	defense response
non-specific lipid-transfer protein 2G	UniRef90_P82900 (46396265)	<i>T. aestivum</i>	lipid transport
Peroxidase	UniRef90_Q05855 (730298)	<i>T. aestivum</i>	peroxidase activity
non-specific lipid-transfer protein	UniRef90_Q2PCB9 (84617189)	<i>T. aestivum</i>	lipid transport
non-specific lipid-transfer protein	UniRef90_Q2PCD1 (84617203)	<i>T. aestivum</i>	lipid transport
Alpha-amylase/trypsin inhibitor	UniRef90_Q2QLS3 (77557128)	<i>O. sativa</i>	endopeptidase inhibitor
Permatin	UniRef90_Q38769 (1373392)	<i>A. sativa</i>	defense response
Endochitinase	UniRef90_Q41539 (416029)	<i>T. aestivum</i>	chitinase activity
Wali3 protein	UniRef90_Q43663 (170791)	<i>T. aestivum</i>	endopeptidase inhibitor
Wali5 protein	UniRef90_Q43665 (170795)	<i>T. aestivum</i>	endopeptidase inhibitor
Xylanase inhibitor	UniRef90_Q531Q2 (62996372)	<i>T. aestivum</i>	proteolysis
Xylanase inhibitor TAXI-IV	UniRef90_Q5TMB2 (257683076)	<i>T. aestivum</i>	proteolysis
non-specific lipid-transfer protein	UniRef90_Q5UNP2 (55275991)	<i>H. vulgare</i>	lipid transport
Probableon-specific lipid-transfer	UniRef90_Q84N29 (75242439)	<i>T. aestivum</i>	response to ethylene stimulus

Proteinname	Akzession (Glnummer)	Spezies	GO Term
protein 3			
Putative alpha-galactosidase	UniRef90_Q84Q36 (34394895)	<i>O. sativa</i>	carbohydrate metabolism
Xylanase inhibitor protein 1	UniRef90_Q8L5C6 (31615809)	<i>T. aestivum</i>	defense response
Alpha-galactosidase	UniRef90_Q9FWV8 (31432821)	<i>O. sativa</i>	carbohydrate metabolism
Alpha-galactosidase	UniRef90_Q9FXT4 (33358179)	<i>O. sativa</i>	carbohydrate metabolism
<b>Gruppe 14d</b>			
Putative uncharacterized protein	Uniref90_A5ALZ9 (147810310)	<i>Vitis vinifera</i>	carbohydrate metabolism
Putative uncharacterized protein	Uniref90_A5AM08 (147810287)	<i>Vitis vinifera</i>	carbohydrate metabolism
Putative uncharacterized protein	Uniref90_A5C5Q1 (147860300)	<i>Vitis vinifera</i>	carbohydrate metabolism
Chemocyanin	Uniref90_B6SXE9 (195615404)	<i>Zea mays</i>	electron carrier activity
nonspecific lipid-transfer protein	Uniref90_B6TKN6 (226491135)	<i>Zea mays</i>	lipid transport
Predicted protein (Fragment)	Uniref90_B9IQ46 (224144974)	<i>P. trichocarpa</i>	carbohydrate metabolism
Alpha-galactosidase	Uniref90_B9RZ40 (223541672)	<i>R. communis</i>	carbohydrate metabolism
Alpha-galactosidase	Uniref90_B9S4D3 (223539983)	<i>R. communis</i>	carbohydrate metabolism
Alpha-galactosidase	Uniref90_B9SAM8 (223537730)	<i>R. communis</i>	carbohydrate metabolism
Putative uncharacterized protein	Uniref90_C5X532 (242048350)	<i>S. bicolor</i>	carbohydrate metabolism
Putative uncharacterized protein	Uniref90_C5X5L7 (242046940)	<i>S. bicolor</i>	carbohydrate metabolism
Putative uncharacterized protein	Uniref90_C5X855 (241923326)	<i>S. bicolor</i>	carbohydrate metabolism
Putative uncharacterized protein	Uniref90_C5Z4E5 (241916084)	<i>S. bicolor</i>	lipid metabolism
Putative uncharacterized protein (Fragment)	Uniref90_C6TFR0 (255640756)	<i>G. max</i>	carbohydrate metabolism
Whole genome shotgun sequence	Uniref90_D7TXW6 (225463809)	<i>V. vinifera</i>	carbohydrate metabolism
Whole genome shotgun sequence	Uniref90_D7TXW8 (297742709)	<i>V. vinifera</i>	carbohydrate metabolism
Whole genome shotgun sequence	Uniref90_D7U6F9 (297744869)	<i>V. vinifera</i>	carbohydrate metabolism
Putative uncharacterized protein	Uniref90_D8QUZ0 (302758986)	<i>S. moellendorffii</i>	carbohydrate metabolism
Alpha-galactosidase	Uniref90_P14749 (113497)	<i>C. tetragonoloba</i>	carbohydrate metabolism
Endochitinase 2	Uniref90_P23951 (1310888)	<i>H. vulgare</i>	chitinase activity
Alpha-galactosidase	Uniref90_Q109H1 (110289320)	<i>O. sativa</i>	carbohydrate metabolism
non-specific lipid-transfer protein	Uniref90_Q1KMU9 (94315725)	<i>T. aestivum</i>	lipid transport
Alpha-galactosidase	Uniref90_Q42656 (2492782)	<i>C. arabica</i>	carbohydrate metabolism
Xylanase inhibitor XIP-III	Uniref90_Q4W6G2 (66766322)	<i>T. aestivum</i>	carbohydrate metabolism
Alpha galactosidase	Uniref90_Q5DUH8 (60417424)	<i>C. arabica</i>	carbohydrate metabolism
Thaumatococin-like protein TLP5	Uniref90_Q5MBN2 (56682582)	<i>H. vulgare</i>	defense response
Glycosyl hydrolase family-like protein	Uniref90_Q5XTZ3 (52699549)	<i>S. miltiorrhiza</i>	carbohydrate metabolism
Alpha-galactosidase (Fragment)	Uniref90_Q6UAY5 (34765755)	<i>P. hybrida</i>	carbohydrate metabolism
Os07g0679300 protein	Uniref90_Q7XIV4 (215708737)	<i>O. sativa</i>	carbohydrate metabolism
Alpha-L-arabinofuranosidase	Uniref90_Q8W012 (18025340)	<i>H. vulgare</i>	carbohydrate metabolism
Thaumatococin-like protein TLP8	Uniref90_Q946Y8 (14164983)	<i>H. vulgare</i>	defense response
Basic endochitinase A	Uniref90_Q9FRV1 (75309544)	<i>S. cereale</i>	chitinase activity
Alpha-galactosidase (Fragment)	Uniref90_Q9FUR8 (10312171)	<i>S. lycopersicum</i>	carbohydrate metabolism
Alpha-galactosidase-like protein	Uniref90_Q9LYL2 (7572929)	<i>A. thaliana</i>	carbohydrate metabolism
Alpha-galactosidase	Uniref90_Q9SP05 (6164944)	<i>S. lycopersicum</i>	carbohydrate metabolism

Proteinname	Akzession (Glnummer)	Spezies	GO Term
<b>Gruppe 7d</b>			
Putative uncharacterized protein (Fragment)	UniRef90_A5AT00 (147805839)	<i>V. vinifera</i>	carbohydrate metabolism
Class II chitinase	UniRef90_B9ZZZ5 (224775714)	<i>V. corymbosum</i>	chitinase activity
Peroxidase (Fragment)	UniRef90_C3V137 (226903590)	<i>T. aestivum</i>	peroxidase activity
Putative uncharacterized protein	UniRef90_C5YQ75 (242082556)	<i>S. bicolor</i>	peroxidase activity
Putative uncharacterized protein	UniRef90_D8RPU0 (302782792)	<i>S. moellendorffii</i>	not defined
Endochitinase	UniRef90_P93680 (3201547)	<i>P. americana</i>	chitinase activity
Cystatin Hv-CPI8	UniRef90_Q1ENF0 (109238651)	<i>H. vulgare</i>	endopeptidase inhibitor activity
Endochitinase (Chitinase)	UniRef90_Q43184 (21495)	<i>S. tuberosum</i>	carbohydrate metabolism
Class III peroxidase 135	UniRef90_Q5U1F8 (115486968)	<i>O. sativa</i>	peroxidase activity
Xylanase inhibitor	UniRef90_Q6KE41 (219923049)	<i>S. cereale</i>	proteolysis
Putative beta-xylosidase (Fragment)	UniRef90_Q75RZ3 (40363751)	<i>T. aestivum</i>	carbohydrate metabolism
Xylanase inhibitor	UniRef90_Q8H0K8 (116666775)	<i>T. aestivum</i>	proteolysis
Chitinase 134	UniRef90_Q9ZWS3 (3790355)	<i>N. tabacum</i>	chitinase activity

Eine Analyse des durch embryogene Pollenkulturen konditionierten Mediums wurde analog zur Untersuchung der sekretierten Proteine aus Pistillkulturen durchgeführt, was zu ähnlichen Ergebnissen geführt hat, so dass an dieser Stelle auf eine detaillierte Tabelle verzichtet wird. Eine Übersicht der entsprechenden Proteine ist in Tabelle 12 aufgeführt. Entscheidender ist jedoch die Identifizierung von Substanzen, die in beiden Medien detektiert wurden, da jedes Medium Embryogenese-stimulierende Eigenschaften hat.

#### 3.2.2.4 Zusammenfassung: Identifizierung Co-sekretierter Substanzen zur Reduktion potentieller Kandidaten

Da sowohl eine Mikrosporenkultur mit entsprechender Zelldichte die Voraussetzungen besitzt eine Kallusbildung zu induzieren, als auch Co-Kulturen von Pistillen diese Aufgabe in nicht regenerierbaren Kulturen substituieren können, sind diese co-identifizierten Substanzen von besonderem Interesse.

Auf **Metabolitebene** waren dies Organische Säuren, wie **Malat, Fumarat, Lactat** als auch Aminosäuren wie **Alanin, Serin, Prolin, 5-Oxoprolin und GABA**. Auch **Fructose** war in beiden Medien zu finden.

Innerhalb der Proteinanalysen konnte die hohe Anzahl an Proteinen deutlich reduziert werden, wenn nur diese in Betracht gezogen werden, die in beiden Medien identifiziert wurden. Diese sind in Tabelle 8 zusammengefasst.

**Tabelle 8: In Mikrosporen- und Pistillmedium) co-identifizierte Proteine mit UniProt ID und dazugehörigen Proteinnamen**

Akzession	Proteinname
Q8H4B9	Putative translational inhibitor protein
O64393	Wheatwin 2
Q8W012	Alpha L arabinofuranosidase beta D xylosidase
Q948T6	Lactoylglutathione lyase
Q9XEI3	Beta D glucan exohydrolase isoenzyme
A2YP51	Putative uncharacterized protein (peroxidase)
A2ZSI8	Putative uncharacterized protein (peroxidase)
A3C619	Putative uncharacterized protein
P34937	Triosephosphate isomerase
Q1ENF0	Cystatin Hv CPI8

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass zahlreiche Substanzen in beiden Medien akkumulierten.

- Während der Etablierung mit einer Suspensionskultur konnten neue Isoformen annotiert werden, die noch nicht in der Datenbank enthalten waren.
- Auf Metabolitebene wurden vor allem Aminosäuren und organische Säuren in hohen Mengen detektiert.
- Die extrazelluläre Prolinkonzentration korreliert mit der Regenerationsrate
- Proteinmuster zeigten ein ähnliches Muster in den untersuchten Embryogenese-stimulierenden Medien. Vorwiegend wurden Glycosidasen, PR-Proteine und Peroxidasen identifiziert.
- Co-identifizierte Substanzen scheinen die aussichtsreichsten Kandidaten zu sein und ein Vergleich führte zu einer starken Reduktion potenziell relevanter Substanzen.

### 3.2.3 Etablierung des Biotests zur präzisen Bestimmung der *Feeder*-Qualität

Um in dieser Arbeit den Effekt von einzelnen Substanzen bzw. Fraktionen des Gesamtmediums zu nutzen wurde ein Biotest etabliert, der eine möglichst genaue Aussage über die *Feeder*-Qualität und Quantität trifft. Hierzu wurde die kritische Populationsdichte der Pollenkulturen ausgenutzt, die nötig ist um eine effiziente embryogene Entwicklung zu gewährleisten. Unterhalb dieser kritischen Dichte blieb eine nachhaltige Zellproliferation im Pollen aus. Durch Co-Kultivierung geeigneten heterologen Gewebes kann der Effekt einer zu geringen Populationsdichte kompensiert werden. Durch dieses System ist es erstmals möglich exogene stimulierende Wirkungen getrennt vom Populationseffekt zu untersuchen.

Eine schematische Darstellung des Kultivierungssystems ist in Abbildung 35 dargestellt. Durch dieses System war es möglich Medium in der größeren Kulturschale auszutauschen, ohne dabei die sich entwickelnden Pollen versehentlich zu entfernen. Durch die Membran mit einer Porengröße von  $0,45\ \mu\text{m}$  wird dennoch ein nahezu freier Stoffaustausch zwischen beiden Kompartimenten des Kultursystems ermöglicht.

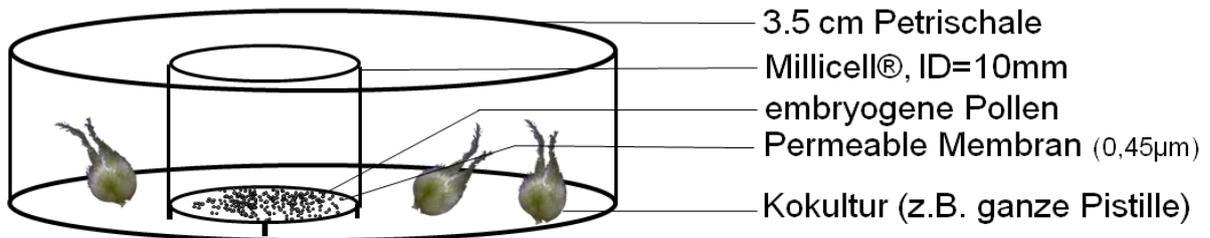


Abbildung 35: Aufbau des Biotest für Co-Kultivierungsexperimente mit Millicell®-Einsätzen ( $0,45\ \mu\text{m}$  Porengröße).

150 unreife Pollen wurden innerhalb der Zelle kultiviert mit der Ammenkultur bzw. den verschiedenen Behandlungen im äußeren Bereich.

### 3.2.3.1 Bestimmung der kritischen Populationsdichte der Pollenkultur

Verschiedene Populationsdichten embryogener Pollen ( $100$  bis  $3200\ \text{mL}^{-1}$ ) wurden in Millicell®-Inserts ohne Zugabe heterologen Gewebes wie in 3.2.3 beschrieben, kultiviert. Alle Varianten mit Populationsdichten unterhalb von  $1,600$  Pollen pro mL bildeten keine Mikrokalli aus (Abbildung 36/1-4). Unter diesen Bedingungen konnten lediglich einige Zellteilungen innerhalb der Pollenkörner detektiert werden, ein Aufbruch der äußeren Pollenwand (Exine) durch sich entwickelnden Kallus erfolgte jedoch nicht. Erst ab einer anfänglichen Zahl von  $1,600$  Pollen  $\text{mL}^{-1}$  konnte eine Entwicklung von Mikrokalli ( $>100\ \mu\text{m}$ ) detektiert werden, was auf eine gerade noch ausreichende Abundanz von entwicklungsfördernden Signalen ohne zusätzliche Co-Kultur hinweist (Abbildung 36/5-6). Somit konnte eine Populationsdichte von  $1,600$  Pollen  $\text{mL}^{-1}$  als kritischer Wert für *Hordeum vulgare* cv. „Igric“, „Igric“ in diesem Kultivierungssystem ohne Co-Kultur angesehen werden.

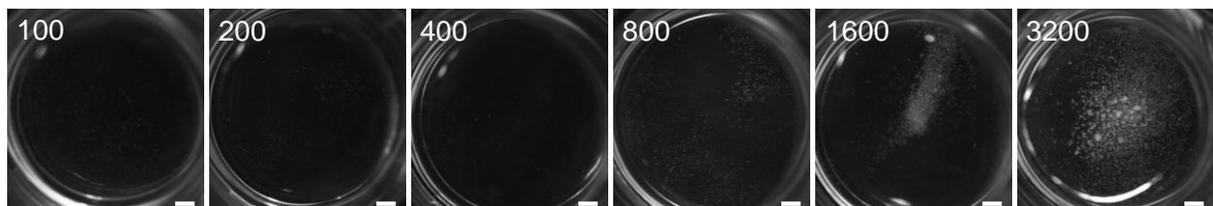


Abbildung 36: Kultivierung Embryogenese-kompetenter unreifer Pollen in Millicell®-Inserts zur Bestimmung der kritischen Populationsdichte, bei der eine embryogene Entwicklung ohne Feeder-Kultur möglich ist.

In den Varianten 100-800 Pollen je Insert sind Zellteilungen auf das Innere der Pollen beschränkt, wohingegen in den Varianten ab 1600 Pollen je Insert Mikro- und einige wenige Makrokalli entstehen.

Wie in den oberen Abschnitten gezeigt, wurde ein komplexes Spektrum an sekretierten Komponenten im Kulturmedium identifiziert. Die Komplexität sollte mithilfe verschiedener Fraktionierungsmethoden reduziert werden, um Aussagen über die tatsächliche(n) *Feeder*-Substanz(en) zu treffen. Da in ersten Versuchen gezeigt wurde, dass eine einmalige Zugabe von konditioniertem Medium nicht ausreicht, wurde zunächst die optimale Anzahl an Pistillen in der Co-Kultur und die Frequenz des regelmäßigen Austauschs bestimmt.

### 3.2.3.2 Bestimmung der notwendigen Anzahl an Pistillen für das Regenerationsmedium

Um die notwendige Anzahl an Pistillen zu bestimmen, die verwendet werden müssen, um ein ausreichend konditioniertes Medium für die Versuche zu generieren, wurden zunächst unterschiedlich viele Pistille in KPB-Medium kultiviert (Abbildung 37). Dieses wurde alle zwei Tage den Pollenkulturen zugegeben, da eine einmalige Zugabe nicht ausreichte. Im Vergleich zur positiv-Kontrolle (dauerhafte Co-Kultur) konnten keine markanten Unterschiede der Kallusbildung bei Mediumregeneration mit konditioniertem Medium von Kulturen mit 10 oder 20 Pistill je mL festgestellt werden. Lediglich während der ersten Hälfte der regulären Kultivierungsdauer war eine langsamere Entwicklung zu verzeichnen. Da jedoch, bei dem zu etablierenden Bioassay, die Quantität an Kallusstrukturen nicht primär entscheidend war, wurde in weiteren Versuchen eine Konditionierung des *Feeder*-Mediums mit 10 Pistillen je mL verwendet.

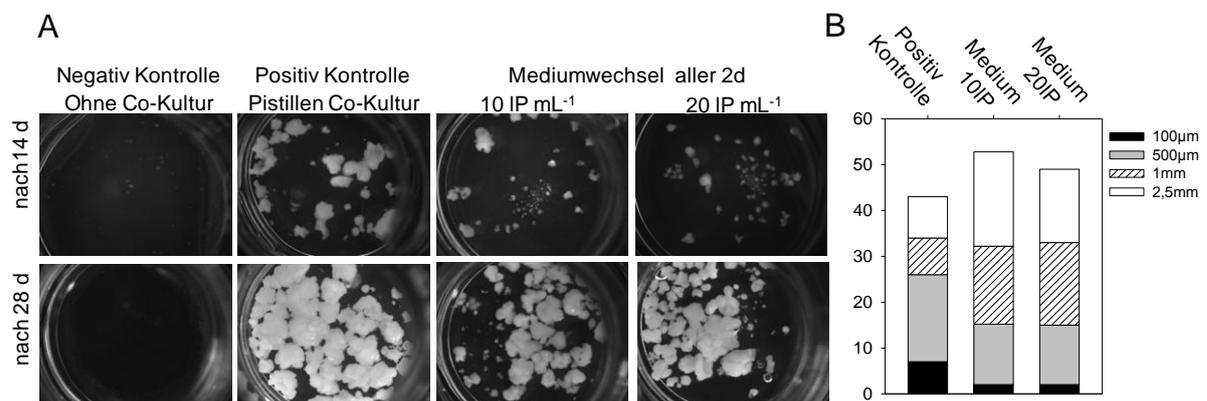


Abbildung 37: Effekt der Zugabe von konditioniertem Medium aus unterschiedlich dichten Pistillkulturen auf die Pollenembryogenese.

A) Gezeigt ist die Entwicklung von Kallusstrukturen (weiß) innerhalb eines *Millicells*<sup>®</sup> (ID=10mm) mit 150 Pollen verglichen mit einer dauerhaften Co-Kultivierung von Pistillen jeweils nach 14 d bzw. 28 d.

B) Quantitative Auswertung der verschiedenen Größenordnungen entwickelter Kallusstrukturen (schwarz- >2,5 mm, grau >1 mm, schraffiert <500 µm, weiß >100 µm). IP – longitudinal geschnittene Pistille

### 3.2.3.3 Optimierung der Erneuerung von konditioniertem Medium

Da das Ersetzen des Mediums in einem zweitägigen Rhythmus einen großen Verbrauch an konditioniertem Medium darstellt und die Häufigkeit des Medienwechsels auch unnötigen Stress für die Kulturen bedeuten könnte, wurde in einem weiteren Experiment versucht, die Frequenz des Austauschs zu vergrößern. Die Ergebnisse dieser Untersuchung wurden nur qualitativ ausgewertet, da nur zwei diskrete Zustände -Wachstum/ kein Wachstum-interessierten. Zum Vergleich wurde jeweils eine konstante Co-Kultur verwendet. In Abbildung 38 sind 3 der getesteten Intervalle repräsentativ jeweils nach 14 und 28d gezeigt. Hierbei ist deutlich eine Entwicklung bis zu einer Medienerneuerung von 4d zu erkennen. Die entwickelten Strukturen zeigten nach 14d ein kleineres Volumen gegenüber der Positivkontrolle jedoch entwickelten sich diese vollständig zu Makrostrukturen (nach 28d) welche nicht von der Positivkontrolle zu unterscheiden sind. Bei einer Frequenz des Mediaumaustauschs von 7d konnte keine Entwicklung von Kallusstrukturen verzeichnet werden. Für die weiteren Analysen wurde der Austausch des Mediums jeweils nach 4 Tagen durchgeführt.

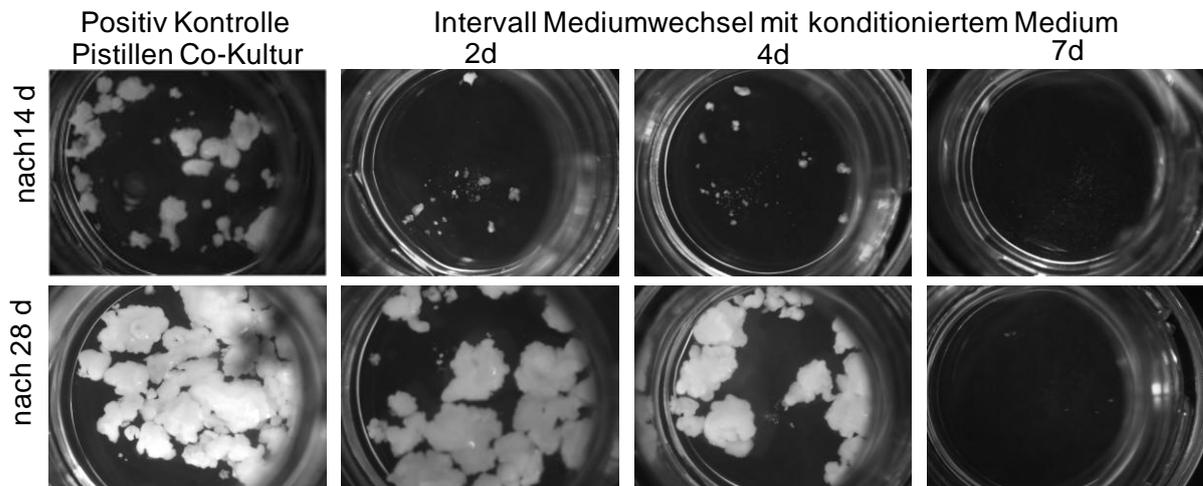


Abbildung 38: Effekt der Zugabe von konditioniertem Medium aus Pistillkulturen auf die Pollenembryogenese.

Gezeigt ist die Entwicklung von embryonem Kallus (weiß) innerhalb eines *Millicells*<sup>®</sup> (ID=10mm) mit 150 Pollen bei unterschiedlichen Intervallen des Austauschs von Medium (2-7d) verglichen mit einer dauerhaften Co-Kultivierung von Pistillen jeweils nach 14 bzw. 28d.

---

Zusammenfassend lässt sich sagen:

- Unterhalb von 1600 Pollen  $\text{ml}^{-1}$  war keine Pollenembryogenese ohne exogene Stimulation möglich.
- Die einmalige Zugabe von konditioniertem Medium ist für eine Stimulation unzureichend. Das minimale Intervall für eine Stimulierung mit konditioniertem Medium beträgt 4 Tage.

### **3.2.4 Reduzierung der Anzahl potentiell relevanter Substanzklassen mithilfe des Biotests**

In 3.2.2 wurde gezeigt, dass eine Vielzahl an Substanzen unterschiedlichster Kategorien in konditioniertem Medium akkumuliert. Nur ein Teil konnte tatsächlich identifiziert werden. Um die möglichen aktiven Komponenten zu identifizieren, sollten zunächst einzelne Klassen sowie Substanzen ausgeschlossen werden, um in weiteren Arbeiten den Fokus auf tatsächlich bioaktive Fraktionen zu lenken. Dies ermöglicht zudem eine bessere Aufreinigung dieser Substanzen. Zunächst wurde daher das gesamte Medium nach Molekulargewicht fraktioniert. Anschließend, als keine weitere Auflösung der aktiven Fraktion möglich war, wurde diese mithilfe weiterer Extraktionsmethoden aufgetrennt.

#### **3.2.4.1 Fraktionierung nach Molekulargewicht zeigte Bioaktivität unterhalb von 3 kDa**

Innerhalb dieser Experimente wurde konditioniertes Medium nach Molekulargewicht separiert. Jeweils die höher molekulare Fraktion wurde auf die entsprechende Ausgangskonzentration verdünnt, da diese während der Aufarbeitung aufkonzentriert wurde. Die in Abbildung 39 gezeigten Aufnahmen repräsentieren jeweilige Beispiele der Entwicklung nach 28 d Kultivierungszeit. Es ist deutlich zu sehen, dass innerhalb der ersten Fraktionierung nur die niedrigmolekulare Fraktion (<10 kDa) einen positiven Einfluss auf die Entwicklung aufwies. Durch dieses Ergebnis können zunächst Proteine als die essentielle *Feeder*-Substanz ausgeschlossen werden. Eine weitere Fraktionierung zeigte dass sich dies Substanz(en) innerhalb der Fraktion <5 kDa befinden muss. Letztendlich reduzierten sich die möglichen Kandidaten auf Moleküle <3 kDa, da nur diese Fraktion bioaktiv ist und eine Entwicklung von Makrostrukturen stattfand.

Somit können auch größere Peptide mit mehr als 50 Aminosäuren sowie hochmolekulare Metabolite ausgeschlossen werden. Diese Resultate konnten in drei unabhängigen Experimenten erzielt werden. Die entsprechenden Bilder aller drei Replikate sind im Anhang

---

in Abbildung 60 gezeigt. Es ist jedoch deutlich zu erkennen, dass die Fraktionen eine verminderte *Feeder*-Qualität besitzen.

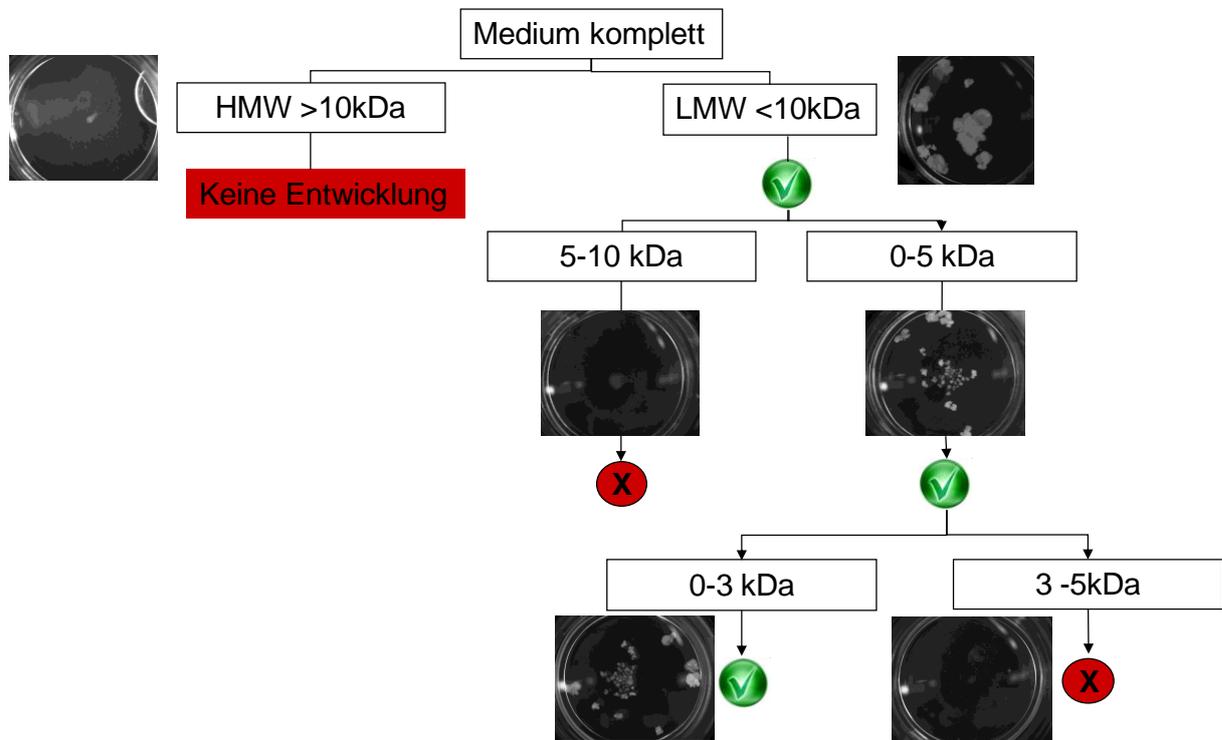
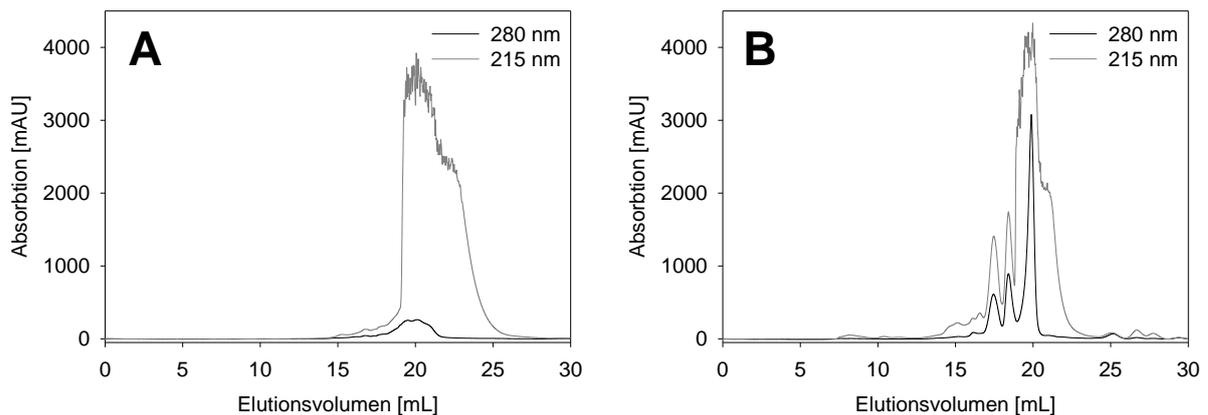


Abbildung 39: Test verschiedener Fraktionen konditionierten Mediums von Pistillkulturen.

Dieses wurde durch Größenausschlusszentrifugation nach entsprechendem Molekulargewicht getrennt und einzelne Größenfraktionen jeweils in 3 biologischen Replikaten getestet. Gezeigt werden repräsentative Beispiele der Entwicklung von embryonem Kallus (weiß) innerhalb der *Millicell*<sup>®</sup>-Inserts.

### 3.2.4.2 Fraktionierung mittels Gelfiltration

Eine weitere Fraktionierung der 3 kDa Fraktion wurde durch Gelfiltration konzentrierten Mediums durchgeführt. In Abbildung 40-A ist jeweils die Absorption bei 280 nm (schwarz) und 215 nm (grau) dargestellt. Das Medium konnte aufgrund der hohen Viskosität durch den hohen Maltoseanteil nur 6-fach konzentriert werden. Es ist deutlich zu erkennen, dass das Signal bei 280 nm, welches ein Indikator für Peptide ist deutlich niedriger ist als bei 215 nm. Die Fraktionen (2mL) wurden innerhalb der Fütterungsversuche getestet, jedoch konnte keine der Fraktionen die Pollenembryogenese stimulieren. Aus diesem Grund wurde in weiteren Versuchen konditioniertes Medium ohne Maltose verwendet. Hierdurch wurde ein deutlich besseres Verhältnis zwischen den Absorptionen 280/215 nm erhalten und zudem konnte eine 20-fach konzentrierte Probe verwendet werden (Abbildung 40-B).



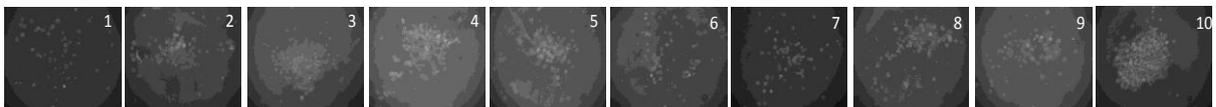
**Abbildung 40: Gelfiltration von konditioniertem Pistillmedium (7d) mittels Superdex Peptide 10/300GL Trennsäule und 100 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  Puffer.**

Injektionsvolumen jeweils 100  $\mu\text{L}$ . Fraktionen wurden jeweils zwischen 10 & 30 mL à 2 mL gesammelt.

**A) Repräsentatives Elutionsprofil des 6-fach konzentrierten Mediums mit Maltose bei 280 nm (schwarz) und 215 nm (grau).**

**B) Repräsentatives Elutionsprofil 20-fach konzentrierten Mediums ohne Maltose bei 280 nm (schwarz) und 215 nm (grau).**

Die einzelnen Fraktionen in frischem KPB-Medium aufgenommen, zeigten jedoch auch keinen *Feeder*-Effekt (Abbildung 41). Dieses negative Ergebnis konnte in drei unabhängigen biologischen Wiederholungen bestätigt werden.



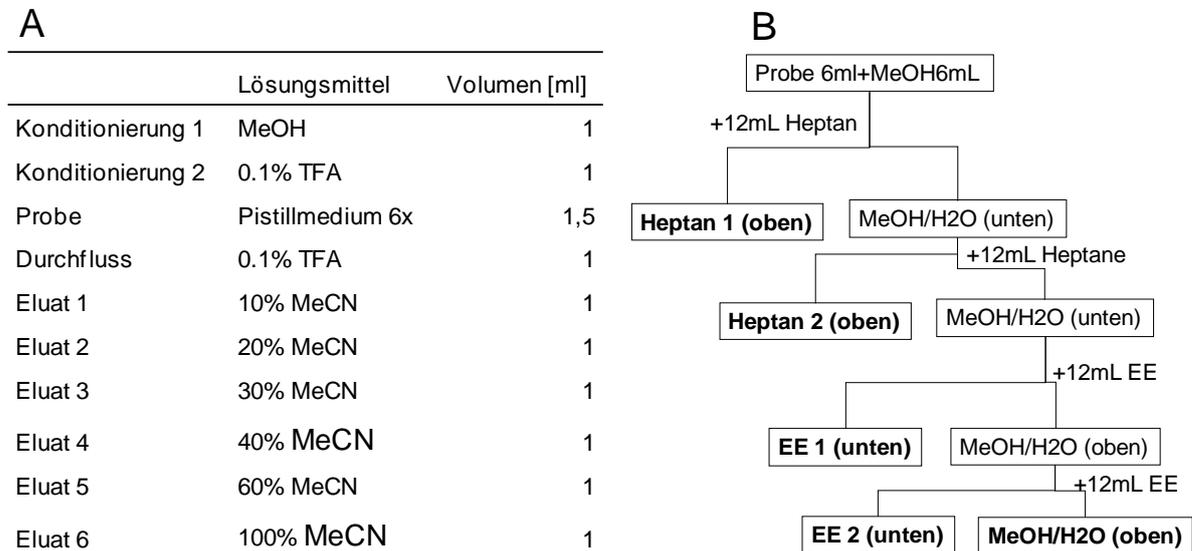
**Abbildung 41: Kultivierung Embryogenese-kompetenter unreifer Pollen in *Millicell*<sup>®</sup>-Inserts nach 28d unter Zugabe von Fraktionen konditionierten Mediums nach Trennung mit Gelfiltration.**

In allen Fraktionen ist keine Entwicklung zu erkennen. Die Pollen sterben innerhalb der ersten Woche bereits ab.

Innerhalb dieses Versuches erfolgte eine weitere Auftrennung der 3 kDa Fraktion nach Polarität durch Festphasen oder Flüssig/Flüssig-Extraktion. Verwendete Kartuschen für die Fraktionierung waren HLB-Festphasenkartuschen von Waters<sup>®</sup>. Die Separierung erfolgte mit einem Stufengradienten des Eluenten (Abbildung 42A). Doch keine der isolierten Fraktionen zeigte einen positiven *Feeder*-Effekt auf die Pollenkulturen, der auch nicht durch die Vereinigung aller Fraktionen wiederhergestellt werden konnte.

Eine weitere Trennung erfolgte durch die 2-Phasenextraktion innerhalb polarer und unpolarer Lösungsmittel. Hierzu wurden verschiedene Lösungsmittel unterschiedlicher Hydrophobizität (Heptan, Methanol, Wasser und Ethylacetat) verwendet. Die entsprechende Extraktion kann

Abbildung 42B entnommen werden. Wie auch in den vorherigen Methoden, konnte keine positive Stimulation detektiert werden.



**Abbildung 42: Extraktionsprozedur von konditioniertem Medium nach Größenfraktionierung.**

**A) Schritte der Festphasenextraktion der bioaktiven Fraktion mittels HLB-Festphasenkartuschen.**

**B) Schemas der 2 Phasentrennung mittels Heptan, MeOH und Essigsäureethylester (EE).**

Zusammenfassung:

- Durch Größenausschluss Fraktionierung wurde die Bioaktivität auf die Fraktion kleiner 3kDa eingegrenzt.
- Weitere Auftrennung mit Festphasenextraktion oder 2-Phasen Extraktion zeigte keine Bioaktivität nach der Aufarbeitung

### 3.3 Effekt der Co-Kultivierung von Pistillen aus Weizen

Der positive Effekt von „Ammenkulturen“ während der Pollenembryogenese ist in der Literatur bereits für mehrere Pflanzenspezies beschrieben. Der sogenannte *Feeder*-Effekt wurde jedoch meist an Kulturen getestet, die bereits eine Eigenkapazität der Pollenembryogenese aufweisen, was zu einer Verfälschung des Ergebnisses führen kann. Zusätzlich hat die biologische Diversität der einzelnen Pollenisolationen und daraus resultierenden Schwankungen sich selbst zu stimulieren, einen Einfluss auf die Ergebnisse aus biologischen Replikaten, was zu einer Verwässerung der Aussage führt. Aus diesem Grund wurde wie bereits beschrieben auch in dieser Untersuchung eine Populationsdichte gewählt die keine eigene Stimulation der Embryogenese gewährleistet.

### 3.3.1 Effekt der Co-Kultivierung von verschiedenem dissektierten Material von Weizen Pistillen

Um bei den weiteren Untersuchungen eine Bewertung des *Feeder*-Effektes co-kultivierten Gewebes unabhängig vom Populationseffekt der embryogenen Pollenkulturen zu ermöglichen, wurden die folgenden Experimente mit einer Populationsdichte von ca. 75 Pollen pro mL durchgeführt, also bei weniger als 10 % der höchsten Populationsdichte, die ohne co-kultivierte Pistillen noch zu keiner Mikrokallus-Entwicklung führte. Dadurch konnte es auf keinen Fall zu einem selbst stimulierenden Effekt kommen und eine genauere Quantifizierung des Effektes heterologen *Feeder*-Gewebes innerhalb der Kulturschale war möglich. Für die Untersuchung wurden Weizen-Pistille verwendet, da keine Unterschiede in der *Feeder*-Quantität zwischen Gerste und Weizen festzustellen ist und sich diese wesentlich leichter isolieren lassen.

Da Pistille aus diversen Geweben bestehen, stellte sich die Frage, auf welches dieser Gewebe der *Feeder*-Effekt zurückzuführen ist. Dazu wurden verschiedene Teile der Pistille für die Co-Kultivierung verwendet. Eine schematische Darstellung ist in Abbildung 43 zu sehen.

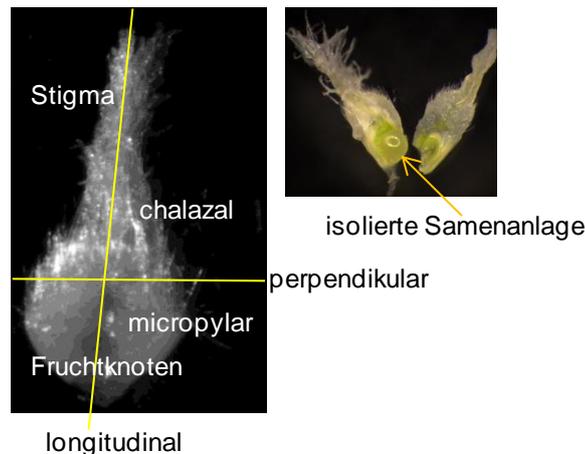


Abbildung 43: Schematische Darstellung der verwendeten Teilgewebe der Pistillen.

Gezeigt werden die einzelnen Regionen der Pistille, welche nach Zerteilung verwendet wurden. Die gelben Linien geben dabei die Schnittachse für die perpendikuläre und die longitudinale Trennung wieder. Im rechten Bild ist die Isolation der Samenanlagen dargestellt, die in ganzem oder geteiltem Zustand für die Co-Kultivierung verwendet wurden.

Die gelben Linien geben dabei die Schnittachse für die perpendikuläre und die longitudinale Trennung wieder. Im rechten Bild ist die Freilegung einer Samenanlage dargestellt, welche für eine Co-Kultivierung verwendet wurde. Als Kontrollkultur diente bei den Versuchen eine Pollenkultur mit  $50.000 \text{ Pollen mL}^{-1}$  in der größeren Kulturschale, die einer regulär verwendeten Populationsdichte mit Eigen-*Feeder*-Kapazität entspricht. Die Ergebnisse der Untersuchung sind in Abbildung 44 dargestellt.

Die entwickelten Kalli wurden in verschiedene Größenkategorien unterteilt, wobei im Weiteren Strukturen mit einer Mindestgröße von 100 µm als Mikrokalli und jene größer 500 µm als Makrokalli bezeichnet werden. Diese Unterteilung ist deshalb von Bedeutung, da bereits in früheren Experimenten gezeigt wurde, dass eine Pflanzenregeneration fast ausschließlich aus Kalli bzw. Embryonen mit einer gewissen Mindestgröße (>500µm) stattfindet. Innerhalb der quantitativen Auswertung aller entwickelten Strukturen (Mikro- & Makrokalli) konnte nur bei der Co-Kultivierung von isolierten Samenanlagen ein signifikant negativer Effekt festgestellt werden. Bei einer zusätzlichen Teilung der Samenanlage verringerte sich die Anzahl an Kalli weiter auf ein Fünftel oder es konnte gar keine Entwicklung von Kallusstrukturen festgestellt werden, was jedoch auf das unter den gegebenen Kulturbedingungen erfolgende Absterben isolierter Samenanlagen zurückzuführen sein könnte.

Wie bereits beschrieben sind jedoch Makrokalli von größerer Bedeutung im Hinblick auf das Regenerationspotential. Die quantitative Auswertung der Bildung von Makrokalli zeigte, dass neben der Co-Kultivierung von Samenanlagen- auch in den Kontrollkulturen eine vergleichsweise geringe Entwicklung erfolgte. Eine Co-Kultivierung mit ganzen Pistillen führte im Vergleich zur Kontrolle zu einer signifikanten, um 40 % erhöhten Ausbeute von Makrokalli. Während sich bei der Co-Kultivierung abgetrennter Stigmata kein nachweisbarer Unterschied zur Co-Kultur ganzer Pistille ergab, wurde mit Ovarien (Pistille ohne Stigmata) sowie mit chalazalen Ovarienhälften eine signifikant bessere Entwicklung von Makrokalli detektiert.

Interessanterweise konnte eine höhere Ausbeute an Makrokalli auch bei der Zugabe von chalazalen Ovarienhälften im Vergleich zu mykopylaren Hälften detektiert werden (Abbildung 45B(2)). Lediglich eine schnellere Ausbildung von multizellulären Strukturen konnte bei der Kultivierung mit Stigmata gegenüber Ovarien beobachtet werden. Der beste Stimulations-Effekt konnte jedoch bei geschnittenen Pistillen verzeichnet werden. Der positive Einfluss von geschnittenen Pistillen zeigte sich zudem noch deutlicher bei der Co-Kultur longitudinal geschnittener Pistille im Vergleich zu anderen geschnittenen Varianten. Hier stieg die Ausbeute an Makrokalli gegenüber ganzer Pistille um das 2,2-fache bei längs geschnittenen, bzw. das 2,7-fache wenn zusätzlich die Samenanlage entfernt wurde an.

---

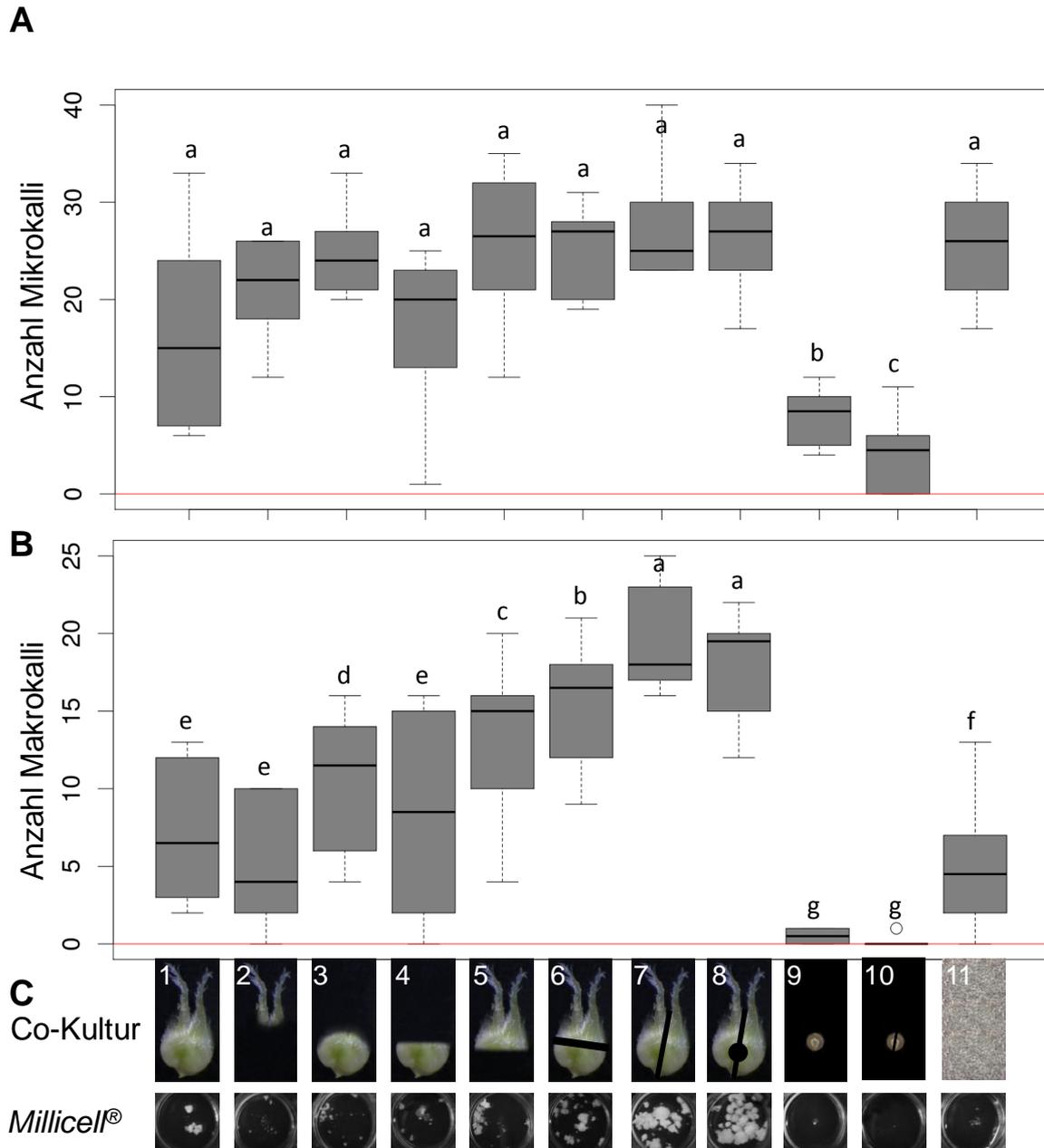


Abbildung 44: Effekt der Co-Kultivierung von dissezierten Weizen-Pistillen oder einzelner Gewebeteile auf die Entwicklung während der Pollenembryogenese.

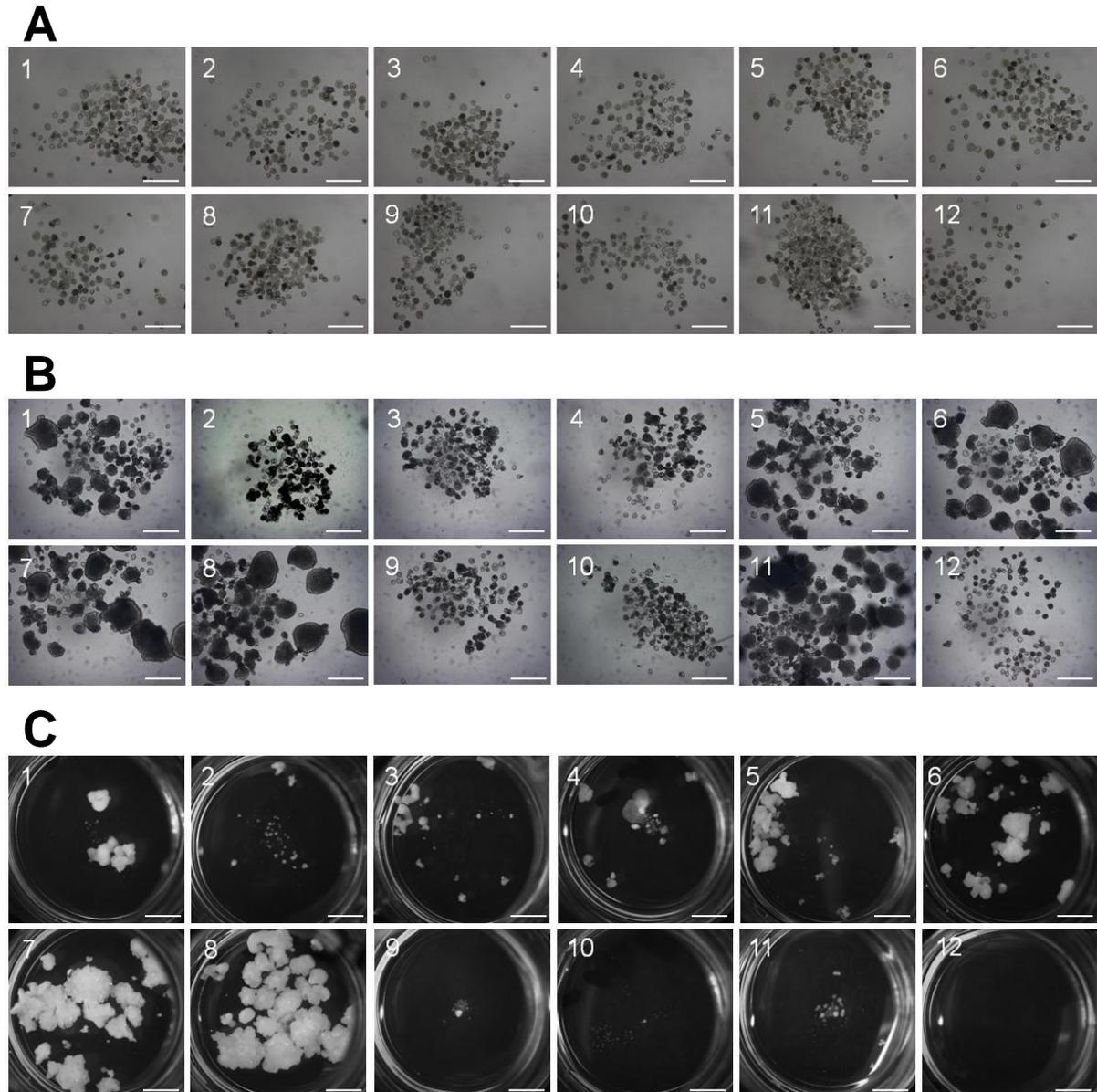
A) Gesamtanzahl entwickelter Kalli je Kulturschale mit einer Mindestgröße von 100  $\mu\text{m}$ .

B) Anzahl der Makrokalli je Kulturschale größer als 500 $\mu\text{m}$ . Diese Strukturen besitzen die größte Kompetenz einer nachfolgenden Pflanzenregeneration.

C) Die Bilder repräsentieren die entsprechende Co-Kultur (oben) mit entsprechender Pollenentwicklung innerhalb der *Millicell*®-Inserts

1 Pistille, 2 Stigma, 3 Fruchtknoten, 4 mykopylare Hälfte, 5 chalazale Hälfte, 6 perpendikular geteilte Pistille, 7 longitudinal geteilte Pistille, 8 longitudinal geteilte Pistille ohne Samenanlage, 9 Samenanlage, 10 Samenanlage geschnitten, 11 Embryogene Pollenkultur (50.000 Pollen). Ohne jegliches *Feeder*-Gewebe ist bei der verwendeten Populationsdichte der Pollen in keinem Fall eine Entwicklung von Mikro- und Makrokalli zu verzeichnen, was durch die rote Linie repräsentiert wird. Unterschiedliche Buchstaben über den *Box Plots* repräsentieren signifikante Unterschiede zwischen den entsprechenden Varianten ( $P < 0,05$ ).

Ein Vergleich der Geschwindigkeit der Entwicklung einzelner embryogener Strukturen unter den verschiedenen Bedingungen, ist in Abbildung 45-B dargestellt.



**Abbildung 45:** Einfluss auf die Entwicklungsgeschwindigkeit während der Pollenembryogenese durch verschiedene Co-Kultivierungen.

A) Pollen nach 7d in KPB-Medium. Balken entspricht 100µm B) Pollenkulturen nach 14d. Balken entspricht 140µm C) Aufnahmen der gesamten *Millicell* nach 28d Co-Kultivierung. Balken entspricht 2 mm. Die entsprechenden Nummerierungen der Co-Kultivierungen sind 1 Pistille, 2 Stigma, 3 Fruchtknoten, 4 mykopylare Hälfte, 5 chalazale Hälfte, 6 perpendikular geteilte Pistille, 7 longitudinal geteilte Pistille, 8 longitudinal geteilte Pistille ohne Samenanlage, 9 Samenanlage, 10 Samenanlage geschnitten, 11 Embryogene Pollenkultur (50.000 Pollen) 12 keine Co-Kultur als Negativkontrolle. (Balken entsprechen in A=100 µm, B=140 µm, C=2 mm).

Während alle Kulturen nach 7 d gleich aussahen, konnte nach 14 d eine unterschiedliche Entwicklung festgestellt werden (Abbildung 45-B). Diese Beobachtung korreliert auch mit

den Ergebnissen der quantitativen Auswertung nach 28 d. Eine abweichende Entwicklung erfolgte in diesem Zusammenhang lediglich bei der Co-Kultivierung von 50.000 Pollen (11) und der Kultivierung mit Narbengewebe (2), die bereits nach 14 d einige Makrokalli hervorgebracht hatte, deren Häufigkeit und Größe jedoch verglichen mit den geteilten Pistillen (6-8) im weiteren Kulturverlauf nicht mehr substantiell zunahm.

### 3.3.2 Effekt der Anzahl co-kultivierter longitudinal geschnittener Pistille

Wie im Abschnitt 3.3.1 gezeigt, kann unter Verwendung längs geteilter Pistille (IP) die Herausbildung von Makrokalli signifikant erhöht werden. Zur Bestimmung der optimalen Anzahl an co-kultiviertem Material wurden 0,5 bis 6 IP je mL Medium co-kultiviert. Die Analyse der Mikrokalli ( $>100\ \mu\text{m}$ ) zeigte lediglich bei einer Kultivierung eines halben Pistills pro mL eine im Vergleich zur Co-Kultur von 50.000 embryogenen Pollen signifikant verringerte Ausbeute (Abbildung 46A). Betrachtet man die Anzahl der Makrokalli ( $>500\ \mu\text{m}$ ) wies die Verwendung von 1 bis 6 IP pro mL untereinander keine statistisch gesicherten Unterschiede auf, auch wenn ein tendenzieller Anstieg der Entwicklung von Makrokalli zu verzeichnen war, je mehr Pistille eingesetzt wurden.

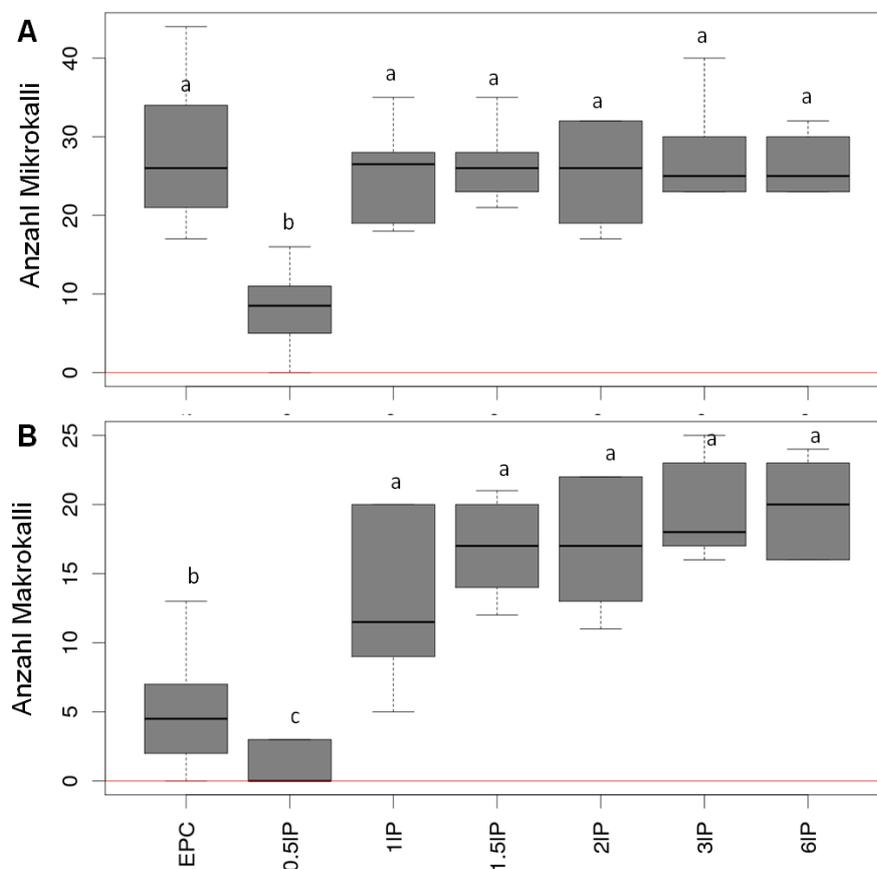
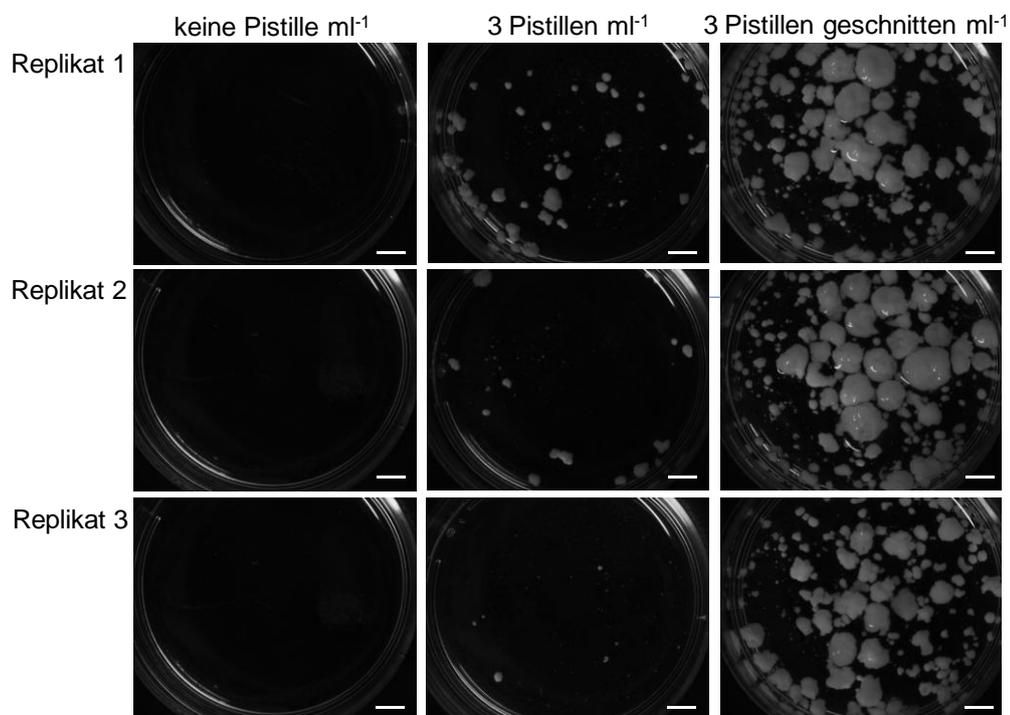


Abbildung 46: Effekt der Anzahl co-kultivierter Pistille auf die Pollenembryogenese. A) Gesamtanzahl entwickelter Kalli mit einer Mindestgröße von  $100\ \mu\text{m}$ . B) Anzahl der Makrokalli größer als  $500\ \mu\text{m}$ . IP=longitudinal geschnittene Pistillen

### 3.3.3 Validierung der Ergebnisse an ‘Golden Promise’ als Modell

Um das *Feeder*-System, das anhand des für die Pollenembryogenese besonders gut geeigneten Modell-Kultivars ‚Igri‘ (längs geschnittene Pistillen) optimiert worden war zu validieren, wurden embryogene Pollenkulturen der Sorte Golden Promise verwendet, die eine vergleichsweise schlechte Fähigkeit zur Pollenembryogenese besitzen (Coronado et al. 2005). Hierzu wurden aufgrund der erwartungsgemäß geringeren Effizienz abweichend zu den vorherigen Untersuchungen 2.500 Pollen mL<sup>-1</sup> ohne heterologen *Feeder*, mit ganzen oder längs geteilten Weizen-Pistillen kultiviert. Abbildung 47 zeigt, dass sich dabei ohne Ammenkultur keine Mikrocalli entwickelten. Der Vergleich beider Co-Kultivierungen mit ganzen oder geteilten Pistillen zeigte bereits in der qualitativen Analyse der Bildaufnahmen den deutlich positiven Effekt geteilter gegenüber ganzen Pistillen.



**Abbildung 47:** Aufnahmen von Pollenkulturen (2.500 Pollen mL<sup>-1</sup>) unter verschiedenen Co-Kultivierungsbedingungen innerhalb einer 3,5 cm Kultivierungsschale mit 2 mL Kulturmedium. (Balken ≙ 3,5 mm)

Zusätzlich zeigte die quantitative Auswertung mittels t-Test einen signifikanten Unterschied ( $p \leq 0,001$ ) zwischen beiden Co-Kulturen (Tabelle 9). Nach Auslegung auf Regenerationsmedium konnte jedoch nur eine geringe Anzahl an Regeneraten gezählt werden, die zudem zum größten Teil Albinos waren. Mit einer Co-Kultivierung von geteilten Pistillen regenerierten allerdings mehr grüne Pflanzen. Die geringe Anzahl ist auf die geringe Populationsdichte zurückzuführen. Eine Extrapolation der erhaltenen Werte auf höhere Dichten, die standardmäßig verwendet werden, führt zu Regenerationsraten von 6,6 grünen

Regeneraten (GR) bei ganzen Pistillen und 5 mal höhere Ausbeuten (33 GR) bei geteilten Pistillen je 100.000 Pollen.

**Tabelle 9: Quantitative Auswertung der Kallusbildung in Pollenkulturen von `Golden Promis`.**

**Drei biologische Replikate sind, jeweils unterteilt in die entsprechend definierten Strukturen und zusätzlich die Quantität der Regenerate als Einzelwerte aufgelistet. Daten sind Mittelwerte±Standardabweichung, Statistische Analyse wurde mittels t-Test durchgeführt.**

Strukturen	Keine Pistille	Ganze Pistille	Geteilte Pistille	p-Wert
Mikrokallus >100 µm	—	37±24	229±12	2,8 x10 <sup>-4</sup>
Makrokallus > 500µm	—	19±23	146±10	9,6x10 <sup>-4</sup>
Makrokallus >1.000µm	—	12±14	89±5	9,3x10 <sup>-4</sup>
Regenerate	—	6/-/4	10/11/11	1,5 x10 <sup>-2</sup>
“Grüne” Regenerate	—	-/-/1	1/1/3	1,4 x10 <sup>-1</sup>

## 4 Diskussion

### 4.1 Änderungen des intrazellulären Stoffwechsels während der Induktion der Pollenembryogenese-Kompetenz und frühen Pollenembryogenese

Im Folgenden soll zunächst noch einmal ein kleiner Überblick über die gewonnenen Ergebnisse gegeben werden. Es wurde gezeigt, dass während der Induktion der Pollenembryogenese-Kompetenz

- es zu einigen leichten aber nicht signifikanten Änderung in der Glykolyse oder im TCA-Zyklus kam
- die meisten Aminosäuren außer GABA niedriger abundant vorkamen
- einige Primärmetabolite als Biomarker verwendet werden können
- Maltose als Abbauprodukt von Stärke in erhöhter Konzentration vorlag
- die erhöhte Abundanz der ADH auf hypoxische Bedingungen hindeutet
- redoxaktive Proteine und auch Histone vergleichsweise stärker akkumulierten
- einige Signalproteine unterschiedliche Abundanzen aufwiesen.
- Während der frühen Pollenembryogenese kam es zu einer erhöhten Abundanz von Glucuronsäure, wohingegen Hexosephosphate im Vergleich zur gametophytischen Entwicklung in geringeren Konzentrationen vorkamen
- war die Abundanz je eines detektierten Transkriptionsfaktors positiv mit der Pollenembryogenese bzw. der gametophytischen Entwicklung assoziiert
- kam es zu Zellteilungen einhergehend mit einer spezifischen Umstrukturierung der Zellarchitektur

Auf Transkript-Ebene existieren bereits Studien über die Induktion der Pollenembryogenese-Kompetenz sowie die frühe Pollenembryogenese (Eady et al., 1995; Vrinten et al., 1999; Maraschin et al., 2005; Maraschin et al., 2006; Tsuwamoto et al., 2007; Jacquard et al., 2009). Aus diesen Daten konnten sowohl regulatorische Zusammenhänge zwischen einzelnen Stoffwechselwegen als auch spezifische Transkripte, wie die des mit der Embryogenese assoziierten Transkriptionsfaktors *BabyBoom* (Boutilier et al., 2002), identifiziert werden. Im Gegensatz dazu wurden nur wenige Analysen auf globaler Protein- oder Metabolitebene durchgeführt. Es sind vor allem Daten zu einzelnen spezifischen Proteinen zu finden, deren Transkripte während der Induktion spezifisch reguliert waren. Nicht immer kann eine

---

---

Korrelation zwischen Transkriptexpression und dem entsprechenden Protein festgestellt werden. Aus diesem Grund sollte ein Vergleich der Proteinabundanz in nicht induzierten und Pollenembryogenese-kompetenten Pollen mithilfe eines Proteomansatzes durchgeführt werden, um zunächst einen Überblick über die Proteinmuster und Änderungen in Gerste zu erhalten. Die für die Proteinanalytik verwendeten Stadien wurden auch einem *Metabolite Profiling* unterzogen, wodurch die Ergebnisse besser interpretierbar sind.

#### 4.1.1 Metabolite

Die ungerichtete multivariate Hauptkomponentenanalyse zeigte eine klare Gruppierung der nicht Kältestress-induzierten und Embryogenese-kompetenten Zellen. Die Identifizierung der Marker und nicht regulierten Metaboliten erfolgte anhand von Referenzspektren. Aus diesem Grund war es auch nicht möglich einige Zucker, die ähnliche Fragmentmuster aufweisen, exakt zuzuordnen. Hierfür wären weitere gerichtete Analysen notwendig die auch eine absolute Quantifizierung der Zucker ermöglichen. In der globalen Analyse der Metabolite mittels GC-MS, ist nur eine relative Quantifizierung möglich. Die Disaccharide, Saccharose und Maltose waren nach Kältestressbehandlung in höherer Abundanz detektiert worden.

Embryogene Mikrosporen zeichnen sich durch das Fehlen oder eine reduzierte Anzahl an Stärkekörnern aus, da eine Akkumulation von Stärke mit dem Verlust der Embryogenesekompetenz einhergeht (Binarova et al., 1997). Die erhöhte Konzentration an Maltose, ein  $\alpha(1-4)$ -glykosidisch verknüpfter Zucker und Abbauprodukt der Stärke, könnte somit erklärt werden, dass in embryogenen Pollen noch vorhandene Stärke degeneriert bzw. eine Akkumulation verhindert wird.

Dieses Ergebnis bestätigt Untersuchungen von embryogenen Pollenkulturen von Tabak, in denen nach Stressinduktion ein erhöhte Konzentration an Isomaltose detektiert wurde (Hosp et al., 2007). Im Gegensatz zu Maltose ist diese Form  $\alpha(1-4)$ -glykosidisch verknüpft, jedoch auch ein Abbauprodukt von Stärke. Saccharose könnte auch über mehrere Schritte durch den Abbau von Stärke produziert werden (Smith et al., 2005). Durch einige intermediäre Schritte könnte Saccharose als nichtreduzierender Transportzucker unter anderem auch in den Apoplasten transportiert werden, was die Akkumulation von Saccharose im Kulturmedium im weiteren Verlauf erklären würde. Dieses Ergebnis steht jedoch im Gegensatz zu Ergebnissen von Hosp et al. (2007), die keine Saccharose in gestressten Mikrosporen detektieren konnten. Hierbei handelte es sich jedoch um Tabakpollen die einer Hungerbehandlung in Mannitollösung ausgesetzt wurde, womit nur eine eingeschränkte Vergleichbarkeit gegeben ist.

---

Weitere Metabolite, die eine erhöhte Konzentration in gestressten Mikrosporen aufwiesen waren Galactinol und GABA. Galactinol ist als kältestressreguliertes Stoffwechselprodukt bekannt (Taji et al., 2002). Somit ist davon auszugehen, dass dieser Metabolit unspezifisch durch die Kältestressbehandlung akkumuliert. Auch GABA gehört neben seiner Signalfunktion zu Metaboliten, welche während Stress akkumulieren. Auch wenn Kältestress nicht zu den primären Induktoren für GABA zählt, so könnte die Akkumulation *downstream* einer  $\text{Ca}^{2+}$  abhängigen Kaskade stehen, die von Kinnersley & Turano (2000) genannt wird. Dabei akkumuliert zelluläres Kalzium durch Kälte induziert, aktiviert eine Calmodulin-abhängige Glutamatdecarboxylase und GABA akkumuliert als Endprodukt in den Zellen. In wieweit GABA hier auch als Signalmolekül in anderen Stoffwechselwegen und der Pollenembryogenese Kompetenz eine Rolle spielt, kann nicht vorhergesagt werden. Da Glutamin allerdings auch eine Rolle in diesem Stoffwechsel spielt und Glutamat durch Glutamin (Glutamatsynthase) entstehen kann, ließe sich dadurch auch die geringere Abundanz von Glutamin erklären. Überraschend war die geringere Abundanz von Trehalose, bekannt als Osmoprotektant und kältestressinduzierter Metabolit (Kaplan et al., 2004; Fernandez et al., 2010). Für die Stressantwort während der Kälteinduktion spielt Trehalose somit offenbar keine Rolle.

Die geringe Abundanz von Isocitrat korreliert mit den Expressionsdaten der Proteinanalyse, wo in induzierten Mikrosporen eine deutlich geringere Abundanz einer putativen Aconitathydratase (35\_15073) in allen drei Replikaten detektiert werden konnte. Das Enzym katalysiert die Reaktion von Citrat über das gebundene Intermediat cis-Aconitat zu Isocitrat. Das Ergebnis könnte auch im Zusammenhang mit der Restrukturierung der Zellen stehen, da während der Stressinduktion auch eine Abnahme an Zellorganellen, wie Mitochondrien, zu beobachten ist und dieses Enzym vor allem mitochondrial im TCA-Zyklus lokalisiert ist.

Für eine weitere Interpretation der Daten sind jedoch beispielsweise KO-Experimente notwendig um den Einfluss bestimmter Stoffwechselwege zu validieren. Auch für Prolin wurde keine intrazelluläre Veränderung detektiert, obwohl allgemein bekannt ist, dass die Prolinkonzentration durch Stressinduktion steigt. Eine signifikante Akkumulation von Stressmetaboliten war analog zu Hosp et al. (2007) während der Kälteinduktion nicht zu erkennen war. Die Hypothese der Autoren, dass die Mikrosporen durch die Behandlung nicht signifikant geschädigt werden, steht hier jedoch im Widerspruch zu einer signifikanten Anzahl an absterbenden Zellen. Wahrscheinlicher ist, dass einige Stressantworten in diesem

---



(Johnson et al., 2003), durchgeführt werden. Bis heute war es jedoch auch in anderen Studien nicht möglich einen distinkten Metabolit-Marker für die Induktion der Pollenembryogenese zu identifizieren (Hosp et al. und Referenzen), wenn man die Stärkeakkumulation einmal vernachlässigt. Stärke ist als metabolischer Marker nicht Organismus-übergreifend geeignet, da Stärkeakkumulation beispielsweise in Pollenkulturen von *Antirrhinum* durchaus möglich ist ohne die Fähigkeit der Pollenembryogenese zu verlieren (Barinova et al., 2002; Barinova et al., 2004).

#### 4.1.2 Proteine mit unterschiedlicher Abundanz und möglicher Relevanz während der Pollenembryogenese

Innerhalb der Proteinanalyse wurden zahlreiche spezifisch abundante Proteine detektiert. In 3.1.1.3 wurden entsprechende Stoffwechselwege und die identifizierten Proteine graphisch dargestellt. Die meisten Proteine zeigten keine signifikante Änderung in ihrer Abundanz. Die Konzentration einiger Proteine zeigte jedoch unterschiedliche Tendenzen, welche allerdings nicht statistisch signifikant waren. Dies lag auch an der Inhomogenität der einzelnen biologischen Replikate. Man kann jedoch davon ausgehen, dass sich die Aktivität der Proteine nicht dramatisch ändert, da auch die entsprechenden Metabolite keine außergewöhnliche Änderung zeigten.

Auffallend war jedoch die erhöhte Abundanz einer Hexokinase nach Kältestress-Behandlung, da eine Assoziation mit der Stärkedegradierung bestehen könnte. Auch wenn der Abbau von Stärke noch nicht komplett verstanden ist, wird davon ausgegangen, dass Maltose das Hauptprodukt des Stärkeabbaus ist (Niittyta et al., 2004). Maltose, bestehend aus zwei Glukoseeinheiten wird wiederum durch eine Glykosyltransferase in zwei Moleküle gespalten und dann in Saccharose umgewandelt, wofür unter anderem phosphorylierte Glukose notwendig ist (Chia et al., 2004). Während der Induktion der Embryogenese-Kompetenz und der beginnenden Pollenembryogenese von Gerste kommt es nicht beziehungsweise nur geringfügigen Stärkeakkumulation. Dies würde zum einen die erhöhte Saccharose Konzentration in induzierten Mikrosporen erklären und zusätzlich die hohe Abundanz der Hexokinase. Ein Schema ist in Abbildung 49 dargestellt.

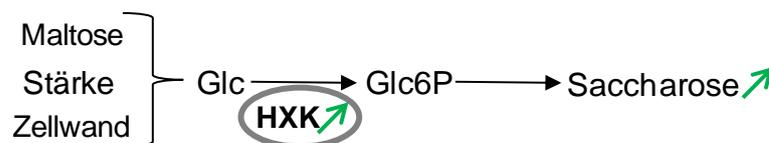


Abbildung 49: Mögliche Integration der Hexokinase und deren erhöhte Abundanz im Zusammenhang mit dem Stärkeabbau und der Produktion von Saccharose.

---

In der Proteinanalyse wurden auch putative ADH-Sequenzen identifiziert. Die höhere Abundanz einer Alkoholdehydrogenase in Pollenembryogenese induzierten Pollen wurde bereits in Transkriptanalysen auf mRNA Ebene gezeigt (Maraschin et al., 2006). Hierbei ist jedoch zu beachten, dass es sich um eine Stressbehandlung durch Hunger (Mannitol) handelte. In der Arbeit von Maraschin et al. (2006) wurde das Enzym dem Lipidmetabolismus zugeordnet. Wahrscheinlicher ist es jedoch, dass es innerhalb der Stressinduktion zu einer partiell anaeroben Situation in den Zellen kommt, und dadurch eine erhöhte Expression der ADH induziert wird (Kennedy et al., 1992). In Arabidopsis wurde gezeigt, dass Kältestress die Expression der ADH erhöht (Christie et al., 1991) und in den vorliegenden Analysen die Embryogenese-Kompetenz auch durch Kältestress induziert wird.

Außerdem zeigten die ultrastrukturellen Analysen eine Reduktion der Mitochondrien und somit eine verringerte Aktivität des TCA-Zyklus. Diese beiden Fakten, bedeuten für die induzierten Mikrosporen eine reduzierte Fähigkeit des oxidativen Abbaus zur Energiegewinnung. Das somit akkumulierte Pyruvat könnte daher über Acetaldehyd zu Ethanol verstoffwechselt werden und würde die hohe ADH-Konzentration in induzierten Pollen erklären. Unter diesen anaeroben Bedingungen kommt es auch zu einem Überschuss an reduzierten NAD-Derivaten (Kennedy et al., 1992). Diese können unter anaeroben Bedingungen nicht in der Atmungskette reoxidiert werden. Eine Möglichkeit der Reoxidation ist die Übertragung der Elektronen auf Oxalacetat wobei Malat entsteht (Kennedy et al. 1992 und Referenzen). Dies erklärt auch die erhöhte Malatkonzentration und Expression der Malatdehydrogenase in den kältestressbehandelten Mikrosporen. Auch wenn eine erhöhte ADH-Expression unter diesen Umständen plausibel erscheint, ist zu bezweifeln, dass es sich dabei um einen essentiellen Faktor für die Induktion der Pollenembryogenese handelt. Interessant erscheinen jedoch die Ergebnisse von Imamura und Harada (1981), die eine erhöhte Embryogenesefähigkeit unter anaeroben Bedingungen in Tabakantheren gefunden haben.

Weitere Enzyme spielen vor allem eine Rolle in Redoxmechanismen, wie der Reduktion von ROS. Darunter zählen Proteine die an der Reduktion bzw. Regulation von oxidativem Stress beteiligt sind. So wurde auch eine erhöhte Abundanz einer Ascorbat-Oxidase (35\_21226), von Disulfidisomerasen (35\_14571& 35\_15052) und einer Thioredoxin-Peroxidase (35\_837), detektiert. Alle Enzyme spielen eine Rolle in dem komplexen Netzwerk zur Reduktion von radikalen Sauerstoffderivaten. Unter anderem konnte in Protoplasten gezeigt werden, dass reduzierte antioxidative Mechanismen die Totipotenz und Embryogenesekompetenz

---

unterdrücken (Papadakis et al., 2001). Während der Pollenembryogenese ist jedoch nicht geklärt, ob diese Proteinfamilien, die in zahlreichen Transkriptstudien bereits gefunden wurden, essentiell für die Induktion der Pollenembryogenese sind. Hierzu wären gerichtete Ansätze mit Mutanten notwendig um die Embryogeneserate zu untersuchen. Allerdings kann auch dabei nicht ausgeschlossen werden, dass eine Komplementation der entsprechenden Enzyme durch deren Isoformen erfolgt.

Weitere Proteine mit erhöhter Abundanz in induzierten Pollen, spielen bei der Signaltransduktion eine wichtige Rolle. In der vorliegenden Arbeit wurde beispielsweise ein Rac-Dissoziationsinhibitor höher abundant in induzierten Mikrosporen identifiziert. Rac-GTPasen spielen eine Rolle bei der Zellteilung und Cytoskelett-Veränderungen (Vernoud et al., 2003). Es wird auch beschrieben, dass Rho-GTPasen eine Rolle in der Ausbildung der Zellpolarität spielen können. Das Inhibitor Protein könnte somit die GTPase Funktion inhibieren und somit eine Zellpolarität verhindern. Doch die eigentlichen Funktionen sind auch hier lediglich spekulativer Art.

Da sich innerhalb der Embryogenese-Induktion zahlreiche strukturelle Veränderungen vollziehen, überrascht es nicht diese Proteine unterschiedlich reguliert vorzufinden. Die Reprogrammierung auf zellulärer Ebene, bei der auch andere Genabschnitte aktiviert werden müssen, erklärt außerdem die höhere Abundanz der Histone in induzierten Mikrosporen, da das gelockerte Euchromatin, die sonst gebundenen Histone freigibt. Diese Lockerung des Chromatins wird auch von Pecinka et al. (2010) bei Stress beschrieben, welcher die in diesem Fall die Embryogenese-Induktion hervorruft.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es zahlreiche Veränderungen bezüglich der Proteinzusammensetzung innerhalb der Zellen gibt. Diese funktionell zu charakterisieren ist erforderlich um herauszufinden, ob es sich um direkte Verknüpfungen mit der Induktion der Pollenembryogenese handelt, oder diese Effekte nur Nebeneffekte der Stressbehandlung ohne weitere Konsequenz für die Pollenembryogenese-Kompetenz sind.

#### **4.1.3 Transkriptions und Translationsfaktoren während der Pollenembryogenese**

Transkriptionsfaktoren spielen eine essentielle Rolle bei der Expression spezifischer Gene, hier im Speziellen bei der Pollenreifung und Pollenembryogenese (Twell, 1994; Honys and Twell, 2004) und sind daher auch von besonderem Interesse. Aus diesem Grund wurden aus den gesamten Rohdaten alle als Transkriptionsfaktoren annotierten Sequenzen manuell extrahiert und die entsprechende Expression nach Induktion sowie auch im gesamten Verlauf im Vergleich zur gametophytischen Entwicklung gerichtet angeschaut. Es wurden dabei 11

putative Transkriptionsfaktoren detektiert, wobei TF 35\_19844 nicht weiter quantifiziert wurde, da in der Analyse kein für dieses Protein spezifisches Peptid gefunden wurde. Die meisten Transkriptionsfaktoren zeigten keine signifikante Regulierung innerhalb der embryogenen Entwicklung und auch im Vergleich zur Gametogenese wurde in diesen Fällen keine spezifische Änderung in der Abundanz beobachtet. Auf drei interessante Kandidaten soll im Weiteren näher eingegangen werden, da unterschiedliche Tendenzen in der Expression dieser zur erkennen waren.

Am auffälligsten war die Änderung der Abundanz des Proteins Hv35\_15306 in embryogenen Pollen im Verhältnis zu frisch isolierten Mikrosporen. Diese Sequenz besitzt Homologie zu einem BTF3-like Transkriptionsfaktor (Basischer Transkriptionsfaktor 3) aus *Musa acuminata*. Eine ähnliche Sequenz, konnte auch in *Nicotiana plumbaginifolia* Suspensionskulturen während der frühen somatischen Embryogenese mit einer erhöhten Expression gegenüber nicht-embryogenen Zellen detektiert werden (Kaydamov, 1999). Eine genaue Funktion, des Transkriptionsfaktors wurde in dieser Arbeit jedoch nicht postuliert. Ursprünglich wurde BTF3 in HeLa-Zellen als genereller Transkriptionsfaktor identifiziert, der für die RNA-Polymerase II-abhängige Transkription benötigt wird und aufgrund alternativen Spleißens in zwei Isoformen auftritt (Zheng et al., 1987; Zheng et al., 1990). In späteren Studien wurde dieser TF als  $\beta$ -Untereinheit des *Nascent-Polypeptid-Komplex* (NAC) beschrieben (Yang et al., 2007). In *Drosophila* ist die Mutation des BTF3-Gens lethal. Phänotypisch zeichnet sich dies durch eine spiegelbildliche Verdopplung an der anteroposterioren Achse des Embryos aus (Markesich et al., 2000). Die Mutation homologer Sequenzen (EGD1 & BTT1) in Hefen scheinen keine so drastischen Auswirkungen auf die Entwicklung der Zellen zu haben (Parthun et al., 1992; Hu and Ronne, 1994). Es wurde gezeigt, dass in Doppel KO-Mutanten von EGD1 und BTT1 eine erhöhte Expression Galaktose-regulierter Gene stattfindet (Parthun et al., 1992). Generell scheinen diese Proteine wichtig für eine korrekte subzelluläre Lokalisierung anderer Proteine zu sein. *In vitro* Studien von Fünfschilling et al. (1999) zeigten, dass NAC den mitochondrialen Import von Proteinen stimuliert. In Pflanzen existieren nur wenige Studien zu BTF3 Faktoren. Yang et al. (2007) detektierten eine geringere Abundanz verschiedener plastidärer und mitochondrialer gencodierender Transkripte in RNAi *Nicotiana tabacum* Pflanzen und postulierten einen Einfluss in die physiologische Entwicklung der Chloroplasten und Mitochondrien. Ein weiterer interessanter Befund hinsichtlich einer Relevanz während der Embryogenese, wurde von Bloss et al. (2003) untersucht. Ein BTF3 Protein wurde in *C. elegans* als ICD-1 (*Inhibitor of Cell Death-1*) identifiziert, das eine essentielle Rolle in der Suppression von

---

Apoptose spielt. Bereits 1999 wurde gezeigt, dass BTF3 in humanen Jurkat T-Zellen 6 h nach Apoptose-Induktion nicht mehr vorhanden war und somit offenbar eine Rolle in der Apoptose spielt (Brockstedt et al., 1999). Diese Ergebnisse können nicht ohne Weiteres auf Mikrosporen übertragen werden, aber geben eventuell Hinweise auf die Funktion dieses Transkriptionsfaktors in der Pollenembryogenese. Doch die genaue Funktion und Wirkungsweise bei der Herausbildung embryogener Kompetenz und der frühen Embryogenese bleibt aufgrund der Daten, die sich nur auf globale Ansätze stützen, spekulativ. Es handelt sich hierbei jedoch auf keinen Fall um einen vorrangig in embryogenen Mikrosporen enthaltenen Transkriptionsfaktor. Kaydamov (1999) und auch Yang et al. (2007) zeigten bereits eine Expression des gleichen Gens in Blättern von Tabak, allerdings mit einer niedrigeren Abundanz.

Im Gegensatz zu dem in der Pollenembryogenese höher abundanten BTF3-like Protein wurde ein Transkriptionsfaktor detektiert, der eine gegensätzliche Expression aufwies. 35\_19584 zeigte eine deutlich niedrigere Abundanz in allen embryogenen Stadien und nach Induktion gegenüber der normalen Pollenentwicklung. Die Proteinsequenz annotiert als *Putative signal transducer and activator of transcription interacting protein* besitzt unter anderem eine WD40 Repeat Domäne (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/113624094?report=graph>). Da es sich hierbei nur um ein putatives Protein handelt, konnte keine direkte Funktion zugeordnet werden. Bekannt ist jedoch, dass die STAT-Signaltransduktionswege zwar in Tieren bekannt sind, jedoch nicht in Pilzen oder Pflanzen (Aaronson and Horvath, 2002), was zu einem theoretischen Widerspruch mit der aufgeführten Annotation führt. Richards et al. (2000) vermuten jedoch Ähnlichkeiten und funktionelle Überlappungen zwischen GRAS-Proteinen der Pflanzen und STAT-Proteinen. GRAS-Proteine, einzigartig in Pflanzen, besitzen diverse Funktionen. Zur Übersicht wird auf den Übersichtartikel von Bolle C. (2004) und entsprechende Referenzen hingewiesen. So sind Proteine dieser Familie für die initiale asymmetrische Zellteilung zur Generierung von Endodermis und Cortex in Wurzelmeristem notwendig. Dies wiederum könnte erklären, warum das damit interagierende in dieser Arbeit detektierte Protein in embryogenen Kulturen weniger abundant vorkommt, denn in diesen Kulturen spielt die symmetrische Zellteilung als Initiation der Zellproliferation eine wichtige Rolle. Weitere Funktionen werden im Zusammenhang mit der Gibberellin-Signalkaskade und der Lichtsignaltransduktion (Bolle, 2004). Diese hypothetischen Vermutungen können jedoch lediglich für weitere gerichtete Untersuchungen Anhaltspunkte liefern. Inwieweit dieses interagierende Protein eine Rolle spielt kann hier nicht bestimmt werden. Dies unterstützt

---

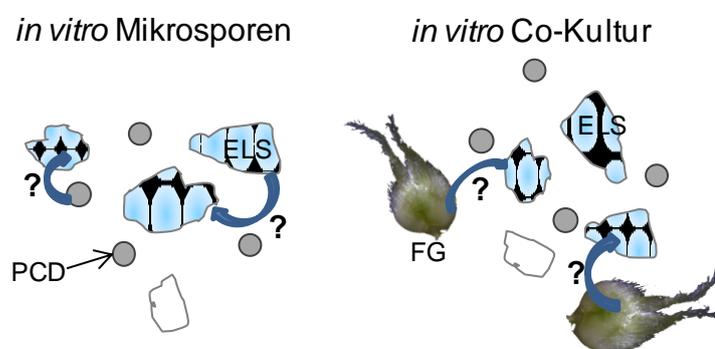
jedoch die prinzipielle Vorstellung, dass bestimmte Transkriptionsfaktoren und regulatorische Proteine während der Pollenembryogenese reprimiert sein müssen.

Der MADS-Box Transkriptionsfaktor 35\_1523 zeigte zwar keine signifikant unterschiedliche Expression, aber eine tendenziell höhere Abundanz im reifenden Pollen gegenüber embryogenen Kulturen. Diese höhere Abundanz in reifenden Pollen von MADS-Box Genen ist bereits bekannt. In Arabidopsis (Verelst et al., 2007) oder Mais (Schreiber et al., 2004) zeigten Untersuchungen die Expression von MADS-BOX Transkriptionsfaktoren in reifen Pollen. Allerdings ist die Gruppe dieser Faktoren sehr groß. In Arabidopsis sind mehr als 100 MADS-Box-Faktoren mit unterschiedlichen Funktionen bekannt (Parenicova et al., 2003), so dass eine Aussage über den annotierten Transkriptionsfaktor nicht getroffen werden kann.

Um diese drei aus der Proteinanalyse hervorgegangenen Kandidaten zu evaluieren sind weitere gezielte molekularbiologische Ansätze notwendig. Weiterhin problematisch ist, dass es sich nur um Homologie Annotierungen einer EST-Datenbank handelt. Letztendlich scheint der BTF3-like-Transkriptionsfaktor ein vielversprechender Kandidat für weitere Untersuchungen zu sein.

## 4.2 Co-Kulturen und deren Einfluss auf die Pollenembryogenese

Bereits 1985 wurde von Köhler & Wenzel nachgewiesen, dass eine Kokultivierung von Ovarien einen stimulierenden Effekt während der Pollenembryogenese bei Gerste aufwies. In folgenden Untersuchungen wurde dies auch für weitere Kulturpflanzen, wie Weizen (Mejza et al., 1993), Mais oder Tabak als Vertreter der Dikotyledonen (Kumlehn, persönlicher Kommentar) bestätigt. Eine mögliche Funktion der Co-Kulturen als stimulierendes Gewebe bzw. als Ersatz für den *Feeder*-Effekt innerhalb einer Kultur, welche einen *Eigen-Feeder*-Effekt besitzt, ist in Abbildung 50 dargestellt.



**Abbildung 50:** Schematische Darstellung des möglichen Mechanismus des *Feeder*-Effektes der Co-Kulturen *in vitro*. Ähnlich der Kommunikation zwischen Zellen *in Planta* oder bei hohen Zelldichten in Mikrosprorenkulturen oder Suspensionskulturen, übernehmen die Pistille die Aufgabe des Ausscheidens relevanter Signalmoleküle. ELS-Embryo like Struktur, PCD-Programmierter Zelltod, FG-Feeder-Gewebe

Für die weitere Diskussion werden die Ergebnisse als Pollenembryogenese-spezifisch dargestellt. Es ist jedoch zu beachten, dass diese Effekte eher allgemein auf zellteilungsaktive Kulturen zu beziehen sind. Da in dieser Arbeit die Pollenembryogenese untersucht wurde, sind die Resultate aber als Pollenembryogenese-spezifisch definiert.

#### 4.2.1 Biotest zur präzisen Bestimmung der *Feeder*-Qualität der Kokultivierung

Die wichtigsten Ergebnisse dieser Untersuchung waren:

- Alle Pistillgewebe scheinen einen *Feeder*-Effekt zu besitzen.
- Während dieser Untersuchung konnte ein signifikant verbesserter Effekt mit geschnittenen Pistillen beobachtet werden.

In der Literatur wurde bei Untersuchungen des Effekts der Co-Kultivierung häufig die Fähigkeit der Embryogenese ohne Co-Kultur vernachlässigt (Hu and Kasha, 1997; Li and Devaux, 2001; Lu et al., 2008). Da hierbei innerhalb biologischer Replikate und individueller Isolationen eine hohe Abweichung der Entwicklungsraten festzustellen sind, können diese Effekte eine Aussage über die *Feeder*-Qualität von Co-Kulturen verwässern. Es ist somit schwierig eine Aussage darüber zu treffen, woher eine Erhöhung der Ausbeute an Embryonen bei einzelnen individuellen Experimenten stammt. Aus diesem Grund wurde zunächst erfolgreich ein Biotest etabliert, der für die Co-Kultivierungsexperimente mit Zellmaterial sowie mit Fraktionen konditionierten Mediums diese Effekte ausschließt. Bereits in früheren Studien wurde gezeigt, dass eine bestimmte Zelldichte nötig ist, um eine embryogene Entwicklung zu induzieren (Huang et al., 1990; Hoekstra et al., 1993).

Wie die Negativkontrolle in den Versuchen zeigte, regenerierten keine Kallusstrukturen in Kulturen mit 75 Pollen mL<sup>-1</sup> ohne co-kultivierte Pistille. Für einen minimalen Eigen-*Feedereffekt* (Entstehung weniger Mikrokalli bei denen die Exinhülle aufbricht) wäre unter diesen experimentellen Bedingungen eine Populationsdichte von mindestens 1600 Pollen mL<sup>-1</sup> erforderlich (Abbildung 36). Regenerierbare Kulturen benötigten jedoch mindestens 10.000 Pollen mL<sup>-1</sup>. Dies zeigt, dass das verwendete System für die weiteren Untersuchungen verwendet werden kann, um den alleinigen Einfluss der Co-Kulturen und einzelnen Fraktionen heterolog konditionierten Mediums zu bestimmen.

#### 4.2.2 Co-Kultivierung verschiedener Teile von Weizen-Pistillen

Eine Co-Kultivierung von Pistillgewebe mit unreifen Pollen aus Gerste führte prinzipiell zu einer verbesserten Ausbeute an embryogenen Strukturen. Diese Ergebnisse bestätigen frühere Studien in Gerste (Li and Devaux, 2001; Lu et al., 2008). Doch auch in anderen Spezies

einschließlich wichtiger Kulturpflanzen, wie *Triticum aestivum* (Mejza et al., 1993), *Triticum turgidum* (Cistue et al., 2006), *Triticale* (Eudes and Amundsen, 2005), *Brassica napus* (Huang et al., 1990) oder auch *Capsicum annum* (Lantos et al., 2009), um nur einige zu nennen, ist dieser stimulierende Effekt der Co-Kultivierung bereits beschrieben. Jedoch wurde in der hier vorliegenden Untersuchung der häufig vernachlässigte Eigen-Feeder-Effekt, durch die Verwendung einer geringen Populationsdichte der Pollenkultur, erstmalig ausgeschlossen. Letztere war 20mal geringer als für einen detektierbaren Eigen-Feeder-Effekt notwendig. Somit repräsentieren die sich entwickelnden Embryonen und Kallusstrukturen ausschließlich den Feeder-Effekt des Pistill-Gewebes. Außerdem wurden in allen vorherigen Studien lediglich ganze Pistille für eine Co-Kultivierung verwendet, ohne das tatsächlich wirksame Gewebe dafür zu identifizieren.

Vergleicht man die Embryogeneserate in der Kontrollkultur (50.000 Pollen als Co-Kultur), so ist diese gegenüber Kultivierungen ohne *Millicell*<sup>®</sup> mit *Hordeum vulgare* cv. IGRI deutlich kleiner als die heterologe Co-Kultur von Pistillen (>100µm = 16%, >500µm = 3%). Es wird angenommen, dass die Diffusion der Signalmoleküle durch die Millicell-Membran eingeschränkt ist und es dadurch zu dieser etwas schlechteren Rate kommt. Protoplasten die innerhalb von zwei solcher Einsätze kultiviert wurden, konnten z.B. nicht mehr von einem Feeder-Effekt profitieren (J. Kumlehn, persönliche Mitteilung). Die Werte der reinen Pollenkultur liegen verglichen mit den bekannten Literaturdaten allerdings immer noch im mittleren Bereich. So wurden in verschiedenen Studien für cv. IGRI zwischen 1 % (Devaux and Li, 2003), 3% (van Bergen et al., 1999) und 21 % (Castillo et al., 2000) multizelluläre Strukturen gezählt. Der prozentuale Anteil an embryogenen Mikrosporen innerhalb der Kultur wird durch den physiologischen Zustand des Donormaterials, die induktive Vorbehandlung und auch durch die Isolationsmethode stark beeinflusst. Das macht einen direkten Vergleich zwischen verschiedenen Arbeiten unterschiedlicher Labors sehr schwierig. Dass jedoch war in der vorliegenden Arbeit auch nicht notwendig, da ausschließlich der Vergleich von verschiedenem Feeder-Gewebe von Interesse war. Innerhalb der aufgeführten Experimente waren die Bedingungen stets konstant und die relative Vergleich ist entscheidender als die absolute Ausbeute.

Der interessanteste Aspekt dieser Untersuchung, ist die signifikant verbesserte Ausbeute an embryogenen Strukturen bei einer Co-Kultivierung mit geschnittenen Pistillen. Der biologische Hintergrund dieses Ergebnisses wurde jedoch nicht abschließend geklärt werden. Vermutlich ist es die Konsequenz einer besseren Freisetzung der verantwortlichen Moleküle,

---

welche die Stimulation der Embryogenese auslösen. Eine weitere Möglichkeit könnte aber auch die Induktion und verstärkte Produktion dieser Signalmoleküle nach Verwundung des Gewebes sein. Um diese verschiedenen Möglichkeiten zu validieren wären jedoch weitere biologische und biochemische Studien notwendig. Die Identifizierung der verantwortlichen Substanzen wäre hierbei ein wichtiger Schritt um den verantwortlichen Mechanismus einzugrenzen. Auch wenn bereits einige Studien dazu durchgeführt wurden, ist der biologische Hintergrund bis heute unklar. Einige potentielle Kandidaten früherer Studien, die einen positiven Effekt auf die Pollenembryogenese haben sollen, unterstützen jedoch die These, dass es sich dabei um eine erhöhte Akkumulation der *Feeder*-Moleküle durch den Verwundungsstress handelt. Beispiele dieser während der Embryogenese bereits identifizierten Moleküle sind unter anderem Arabinogalaktanproteine, (Matthys-Rochon et al., 2004; Letarte et al., 2006), extrazelluläre Chitinasen, welche während der somatischen Embryogenese gefunden wurden (De Jong et al., 1992) und weitere Pathogen-induzierte Proteine (PR) (Jacquard et al., 2009). Dass diese Proteine im vorliegenden Fall eine Rolle spielen, kann jedoch nicht bestätigt werden. Eine ausführlichere Diskussion und Eingrenzung der möglichen Kandidaten wird in Abschnitt 3.2 aufgeführt.

Da viele Moleküle gewebespezifisch präsent sind, war innerhalb dieser Untersuchung eine Co-Kultivierung einzelner Pistillenteile von zusätzlichem Interesse, um dadurch eventuell weitere Substanzen auszuschließen oder zu bestätigen. Arabinogalaktanproteine beispielsweise sind vorwiegend im Narbengewebe zu finden, was in einer verminderten *Feeder*-Qualität von kultivierten Fruchtknoten mit entfernter Narbe resultieren würde. Die Ergebnisse der Fruchtknoten zeigten jedoch keinen signifikanten Unterschied in der Bildung von Mikrokalli und eine schlechtere Ausbildung von Makrokallusstrukturen gegenüber der Co-Kultivierung mit Narbengewebe.

Nach 14d kam es allerdings zu einer besseren, also schnelleren Ausbildung multizellulärer Strukturen während einer Co-Kultivierung mit Stigmata. Der Grund hierfür ist nicht eindeutig. Möglich wäre jedoch ein höheres Konkurrenzverhalten, in Kulturen die mehr Multizelluläre Strukturen ausbilden. Kulturen mit weniger Strukturen haben weniger Nährstoffkonkurrenz und können sich somit schneller entwickeln.

Weiterhin wurde auch in den chalazalen Pistill-Hälften, die das Stigmata-Gewebe enthalten, eine bessere Embryo-Ausbeute gegenüber mykopylaren Hälften beobachtet. Hier lässt sich nur vermuten, dass der chalazale Teil einen etwas größeren Einfluss bezüglich der Stimulation besitzt. Es ist anzumerken, dass in diesem Teil *in Planta* die vom Leitgewebe kommenden

---

---

Nährstoffe für die Samenanlage bereitgestellt werden. Diese Funktion *in Planta* könnte auch hier in den Pollenkulturen einen Effekt besitzen, der eine bessere Ausbeute an Kalli hervorruft.

Vergleiche mit Literaturdaten sind hier nicht möglich, da Untersuchungen einzelner Teile der Pistille in der vorliegenden Studie erstmalig durchgeführt wurden. Gegenüber allen eventuell kleineren Nebeneffekten, ist jedoch der größte Faktor die entsprechende Oberfläche der „Verwundung“ des intakten Pistillengewebes. Dies spiegelt sich in den Ergebnissen der verschiedenen Pistill-Hälften wieder. Das beste Resultat wurde mit längs geschnittenen Pistillen erzielt, wobei es keine Rolle spielte ob die Samenanlage noch präsent war. Zur weiteren Verbesserung des Co-Kultursystems wurden verschiedene Mengen an längs geschnittenen Pistillen verwendet. In dem Bereich der getesteten Quantitäten wurde bei der Auswertung der Anzahl an Embryonen nur bei der Kultivierung von 0,5 IP mL<sup>-1</sup> eine geringere Ausbeute festgestellt. Alle anderen Mengen an Pistillen zeigten keinen signifikanten Unterschied untereinander, auch wenn eine gewisse positive Tendenz zu erkennen war. Es ist davon auszugehen, dass bei einer noch höheren Menge an Co-Kulturgewebe die entsprechende Ausbeute an multizellulären Strukturen auch wieder sinkt, da die Konkurrenz um Nährstoffe mit höherer Biomasse kultivierter Zellen zunimmt. Allerdings ist nicht auszuschließen, dass neben Effektoren auch inhibierende Substanzen durch die Co-Kultur sekretiert werden, die durch eine höhere Anzahl an Pistillen stärker im Medium akkumulieren. Innerhalb des experimentell verwendeten Bereichs wurde so ein Effekt allerdings nicht festgestellt.

Da es sich bei *H. vulgare* cv. ‚Igri‘ um ein Kultivar mit einer besonders hohen Fähigkeit zur Pollenembryogenese handelt (Castillo et al., 2000), sollte der Unterschied zwischen ganzen und geteilten Pistillen auch in einem für die Pollenembryogenese eher schwer zugänglichen Kultivar getestet werden. Hierfür wurde *H. vulgare* cv. ‚Golden Promise‘ verwendet, da dieser Genotyp eine wesentlich geringere Pollenembryogenese-Kompetenz aufweist (Coronado et al., 2005). Dabei wurde nicht nur auf die Ausbildung von embryogenen Strukturen berücksichtigt, sondern zusätzlich die Anzahl an Regeneraten bestimmt, da dies ein weiterer kritischer Schritt in der Anwendung der Pollenembryogenese ist. Castillo et al. (2000) konnten bereits während einer Analyse von 17 verschiedenen Genotypen von *H. vulgare* zeigen, dass die Anzahl der Embryonen nicht zwingend mit der Regenerationseffizienz korreliert. In diesen Versuchen wurde eine höhere Anzahl an Pollen je Kultur verwendet. Die größere Menge an Pollen war nötig um genügend Regenerate zu

---

erhalten, da es sich hierbei um ein wenig embryogenen Genotyp handelt. Um weitere Nebeneffekte durch die in den vorherigen Experimenten verwendeten Einsätze auszuschließen, fand außerdem die Kultivierung der Pollen direkt in der Kulturschale der Co-Kultur statt. Doch auch mit diesem Kultursystem wurde ein Eigenstimulationseffekt der Pollen ausgeschlossen, was in der Negativkontrolle zu sehen ist. Auf den ersten Blick erscheint die niedrige Anzahl an Gesamt-Regeneraten und letztendlich grünen Pflanzen verglichen mit Literaturdaten zu ‚Golden Promise‘ eher niedrig. Dies ist jedoch dem Fakt geschuldet, das es sich bei diesem System um eine 20 bis 40 fach niedrigere Pollendichte handelte als in Routineanwendungen verwendet wird. Bei Extrapolation der erhaltenen Werte erhält man Regenerationsraten von 6,6 GR bei ganzen Pistillen und 5mal höhere Ausbeuten (33 GR) bei geteilten Pistillen je 100.000 Pollen. Dabei ist der Eigen-Feeder-Effekt einer Pollenkultur mit höherer Populationsdichte noch nicht berücksichtigt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass keine distinkten Gewebe für den *Feeder*-Effekt verantwortlich gemacht werden können. Die Untersuchung führte jedoch zu einer neu entwickelten Methode der Co-Kultivierung, die die Pollenembryogenese in Gerstenkulturen und eine anschließende Regeneration signifikant verbessert. Dies zeigte sich bereits in weiteren Versuchen mit Weizen oder Roggen (bislang unpubliziert, IPK AG PRB).

### 4.3 Analyse des Sekretoms von embryogenen Pollen und Pistillen

- Innerhalb der Sekretomstudien wurden zahlreiche Metabolite und auch Polypeptide identifiziert.
- Die Fraktionierung des Mediums zeigte, dass die relevanten Substanzen nur in Fraktionen kleiner als 3 kDa zu finden waren.

Dass externe Signale, sogenannte *Feeder*-Moleküle eine stimulierende und fördernde Wirkung auf die Pollenembryogenese haben, ist bereits seit Jahrzehnten bekannt. Zu beachten ist, dass diese Wirkung wahrscheinlich einem allgemeinen Mechanismus unterliegt, der auf alle zellteilungsaktiven Kulturen angewandt werden kann.

Auch während der Kultivierung von somatischen Zellen wurden solche Faktoren von Warren & Fowler (1981) oder Sung & Okimoto (1981) in Suspensionskulturen und der somatischen Embryogenese von *Daucus carota* L. beschrieben. Doch schon seit Ende der 60er Jahre ist bekannt, dass konditioniertes Medium von Suspensionskulturen eine fördernde Wirkung auf andere Zellkulturen besitzt, die soweit verdünnt wurden, dass Zellteilung nicht mehr erfolgte (Stuart and Street, 1969). Köhler und Wenzel konnten bereits 1985 zeigen, dass eine Zugabe

---

von konditioniertem Medium einer Ovarienkultur auch einen positiven Effekt während der Pollenembryogenese in *Hordeum vulgare* Mikrosporenkulturen hat. Eine entsprechende Hypothese, weshalb die Co-Kultur diesen positiven Einfluss besitzt ist in Abbildung 50 als Modell dargestellt. Dabei wird postuliert, dass die Co-Kultur als Donor der Signalmoleküle fungiert und somit die Zellteilung unterstützt. Um welche Substanz beziehungsweise Substanzen und eventuelle interagierende Netzwerke es sich handelt, wurde bis heute nicht aufgeklärt. Es sind bereits zahlreiche Substanzen als mögliche Kandidaten beschrieben worden. Es ist jedoch nicht geklärt inwieweit die Ergebnisse verschiedener embryogener Entwicklungen auf die jeweils anderen übertragbar sind. Außerdem muss zwischen Mechanismen unterschieden werden, die essentiell sind, um eine Embryogenese bzw. Zellteilung hervorzurufen, und denen, die sekundär stimulierend einwirken. Der Fakt, dass eine Co-Kultivierung der Tabaksuspensionskultur die Pollenembryogenese stimuliert, läßt auf überlappende Mechanismen schließen. Es scheinen somit weniger Pollenembryogenese spezifische Mechanismen zu existieren sondern vielmehr auch hier allgemeine Zellteilungssignale involviert zu sein. Es sollte jedoch in zwei verschiedene Hauptmechanismen untergliedert werden. Zum einen können bestimmte Substanzen essentiell für die Induktion der Zellteilung sein. Zum anderen können weitere Substanzen einen nicht essentiellen, aber dennoch stimulierenden Effekt im späteren Verlauf der Embryogenese besitzen. Auch negative und inhibierende Effekte sind dabei möglich.

Insgesamt zeigten die Analysen des Mediums der Pollen- und Pistillkulturen sowie die Vorversuche mit der Tabaksuspensionszellkultur ein sehr komplexes Gemisch aus sekretierten Substanzen. Ein entsprechendes Molekül mit einer distinkten Funktion für den stimulierenden Effekt innerhalb einer Pollenkultur mit hoher Populationsdichte bzw. einer Co-Kultur mit Pistillen war daher bislang nicht möglich zu validieren.

#### **4.3.1 Methoden-Etablierung anhand einer Zellsuspensionskultur von *N. tabacum***

Innerhalb der Vorversuche wurden die üblichen sekretierten Proteine im Kulturmedium der Suspensionskultur, wie Peroxidasen, Chitinase, andere stressinduzierte Proteine und Glucosidasen identifiziert. Diese Proteingruppen sind bereits in zahlreichen Studien diskutiert worden (Kunze et al., 1998; Kwon et al., 2005; Oh et al., 2005). Es wurden jedoch zusätzlich zu der Etablierung der Aufarbeitungsprotokolle drei neue Isoformen für *Nicotiana tabacum* annotiert, deren Sequenz noch nicht in den Proteindatenbanken enthalten war. Da hierfür jedoch nur jeweils ein spezifisches Peptid zur Annotierung einer anderen Spezies führte, ist

---

für die Komplettierung der Proteinsequenz dieser Isoform noch eine tiefere Analyse erforderlich. Neben den Proteinanalysen wurde auch die Metabolitanalytik mittels der Suspensionskultur etabliert werden und auch hier wurden entsprechende Metabolite wie Polyamine, Aminosäuren und Benzyllderivate im Kulturmedium detektiert.

#### 4.3.2 Detektierte Metabolite im Sekretom und deren potenzieller *Feeder*-Effekt

**Putrescin** ist ein ubiquitär vorkommendes Polyamin (PA), involviert in Zellwachstum, -proliferation sowie -differenzierung (Kusano et al., 2008), aber auch als Mediator in der abiotischen oder biotischen Stressantwort (Bouchereau et al., 1999; Walters, 2003) und hypersensitiven Reaktion (Yoda et al., 2009). Der Einfluss auf diese zellulären Mechanismen wurde bis heute jedoch nicht vollständig aufgeklärt. Es ist bekannt, dass PA an negative geladene Moleküle wie Nukleinsäuren, azide Phospholipide und Proteine binden können (Marina et al., 2008). Polyamine sind unter anderem auch ein Donor für  $H_2O_2$  (Yoda et al., 2003; Yoda et al., 2009). Dass eine externe Zugabe von Polyaminen wie Putrescin, sowohl die somatische Embryogenese (Kelley et al., 2002; Rajesh et al., 2003; Bertoldi et al., 2004) als auch Pollenembryogenese stimulieren kann (Tiainen, 1992; Kumar et al., 2004; Hema and Murthy, 2008), ist bekannt. Wenige Analysen, existieren jedoch über aktiv sekretiertes Putrescin und dessen Effekt während der Kultivierung.

Die Vielzahl der möglichen Prozesse macht es schwierig, Putrescin einer spezifischen Funktion im Wachstum der Zellkultur oder Pollenembryogenese zuzuordnen. Eine wichtige Funktion könnte die Bereitstellung von  $H_2O_2$  sein, welches ein Substrat der Klasse-III-Peroxidasen ist. Diese besitzen eine wichtige Rolle in der Zellwandbiosynthese und der Quervernetzung der Moleküle innerhalb der Zellwand (Hiraga et al., 2001; Passardi et al., 2004). Während der Embryogenese kommt es zu einer erhöhten Zellteilungsrate und somit auch einer stärkeren Zellwandbiosynthese, was eine erhöhte Putrescinkonzentration erklären würde. Papadakis and Roubelakis-Angelakis (2005) stellten einen positiven Effekt von exogenem Putrescin auf die Vitalität einer Tabak-Protoplastenkultur fest und postulierten ein streng reguliertes Netzwerk zwischen Polyamin-induzierter ROS-Produktion sowie die Induktion antioxidativer Mechanismen und die Inhibierung von programmiertem Zelltod durch Putrescin.

---

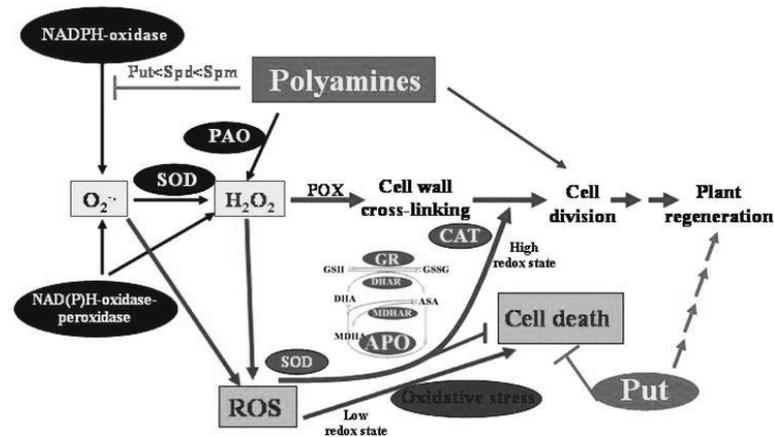


Abbildung 51: Mögliche Signalketten und Stoffwechselwege innerhalb der Embryokultivierung entnommen aus Papadakis and Roubelakis-Angelakis (2005).

Der genaue Mechanismus von Zelltod, Zellteilung und Zellwachstum moduliert durch Polyamine und entsprechende Signalkaskaden sind jedoch noch nicht vollständig geklärt (Papadakis and Roubelakis-Angelakis, 2005). Mögliche Kaskaden und interagierende Netzwerke die vorgeschlagen wurden und auch während der Kultivierung von embryogenen Pollen möglich sind, wurden in Abbildung 51 schematisch zusammengefasst.

Bereits in systemischen Ansätzen wurden zur Verbesserung der Regenerationskapazität innerhalb der Pollenembryogenese **Aminosäuren (Serine/Alanin/Prolin/Oxoprolin/GABA)** getestet und zeigten einen positiven Effekt (Sangwan and Sangwan-Norreel, 1996). Eine Zugabe von Serin bei *Brassica oleracea* (Dias and Martins, 1999), Glutamin bei *Triticum aestivum* (Indrianto et al., 1999) oder Glycin bei *Oryza sativa* (Guzman and Arias, 2000) oder Alanin bei *Hordeum vulgare* (Muyuan et al., 1990) induzierte eine höhere Ausbeute an Embryonen (Hema and Murthy, 2008). Bei Gerste wurde weiterhin durch einen Cocktail verschiedener Aminosäuren die Pollenembryogenese erhöht werden (Ouedraogo et al., 1998). Auch die Aminosäure Prolin zeigte in Antheren-Kulturen (*Oryza sativa*) eine positive Wirkung (Cho and Zapata, 1988). Auch bei Mais wurde ein solcher Effekt nachgewiesen (Büter et al., 1991). Dabei kann es sich jedoch auch nur um einen Effekt durch mehr Nährstoffe in Form von reduziertem Stickstoff und nicht zwingend um Signalmoleküle handeln.

Dieses Ergebnis steht jedoch im Kontrast zu Ergebnissen bei Gerste von Xu et al. (1981), bei denen ein negativer Effekt von exogenem Prolin und auch Glutamin festgestellt wurde. In allen Analysen wurde jedoch nur auf die Zugabe und den dadurch entstehenden additiven Effekt von exogenen Substanzen Bezug genommen und die natürlich akkumulierten Metabolite im Kulturmedium vernachlässigt.

---

Somit ist ein direkter Vergleich sehr schwierig, da wie bereits in 4.2.2 erwähnt das Ausgangsmaterial und auch die Spezies einen großen Einfluss auf die Pollenembryogenese hat. Es wurde jedoch gezeigt, dass die Akkumulation von Prolin im Nährmedium unterschiedlicher Mikrosporenisolationen stark variiert. Es ist bekannt, dass es zu starken Schwankungen in der Regenerationsfähigkeit unabhängiger Pollen-Isolationen kommen kann (interne Kommunikation). Um festzustellen, ob es eine Korrelation zwischen beiden Parametern gibt, sollte die Prolinkonzentration in Bezug zur Regenerationsfähigkeit der einzelnen Kulturen untersucht werden. Nach 7 Tagen Kultivierungszeit unterscheiden sich die Konzentrationen deutlich voneinander, glichen sich jedoch in der weiteren Kultivierung wieder an und zeigten nach 14 Tagen keinen Unterschied mehr. Es zeigte sich somit ein Einfluss exogener reduzierter Stickstoffquellen in Form von Aminosäuren und im Besonderen von Prolin auf die Entwicklung während der Pollenembryogenese, jedoch nur zu bestimmten Zeitpunkten während der Kultivierung. Es ist jedoch bekannt, dass die benötigte Menge an Stickstoff bzw. Aminosäuren innerhalb der Entwicklung variiert (Nuutila et al., 2000). Die Autoren begründeten dies mit der Veränderung des endogenen Aminosäuremetabolismus während der Embryogenese.

Es wurde in früheren Studien eine Bedeutung der Stickstoff-Homöostase und vor allem die Bedeutung reduzierten Stickstoffs in Form von exogenen Aminosäuren während der somatischen Embryogenese in Suspensionskulturen festgestellt (Reinert et al., 1967; Stuart and Strickland, 1984; Meijer and Brown, 1987). Auch während der Pollen Embryogenese und Kultivierung von Antheren konnte das Medium durch verschiedene Stickstoffvariationen optimiert werden (Olsen, 1987; Muyuan et al., 1990; Mordhorst and Lorz, 1993). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die identifizierten Aminosäuren in gewissem Maße durch externe Zugabe einen positiven Einfluss haben können, diese aber als Substanzen wohl eher auszuschließen sind, die für den Feeder-Effekt durch konditioniertes Medium oder Ovarien-Cokulturen verantwortlich sind.

Eine weitere, jedoch nicht proteinogene Aminosäure,  **$\gamma$ -Aminobuttersäure (GABA)** wurde in Kulturüberständen von Pollen und Pistill-Cokulturen detektiert. Während die Funktion von GABA in Säugern sehr gut beschrieben ist, so sind einige Funktionsmechanismen im Pflanzenreich immer noch weitgehend ungeklärt. Innerhalb der Vertebraten fungiert GABA beispielsweise als Inhibitor von Neurotransmittern, als parakrines Signal und als Wachstumsfaktor (Pinal and Tobin, 1998). Im Pflanzenreich wurde dieser Aminosäure eine besondere Rolle in der Stressantwort zugesprochen (Bouche and Fromm, 2004), besitzt aber

---

---

auch funktionelle Eigenschaften in der internen pH-Regulation, als Stickstoffspeicher, als Induktor der Ethylenbiosynthese (Kathiresan et al., 1997) oder bei Pflanzenwachstum und -entwicklung (Shelp et al., 1999). Unter anderem wurde GABA auch von Kathiresan et al. (1997) in Wurzelexudaten detektiert, was für eine aktive Sekretion eventuell auch in den untersuchten Zellkulturen spricht. Neuere funktionelle Analysen belegen zusätzlich, dass GABA auch eine wichtige Rolle in der Signaltransduktion spielt. Siehe hierzu auch die Übersichtsartikel (Bouche et al., 2003; Bouche and Fromm, 2004). Palanivelu et al. (2003) fanden GABA als essentiellen Regulator innerhalb der Ausbildung des Pollenschlauchs. Eventuell hat GABA während der Pollenembryogenese eine homologe Funktion für Zellwachstum und -teilung. Sangwan et al. (1996) konnten einen Effekt unter Zugabe von GABA während der Embryogenese in Mais nicht bestätigen. Der direkte Nachweis fehlt jedoch auch hier, wie in anderen Publikationen.

Interessanterweise sind jedoch alle Metabolite die bisher aufgeführt wurden nur nach einer Woche Kultivierung im Medium besonders stark akkumuliert und diese Konzentration verringert sich danach, beziehungsweise liegt die Konzentration danach bereits unter dem Detektionslimit. Es kann somit nicht ausgeschlossen werden, dass diese Substanzen nur Bestandteile abgestorbener Pollen sind, da bekannt ist, dass ein gewisser Prozentsatz an Mikrosporen abstirbt (Maraschin et al., 2006). Eine genaue Aussage könnte durch C13 oder N15-markierte Fütterungsexperimente getroffen werden, da hier nur Isotopenmarkierte Metabolite während der Pollenembryogenese entstehen und aktiv ins Medium abgegeben werden müssen.

**Malat** als einer der detektierten Organischen Säuren, zeigte als einzige identifizierte Substanz eine Akkumulation im Kulturmedium über den gesamten Zeitraum der Kultivierung, und somit eine Akkumulation auch nachdem 80 % des Mediums in den angegebenen Intervallen entfernt wurde. Diese Akkumulation ist somit konträr zu allen anderen identifizierten Metaboliten und deutet auf eine kontinuierliche aktive Sekretion von Malat hin, da diese hohen Konzentrationen nicht durch abgestorbene Zellen zu begründen sind. Malat als Metabolit spielt intrazellulär eine große Rolle im TCA-Zyklus und vielen anderen Stoffwechselwegen. Über die Funktion und die entsprechende Rolle während der Pollenembryogenese als Exudat im Kulturmedium kann nur spekuliert werden, da hierzu keine Literatur vorhanden war. Norstog (1967) zeigten allerdings auch einen positiven Effekt

---

---

von exogenem Malat auf das Wachstum von Embryos in Gerste. Auch die Effekte von Malat als Exudat in Wurzeln und Zellsuspensionskulturen können für eine Diskussion herangezogen werden. Schell et al. stellten beispielsweise eine wechselseitige Abhängigkeit zwischen der Malatkonzentration und dem pH-Wert im Xylemsaft von Wurzeln (*Fagus sylvatica*) fest (Schell, 1997). Das heißt, dass die Malatkonzentration mit einem niedrigen pH-Wert korrelierte und Malat somit hauptsächlich das pH-Milieu im Xylem bestimmte. Dieses Ergebnis könnte auf die embryogenen Pollenkulturen übertragen werden, da auch hier festgestellt wurde, dass der pH-Wert des Mediums von der Kultur stark kontrolliert wird. Auch in dieser Arbeit wurde gezeigt dass sich während der Pollenembryogenese der pH-Wert auf einen festen Punkt einstellt, unabhängig davon ob das Medium gewechselt wurde. So konnte genau der gleiche pH-Wert in Kulturen mit wöchentlichem Wechsel nach einer gewissen Kultivierungszeit detektiert werden, wie er in Kulturen ohne Wechsel vorherrschte (Abbildung 59). Die Funktionelle Bedeutung unterschiedlicher pH-Werte auf die Regenerationsrate sind jedoch nur spekulativ und werden auch in diesen Arbeiten nicht direkt verifiziert. Eine direkte Assoziation zu den in dieser Arbeit detektierten pH-Werten ist außerdem schwierig, da auch hier nur der anfängliche pH-Wert des Kulturmediums bestimmt wurde und es sich um verschiedene Spezies handelt. Barinova et al. (2004) zeigten, dass ein hoher pH-Wert (7.0-8.0) die gametophytische Entwicklung hemmt und als Stressor für die Induktion der Embryogenese von Vorteil sein kann. Hierbei, so wird postuliert, könnte es zu einer Inhibierung der Invertase kommen und intrazelluläre Stärke wird zunächst abgebaut. Allerdings bildeten sich unter diesen Konditionen anschließend keine embryogenen Strukturen aus. Dies wurde nur durch einen Transfer in Medium mit einem geringeren pH-Wert (6.2-6.5) möglich. Für die genaue Bestimmung des Einflusses von Malat auf den pH-Wert und die Embryogenese sind jedoch weitere Experimente notwendig. Die Ergebnisse dieser Arbeit sind jedoch nicht besonders aussagekräftig und bedürften einer neueren Validierung. In der Arbeit von Schell (Schell, 1997) wurde weiterhin gezeigt, dass der pH-Wert auch einen Einfluss auf die Kalzium-Konzentration besitzt, indem es eventuell als Komplexbildner dient und die Verfügbarkeit dieser Kationen beeinflussen. Somit könnte Malat Einfluss auf die Kalzium-Konzentrationen (extra- wie intrazellulär) haben und kalziumabhängige Signalkaskaden die in die Embryogenese involviert sind beeinflussen. Da sich die Malatkonzentration während der gesamten Kultivierung nicht ändert ist eine Bedeutung in der Regulation des pH-Wertes allerdings wahrscheinlicher. Doch wie auch schon bei den zuvor diskutierten Metaboliten kann ein alleiniger Effekt von Malat als

---

essentielle *Feedersubstanz* ausgeschlossen werden. Eine Zugabe zum Pollen-Assay ohne weitere *Feeder*gewebe zeigte keine Zellteilung innerhalb der Pollen.

Die einzige Substanz die bereits als Additiv im Kulturmedium enthalten war und eine signifikante Konzentrationsänderung zeigte, und in den Analysen detektiert wurde, war **Inositol**. Nach einer starken Akkumulation in der ersten Woche, nahm die Aufnahme von Inositol, welches immer in der gleichen Konzentration zugegeben wurde, in den darauffolgenden Wochen ab. In Eukaryoten sind Phosphoinositole essentielle Metabolite und Signalmoleküle in der Regulation von Zellwachstum. Sie spielen eine Rolle in der Kalziumregulationen, der Membranbiosynthese, haben Einfluss auf das Zytoskelett, den Ionentransport und die RNA-Synthese. Da Inositol in so vielen Stoffwechselwegen eine Rolle spielt, ist es bereits bekannt, dass zeitlich abhängige Veränderungen während der Entwicklung auftreten können (Stevenson et al., 2000).

#### 4.3.3 Akkumulierte Proteine und deren potentieller Einfluss auf die Embryogenese

In beiden Kulturüberständen wurde eine hohe Anzahl an Proteinen detektiert. Diese Proteine lassen sich in drei Hauptklassen einteilen - Hydrolasen, Peroxidasen, Chitinasen und Proteasen. Diese Proteinkategorien zeigen gewisse Homolgien mit extrazellulären Proteinen aus Zellsuspensionskulturen, wie sie bereit beispielsweise in Lippmann et al. (2009) für *Nicotiana tabacum* und in anderen Zellkulturen identifiziert wurden (Okushima et al., 2000; Tran and Plaxton, 2008; Cho et al., 2009; Kim et al., 2009). Das es sich bei Kulturmedien um ein Pseudo-Kompartiment mit vielen Funktionen handelt wurde bereits von (Wink, 1994) postuliert.

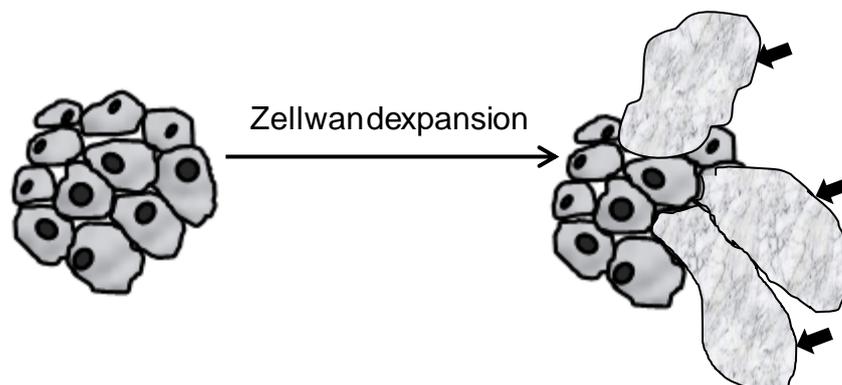
**Tabelle 10: Komplementär identifizierte Proteine in Pollen- und Pistilmedium mit einem *in Silico* berechneten Signalpeptid (*Score Threshold* < 0.65). Werte in Klammer sind erwartete Signalpeptidsequenzen des N-terminus**

Akzession	Beschreibung	SignalP Score
O64393	Wheatwin 2	0.885 (1-23)
Q8W012	Arabinofuranosidase (Beta-Xylosidase)	0.712 (1-32)
Q9XEI3	Beta-Glucanexohydrolase	0.92 (1-25)
A2YP51	Putative uncharacterized protein (peroxidase)	0.897 (1-21)
A2ZSI8	Putative uncharacterized protein (peroxidase)	0.505 (1-23)
Q1ENF0	Cystatin Hv CPI8	0.827 (1-22)

Diese Homologie bzw. Überlappung auf Proteinebene und wahrscheinlich auch auf Metabolitebene könnte den positiven Effekt der Suspensionskultur auf die Ausbildung multizellulärer Strukturen erklären. Funktionen der Komponenten des extrazellulären Raumes in Suspensionskulturen könnten ähnlich in die Pollenembryogenese und Ausbildung von Embryonen involviert sein. Von besonderem Interesse in dieser Arbeit waren die sich überlappenden Proteine, welche in beiden Kulturen, sowohl Pollen- als auch Pistill Co-Kultur, identifiziert wurden, da beide Medien eine Stimulation der Embryo-Entwicklung bewirkten. Die Zahl der Proteine und möglichen Kandidaten, die in die Stimulation involviert sind, wurde auf zehn eingegrenzt. Hierzu zählten ein putatives Protein annotiert als Translationsinhibitor (Q8H4B9), PR-Protein 4 *Wheatwin 2* (O64393), Alpha-L-arabinofuranosidase bzw. beta-D-xylosidase (Q8W012), Methylglyoxalase (Q948T6), beta-Glucanexohydrolase (Q9XEI3), zwei putative Proteine mit Homologie zu Peroxidasen, einem Proteaseinhibitor Cystatin (Q1ENF0) und einem als Triosephosphatisomerase annotierten Protein (P34937). Die *in silico*-Analyse der N-terminalen Peptidsequenzen errechnete nur für sechs Proteine ein Sekretionssignal und somit eine extrazelluläre Lokalisierung. Dieser Befund zeigte eine Kontamination des Mediums durch passiv im Medium akkumulierte intrazelluläre Bestandteile von abgestorbenen Zellen. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass diese auch einen stimulierenden Effekt besitzen. Im Weiteren sollen jedoch die extrazellulären Kandidaten diskutiert werden. Es wurden schon zahlreiche extrazelluläre Proteine in Zellkulturen, der somatischen Embryogenese und Pollenembryogenese identifiziert. Nur wenigen Beispielen wurde ein Effekt bzw. eine Funktion während der Embryogenese zugeordnet. De Jong et al. (1992) identifizierten beispielsweise eine saure Chitinase, welche die somatische Embryogenese in einer temperatursensitiven Suspensionskultur (*Daucus Carota*) komplementierte, die unter hohen Temperaturen nicht embryogen war.

Die Proteinanalysen in Pollen und Pistillmedium führten auch zur Annotierung einiger Chitinasen. Gleiche Sequenzen bzw. daraus abgeleitete Annotierungen wurden jedoch nicht festgestellt. Dies könnte zum einen an den verwendeten Proteindatenbanken liegen, da die meisten ID einem anderen Organismus zugeordnet wurden und Gerste bis zum jetzigen Zeitpunkt nicht vollständig sequenziert ist. Bei der Analyse komplexer tryptisch verdauter Proben kann es durch die begrenzte chromatographische Auftrennung in verschiedenen Experimenten zu unterschiedlichen Peptididentifikationen kommen, so dass ein Protein zu zwei unterschiedlich homologen Proteinsequenzen führt. An dieser Stelle sollen jedoch die mögliche Relevanz der co-identifizierten Proteine diskutiert werden.

Wie bereits erwähnt, wurden 2 putative Peroxidasen identifiziert, die zum einen ein Signalpeptid für den sekretorischen Weg besitzen und zum anderen durch Homologiesuche mithilfe der PeroxiBase-Datenbank (Oliva et al., 2009) der Klasse-III-Peroxidasefamilie zugeordnet werden konnten, welche  $H_2O_2$  reduzieren und dabei verschiedene Substrate als Elektronendonoren verwenden. Diese Familie ist in zahlreiche physiologische Prozesse wie Lignin- und Suberinbiosynthese, Zellwandvernetzung, biotische Stressabwehr, Zellwachstum und Auxinbiosynthese involviert (siehe hierzu Übersichtsartikel von Hiraga et al., 2001 und Passardi et al., 2005). Eine eindeutige funktionelle Charakterisierung des involvierten Mechanismus, der einen positiven Effekt hervorruft, ist daher sehr schwierig. Besonders interessant erscheinen die Ergebnisse von Cordewener et al. (1991) und Loschiavo et al. (1986), welche durch Tunicamycin embryogene Zellen an einer weiteren Embryogenese hinderten, eine Zellproliferation und -elongation aber weiterhin möglich ist (Abbildung 52). Auf biochemischer Ebene verhindert dieser Inhibitor die Glykosylierung (Mannose-oligosaccharide) von Asparaginresten und führt dadurch zu einer verringerten Glykosylierung sekretierter Proteine. Durch konditioniertes Medium wurde dieser inhibierende Effekt in Tunicamycin behandelten Kulturen komplementiert und weiterhin wurde der entsprechende Faktor als Glykoprotein identifiziert. Cordewener et al. (1991) fanden eine entsprechende Peroxidase nach Aufreinigung des konditionierten Mediums. Eine Zellelongation scheint somit hinderlich für eine Embryogenese zu sein.



**Abbildung 52: Schematische Darstellung des Effektes von Tunicamycin auf die embryogenen Strukturen.**

**Die embryogenen Zellen durchlaufen eine Zellelongation, die durch Zugabe konditionierten Mediums verhindert werden kann. Modifiziert nach Van Engelen 1992**

Es kommt während der Pollenembryogenese zu mehreren Zellteilungen ohne eine signifikante Vergrößerung des Embryos. Somit könnte auch in diesem Fall die Peroxidase einen stimulierenden Effekt auf die Pollenembryogenese besitzen, da in konditioniertem Medium eine bessere Embryogeneseausbeute möglich war. Der initiale *Feeder*-Effekt während der Pollenembryogenese wurde jedoch auch für die Peroxidase nicht nachgewiesen.

---

Dass die Zellwandmodifikation eine entscheidende Rolle innerhalb der Zellentwicklung und Embryogenese spielt wurde bereits erwähnt, was eine eventuelle spezifische Funktion der komplementär identifizierten Glucanase und Xylosidase, beides Zellwand-modifizierende Enzyme, erklären würde. In der somatischen Embryogenese beziehen sich viele Marker auf die Zellwandstruktur (Fortes et al., 2002). Umfassende Daten über Zellwandbestandteile und deren Restrukturierung während der Induktion in der Pollenembryogenese und anschließenden Embryoentwicklung, sind in der Literatur wenig zu finden. Es gibt jedoch Untersuchungen an *Citrus clementina* (Ramirez et al., 2003), *Olea europaea* (Solis et al., 2008) sowie *Nicotiana tabacum* und *Capsicum annuum* (Barany et al., 2010), in denen ein Unterschied in der Esterifizierung des Pektins der Zellwände in Mikrosporen und MDE gefunden wurde. Dabei zeigten embryogene Mikrosporen und daraus hervorgegangene Embryonen eine stärkere Esterifizierung des Pektins gegenüber den Pollen der gametophytischen Entwicklung. Auch ein geringer Anteil an Xyloglukan wurde in frühen Embryonen detektiert. Ein Grund für die fördernde Wirkung von konditioniertem Medium könnte somit die enzymatische Aktivität der zellwandmodifizierenden Proteine wie Xylosidase und Glucanase sein. Barany et al. (2010) zeigten zudem, dass sich diese Verhältnisse in älteren Embryonen verändern und somit deesterfizierte Pektine, und eine höhere Abundanz an Xyloglukanen vorhanden waren. Diese Änderungen in der Zellwandstruktur, die identifizierten zellwandmodifizierenden Enzyme in embryogenen und Co-Kulturen, würden erklären warum es in der späteren Kultivierung auch zu inhibierenden Effekten durch Co-Kulturen kommen kann, wenn entsprechende Enzyme vorhanden sind, die die benötigten Zellwandstrukturen (Xyloglukan etc.) degradieren. Das sind jedoch neben der These der Verarmung an Nährstoffen im Medium durch Co-Kultivierung, die z.B. von Huang et al. postuliert wurden (Huang et al., 1990) ebenfalls nur hypothetische Erklärungen.

Zur Validierung dieser Möglichkeiten sind weitere Versuche nötig, die beispielsweise entsprechende Enzyme während der Kultivierung inhibieren bzw. Versuche mit konditioniertem, an zu untersuchenden Enzymen abgereichertem Medium unter Verwendung des hier entwickelten Biotest.

Die beiden als Wheatwin 2 (ein PR-4 Protein) und Cystatin 8 (eine Isoform der Cystein-Protease Inhibitor) annotierten Proteine wurden in einigen Arbeiten gewebespezifisch im Endosperm sich entwickelnder Samen detektiert (Altenbach et al., 2007; Martinez et al., 2009), auch wenn diese Proteine ubiquitär vorkommen und während biotischem Stress induziert werden. Ob diese Proteine einen Effekt auf die Embryogenese haben oder nur ein

---

Resultat der generellen Stressantwort sind, ist nicht geklärt. Es ist jedoch bekannt, dass einige Proteine sowohl während der Embryogenese als auch hoch abundant im Endosperm zygotischer Embryos vorkommen und für ähnliche Mechanismen in beiden Systemen verantwortlich sein könnten (Pulido et al., 2006). Interessanterweise konnten Pulido et al. (2006) auch Hordeine in Mikrosporen und im Endosperm lokalisieren und es ist bekannt, dass Cystatin unter anderem Cathepsin L-Like Cysteine-Proteasen inhibiert und diese während der Samenentwicklung Hordeine mobilisieren (Martinez et al., 2009). Ob die Isoform 8, allerdings auch die gleiche Funktion besitzt wurde nicht gezeigt.

Es wäre aber durchaus möglich, dass Cystatin eine Rolle im Stoffwechsel und der erfolgreichen Entwicklung während der Pollenembryogenese hat, indem sie in die aufgeführten regulatorischen Netzwerke eingreift und diese wichtig für die Embryogenese sind. Das PR-4 Protein Wheatwin 2 wird hauptsächlich durch Stress exprimiert und besitzt eine Ribonuklease Aktivität. Auch wenn nicht ausgeschlossen werden kann, dass es irgendeine fördernde Funktion hat so scheint es nur eine Folge der Verwundung und Stresssituation im Kulturmedium zu sein.

Zusammenfassend lässt sich auch auf Proteinebene, ähnlich der Suspensionskulturen, somatischen und zygotischen Embryogenese-Kulturen ein homologes Sekretom identifizieren. Über die genaue Funktion lässt sich jedoch nur spekulieren, da die meisten Ergebnisse anderer Arbeiten nur aus Untersuchungen von Kulturen somatischer Zellen stammen und diese mit der Pollenembryogenese nur unter Vorbehalt vergleichbar sind. Da es sich um zahlreiche detektierte Proteine handelt, gestaltet sich eine exakte Bestimmung allerdings schwierig. Der aussichtreichste Kandidat ist jedoch die von Cordewener et al. (1991) identifizierte, für die somatischen Embryogenese wichtige Peroxidase. Um die entsprechende Funktion in der Pollenembryogenese zu validieren, könnte ein ähnlicher Ansatz mit Inhibitoren durchgeführt werden.

#### **4.4 Eingrenzung möglicher Kandidaten des initialen stimulierenden Effektes**

Im vorherigen Abschnitt wurde ausgiebig über mögliche Kandidaten, welche identifiziert wurden diskutiert. Darüber welcher davon eine essentielle Funktion besitzt, konnte nur spekuliert werden. Neben den co-sekretierten Komponenten wurden auch noch weitere Proteine und Metabolite, aber auch Peptide (Daten nicht gezeigt) identifiziert. Um die Menge an Möglichkeiten zu reduzieren wurde nach der Etablierung des Biotests konditioniertes

---

---

Medium fraktioniert und getestet (siehe hierzu 2.4). In ersten Versuchen gelang es nicht, durch einmalige Zugabe konditionierten Mediums von Pistillkulturen die sonst durch die Pollenkultur selbst generierte Konditionierung zu komplementieren. Dieser Fakt, deutet auf eine gewisse Instabilität der stimulierenden Substanz bzw. eine Akkumulation dieser hin. Eine weitere Möglichkeit, wäre eine Modifikation der Komponenten durch andere sich im Medium befindliche Substanzen oder eine etwaige Inaktivierung dadurch. Dies steht zunächst im Gegensatz mit Literaturdaten, bei denen konditioniertes Medium nur einmal zugegeben wurde und trotzdem ein Effekt detektiert werden konnte (Xu et al., 1981; Köhler and Wenzel, 1985; Huang et al., 1990; Matveeva et al., 1998). Allerdings können die Daten nicht direkt verglichen werden, da es sich entweder um Antherenkulturen handelt, die selbst stimulierend wirken oder die Zelldichte bei Huang et al (1990) so gewählt wurde, dass sich die Mikrosporen selbst nach einem Induktionszeitraum stimulieren können. Außerdem handelte es sich in dieser Analyse von Hunang et al. um *Brassica napus* Mikrosporen. Auch wenn vermutet wird, dass die Pollenembryogenese in Di- und Monocotyledonen gleichermaßen abläuft, können Unterschiede in der Initiierung nicht ausgeschlossen werden. Nach einigen Versuchen wurde in dem vorliegenden Ansatz mit einer *low-density* Kultur ein Kompromiss zwischen der Frequenz der Medienerneuerung und der Embryonen/Kallusausbeute gefunden. Wie bereits erwähnt, wird bereits seit mehreren Dekaden nach den initialen Mechanismen der Pollenembryogenese geforscht. Einige Hinweise auf mögliche Kandidaten in der Literatur wurden bereits genannt. Es ist jedoch wichtig zu beachten, dass es einen Unterschied zwischen Substanzen geben kann, die für eine erste Initialisierung der Embryogenese verantwortlich sind und denen die „nur“ förderlich für eine weitere Kultivierung sind. Letztere wurden bereits durch zahlreiche Analysen untersucht, wo sich entwickelnde Kulturen mit einer Co-Kultur versehen, einen positiven Effekt zeigten. Siehe hierzu auch Kapitel 4.2.2. Die meisten Literaturdaten gehen von einem Effekt durch Proteine aus. Hierunter zählen vor allem Chitinasen, Proteasen, Peroxidasen und Arabinogalaktanproteine (AGP) (Devries et al., 1988; Van Engelen and De Vries, 1992; Wink, 1994; Matthys-Rochon et al., 2004; Kasha et al., 2006). Letztere zählten einige Zeit zu den potentiellsten Kandidaten und bis heute kann nicht ausgeschlossen werden, dass sie einen gewissen stimulatorischen Effekt besitzen. Diese Ergebnisse beziehen sich jedoch hauptsächlich auf Versuche mit somatischem embryogenen Gewebe (Van Hengel et al., 2002). Aber auch in der Pollenembryogenese konnten Hinweise darauf gefunden werden (Borderies et al., 2004; Letarte et al., 2006).

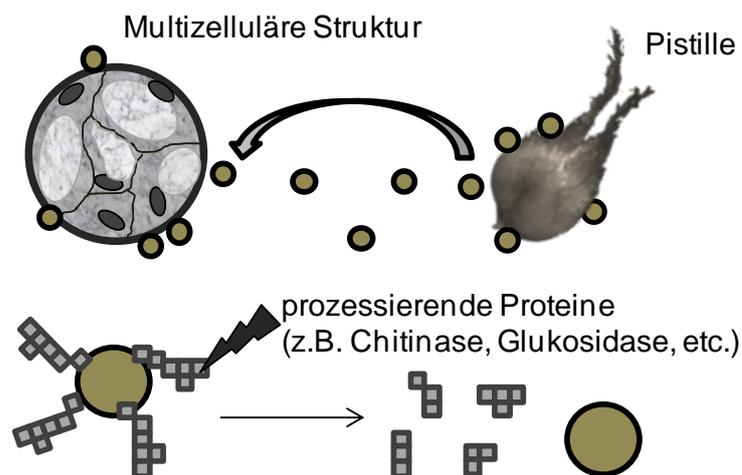
---

Es wurde gezeigt, dass beta-Glycosyl-Yariv Reagent [1,3,5-tris(4- $\beta$ -D-glucopyranosyloxyphenylazo)-2,4,6-trihydroxybenzene] welches speziell an AGP bindet und somit als Inhibitor fungiert und die embryogene Entwicklung verhindert.

Die Ergebnisse dieser Arbeit schließen Arabinogalaktanproteine und auch andere Proteine jedoch als initialen Effektor aus, da durch die Fraktionierung des Mediums nach Größenfraktionierung die Hochmolekulare Fraktion >30 kDa keine Embryogenese in der *low density* Kultur auslöste. Die hier gezeigten Ergebnisse schließen auch weiterhin die AGPs nicht als Stimulanz aus. Aber es wurde eindeutig gezeigt, dass sie **keine essentielle Funktion** in der Rolle des *Feederns* durch Co-Kulturen spielen.

Auch die bereits diskutierten Peroxidasen können somit als essentieller Effektor ausgeschlossen werden, da auch diese Proteine mit einem Molekulargewicht von mehr als 30 kDa nur in der hochmolekularen Fraktion zu finden waren.

Ein Aspekt der auch in der Literatur diskutiert wird, ist die vorherige Prozessierung der entsprechenden Moleküle. So könnte es sein, dass nicht AGPs an sich sondern vielmehr eine Teilsequenz, wie zum Beispiel ein bestimmtes Glykosilierungsmuster des Proteins die entsprechende Signal/Stimulationsfunktion besitzt. Auch andere Proteine könnten eine solche Funktion der Prozessierung inne haben und somit den *Feeder*-Effekt zusätzlich erhöhen, was die positiven Effekte, welche in der Literatur beschrieben wurden, erklären würde. Eine entsprechende Möglichkeit der Prozessierung ist in Abbildung 53 dargestellt.

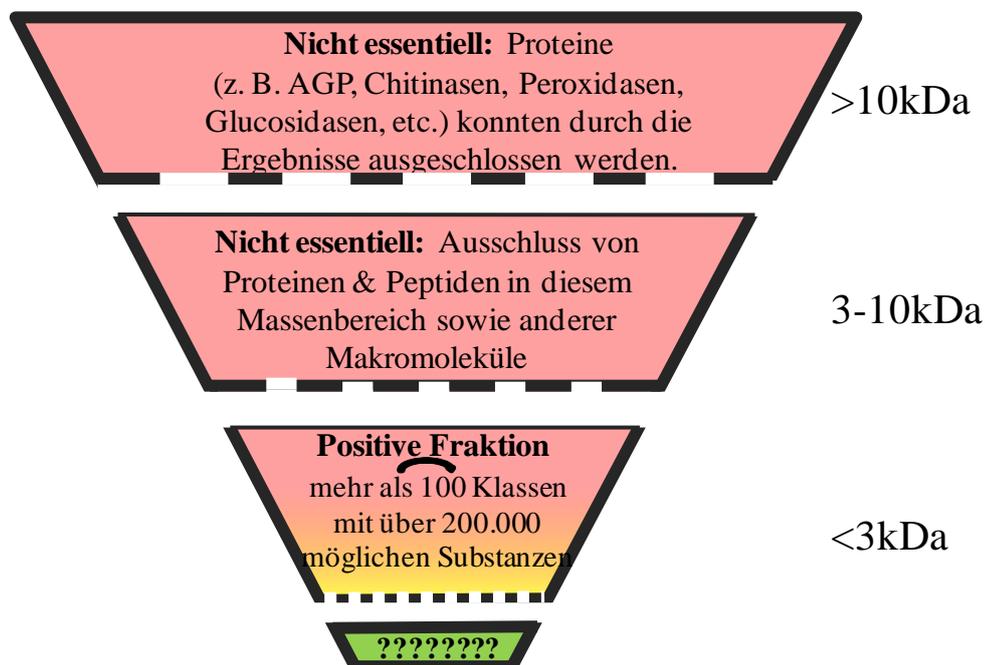


**Abbildung 53: Mögliche Prozessierung von *Feeder*-Substanzen durch Proteine die alleinig keine *Feeder*-Wirkung zeigten aber durch die Prozessierung des Signalmoleküls eine additive Wirkung aufweisen könnten.**

Dies würde jedoch bedeuten, dass auch die untersuchte hochmolekulare Fraktion eine verbesserte Entwicklung hervorrufen sollte, wenn diese in Kombination mit der essentiellen niedermolekularen Fraktion eingesetzt wird. Solch ein Versuch sollte in weiteren Studien

durchgeführt werden. Die beschriebene Möglichkeit würde auch die Abnahme der Stimulations-Effizienz nach der Fraktionierung erklären. Allerdings liegt näher, dass es durch die Aufreinigung zu Verlusten der *Feeder*-Moleküle kommt und sich die abnehmende Effizienz dadurch begründen lässt.

Die weitere Fraktionierung bis hin zu einer Fraktion kleiner als 3 kDa ergab ein positives Signal in der niedermolekularen Fraktion. In dieser Fraktion sind sowohl Peptide als auch Metabolite zu erwarten. Mittlerweile gibt es zahlreiche Studien über extrazelluläre Signalmoleküle in Pflanzen. Für Einzelheiten wird auf den Übersichtsartikel (Ryan et al., 2002; Wheeler and Irving, 2010) und Zitierungen darin verwiesen. Die genauen Funktionen, im speziellen in embryogenen Kulturen, sind jedoch nur unzureichend geklärt. Wie bereits beschrieben wurde, kann auch nicht direkt ein Ergebnis im Kontext der somatischen Embryogenese auf die Pollenembryogenese übertragen werden. Ein potentieller Kandidat und häufig im Bezug auf Embryoentwicklung genannt ist das Polypeptid Phytosulfokin, was in *Single cell*-Mesophyllkulturen (Matsubayashi and Sakagami, 1996) oder somatischen *Daucus Carota* Suspensionskulturen (Hanai et al., 2000) eine Zellproliferation auslöste, die durch den Verdünnungseffekt zuvor nicht möglich war.



**Abbildung 54:** Schema des Ausschlusses verschiedener Substanzklassen, die nicht als essentielle Feeder-induzierte Signale in Frage kommen. Dabei zeigt Rot keinen Effekt hin zu Fraktionen mit positiven Effekt in Grün.

Durch die weitere Auftrennung der 3kDa Fraktion sollte eine weitere Eingrenzung durchgeführt werden. Die erste Methode war dabei eine Gelfiltration mit einer Superdexpeptidsäule. Der Auflösungsbereich betrug dabei zwischen 100 und 7.000 Da.

Dieser Bereich war somit ideal um eventuelle Peptide von den entsprechenden noch kleineren Molekülen wie Zuckern und den beschriebenen organischen Säuren, Aminosäuren etc. abzutrennen. Auch größere Oligosaccharide sollte somit weiter aufgetrennt werden.

Es wurde in keiner der Fraktionen eine biologische Aktivität festgestellt. Da die eingetrockneten Fraktionen in äquivalentem Volumen resuspendiert wurden, konnte ein Verdünnungseffekt ausgeschlossen werden.

Auch die weiteren Fraktionierungsmethoden führten zu keinem positiven Ergebnis. Die Ursachen dafür sind nur hypothetisch zu diskutieren, da hierfür weitere Untersuchungen notwendig wären.

Es könnte jedoch durch die Fraktionierung zu einer Degeneration des entsprechenden Signalmoleküls kommen. Dies ist vor allem in der Zwei-Phasen Extraktion möglich, da hierbei die Lösungsmittel Heptan und Methanol sowie Ethylacetat verwendet wurden. Während dieser Aufarbeitung kann es zu unerwünschten Spaltungen oder Denaturierungen kommen und somit zu einem Verlust der biologischen Aktivität.

Während der Festphasenextraktion besteht die Möglichkeit, dass die entsprechenden Moleküle unter den gewählten Bedingungen nicht eluieren und an der Säule haften. Allerdings ist dies bei den anderen Methoden eher unwahrscheinlich.

Am schlüssigsten erscheint die These eines Mehrkomponenten Signals. Das bedeutet, dass sich durch die weitere Auftrennung verschiedene essentielle Moleküle vereinzeln. Dadurch ist die biologische Aktivität, die nur durch das Zusammenspiel dieser Substanzen gewährleistet ist, inhibiert. Einige Tests mit wieder fusionierten Fraktionen unterstützen diese These jedoch nicht, da der stimulatorische Effekt auch nach Wiedervereinigung nicht rekonstituiert werden konnte.

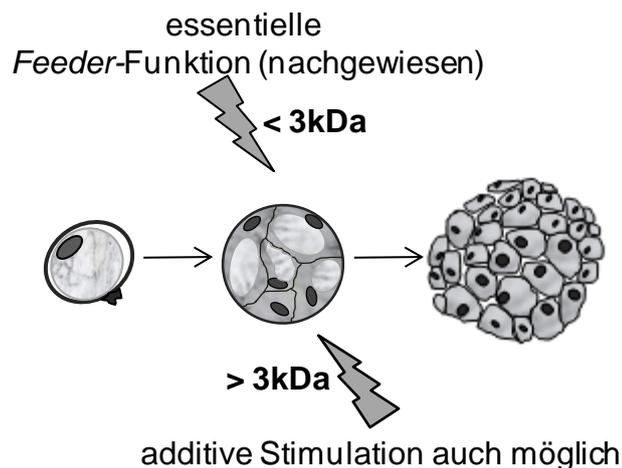
Zusammenfassend betrachtet, wurden in dieser Arbeit zumindest hochmolekulare Substanzen, wie Proteine als Signale für den initialen *Feeder*-Effekt ausgeschlossen (Abbildung 54). Aber im Medium präsenste AGPs, und weitere Proteine scheinen für die Pollenembryogenese nicht essentiell zu sein, was in zahlreichen Studien postuliert wurde. Ob diese dennoch einen positiven Einfluss auf die Pollenembryogenese haben, wurde durch diese Untersuchungen weder gestützt noch vollkommen widerlegt. Lediglich ein Hinweis auf einen stimulierenden Effekt zeigten die Bilder der Fütterungsversuche. Eine leichte Verringerung der Ausbeute an Embryonen ist nach Fraktionierung des Mediums zu erkennen. Daraus könnte man einen Co-Effekt von weiteren Substanzen nicht ausschließen.

---

Durch diese Ergebnisse und bereits in der Literatur gezeigte positive Effekte von Substanzen wie Chitinasen oder Peroxidasen, die in dieser Untersuchung keinen Effekt zeigten, kann ein hypothetisches Modell eines Zwei-Stufen-Mechanismus aufgestellt werden.

- **Essentielle Stimulation:** Es wird mindestens eine Substanz kleiner 3 kDa benötigt, die essentiell für die Kulturen ist, um die Pollenembryogenese zu stimulieren.
- **Additive Stimulation:** Zweitens könnten Substanzen und somit auch Proteine, wie AGPs oder andere extrazelluläre Proteine die weitere embryogenetische Entwicklung verbessern, indem sie zusätzlich eine fördernde Wirkung hervorrufen, jedoch alleinig unzureichend für die Initiation der Pollenembryogenese sind.

Dieses Modell kombiniert so die Ergebnisse der Literatur mit den in dieser Arbeit erhaltenen Daten. Diese Hypothese ist allerdings nur ein vorläufiges Modell und muss in weiteren Versuchen evaluiert werden.



**Abbildung 55: Schematische Darstellung der Zwei-Stufen-Stimulation während der Pollenembryogenese. 1. Die essentielle Stimulation muss durch Moleküle kleiner als 3 kDa ausgelöst werden. In einer additiven Stimulation während der Zellteilungen in Embryonen könnten auch Proteine und andere Moleküle involviert sein.**

Für eine weitere Einschränkung der Möglichkeiten müssten neben anderen Fraktionierungsmethoden auch effizientere Kultivierungen etabliert werden, da durch die Co-Kultur mit Pistillen nur wenig Material zur Verfügung steht. Wenn davon ausgegangen werden kann, dass sich bei dem Signal um ein Molekül mit sehr niedriger Abundanz handelt, so ist jedoch zwingend notwendig, genügend Ausgangsmaterial zu generieren, da durch die Aufarbeitung auch immer Verluste in der Ausbeute berücksichtigt werden müssen. Weiterhin sollten die Kallusstrukturen auch bis zur Regeneration kultiviert werden, was in dieser Arbeit nicht durchgeführt wurde. Dadurch lassen sich zum einen Rückschlüsse auf den Einfluss der einzelnen Fraktionen in unterschiedlichen Entwicklungszeiten ziehen und zum anderen

würden die Ergebnisse auch für die anwendungsbezogene Forschung und Pflanzenzüchtung interessanter, da hier eher die Ausbeute an Regeneraten zählt.

---

## 5 Zusammenfassung

Die Pollenembryogenese hat ein enormes Potential sowohl für die Anwendung in der modernen Pflanzenzüchtung als auch als experimentelles Modell für die Grundlagenforschung. Trotz mehrerer Jahrzehnte Forschung sind die ihr zugrundeliegenden Mechanismen auf biochemischer und molekularbiologischer Ebene jedoch nur unzureichend aufgeklärt. Insbesondere aufgrund dieses Defizits ist eine routinemäßige Nutzung von Haploidentechnik für zahlreiche wichtige Kulturpflanzen noch immer nicht erschlossen. Aus diesem Grund fokussiert die vorliegende Arbeit, die vorrangig anhand des Getreidemodells Gerste durchgeführt wurde, auf Veränderungen auf Stoffwechsel- und Proteinebene während der Pollenembryogenese und dessen Induktion, um Erkenntnisse zu erlangen, die in methodischen Fortschritt umgesetzt werden könnten. In der Literatur sind neben zahlreichen empirischen Studien zu erforderlichen Konditionen für embryogene Pollenkulturen einige Transkriptomanalysen zu finden. Insbesondere aufgrund der Problematik repräsentativer Probenahmen sowie limitierter Korrelation von Transkriptdaten und den tatsächlich vorliegenden Protein- und Metabolitkonzentrationen wurden diese in der Arbeit untersucht.

Es konnten einige Metabolite identifiziert werden, die nach Induktion der Pollenembryogenese eine signifikant geänderte Konzentration aufwiesen. gamma-Aminobuttersäure war im Gegensatz zu den anderen Aminosäuren in behandelten Pollen höher abundant und könnte als metabolischer Marker für die Induktion der Pollenembryogenese postuliert werden. Auch Saccharose und Maltose zeigten eine stark veränderte Abundanz nach Stressbehandlung. Innerhalb der anderen gemessenen Metabolite des Primärstoffwechsels wurden jedoch nur wenige weitere Metabolite in signifikant unterschiedlicher Konzentration detektiert. Weiterhin wurden mehrere Kandidatenproteine identifiziert, die während der Induktion der Pollenembryogenese-Kompetenz im Vergleich zur unbehandelten Pollen in spezifischen Abundanzen vorlagen. In dieser Untersuchung konnte jedoch nicht festgestellt werden, ob es sich dabei um essentielle, die Pollenembryogenese bedingende Veränderungen handelt oder aber um Nebeneffekte der induktiven Stressbehandlung. Insgesamt lagen 63 Proteine in ihrer Abundanz signifikant verändert vor. Ein Teil der Proteine, unter anderem eine Alkoholdehydrogenase, Chaperone und Hitzeschockproteine oder Enzyme der Redoxregulation zeigten ähnliche Regulationen im Vergleich zu früheren Transkriptstudien. Es konnten jedoch auch weitere Proteine wie ein Rac-Dissoziationsinhibitor und weitere Proteine der Signaltransduktion annotiert werden, die

---

während der Induktion der Pollenembryogenese-Kompetenz in der Literatur noch nicht genauer untersucht wurden.

In den untersuchten Entwicklungsstadien der Pollenembryogenese wurde im Gegensatz zur gametophytischen Pollenentwicklung ein signifikanter Anstieg der Galakturonsäurekonzentration gemessen, was einen spezifischen Marker der Pollenembryogenese darstellt. Da es sich um ein Edukt der Zellwandbiosynthese handelt, ist dieser Stoffwechselweg durchaus für die zellteilungsaktive Pollenembryogenese relevant, als ein auslösender Regulator für die Pollenembryogenese kommt Galakturonsäure jedoch eher nicht infrage.

Die Identifizierung von Transkriptionsfaktoren erfolgte zu mehreren Zeitpunkten der Pollenkultur. Aufgrund der prinzipiell geringen Konzentrationen sind diese jedoch oft nur schwer zu detektieren. In dieser Arbeit war es möglich elf Transkriptionsfaktoren zu identifizieren, wobei zwei Faktoren, ein BTF-like und ein MADS-Box Transkriptionsfaktor unterschiedliche Abundanzen im Vergleich beider Entwicklungswege zeigten und für nachfolgende funktionelle Untersuchungen im Kontext der Pollenembryogenese infrage kommen.

Parallel zu den intrazellulären Studien wurden erstmals ausführliche Analysen des Sekretoms von *Feeder*-Kulturen durchgeführt, um Pollenembryogenese-stimulierende Substanzen zu identifizieren und die gewonnenen Erkenntnisse in verbesserte Kulturmethodik umzusetzen. Bei diesen Untersuchungen wurde eine Vielzahl an extrazellulären Substanzen identifiziert. Hierbei scheinen Moleküle die sowohl von embryogenen Pollen als auch heterologen *Feeder*-Gewebe an das Nährmedium abgegeben werden als die aussichtsreichsten Kandidaten mit potenziell stimulierendem Effekt. Interessant war zudem der Befund einer Korrelation von sekretierter Prolinkonzentration und der Pflanzenregeneration aus embryogenen Pollenkulturen.

Da eine Validierung aller identifizierten Substanzen aufgrund der Vielzahl nicht möglich ist, sollten zunächst die essentiellen Molekülklassen evaluiert werden. Um diese Untersuchungen durchzuführen, wurde zunächst ein *Bio-Assay* etabliert, der den *Feeder*-Effekt der Pollen untereinander ausschließt um den davon unabhängigen Effekt von co-kultivierten heterologen Geweben bestimmen zu können. Darüber hinaus ermöglicht dieser *Bio-Assay* aufgrund der Möglichkeit das Medium auszutauschen Untersuchungen zur Stabilität der effektiven *Feeder*-Moleküle. Eine funktionelle Analyse verschiedener Größenfraktionen der im Nährmedium vorhandenen Moleküle ergab, dass Moleküle größer als 3 kDa als essentielle Faktoren der

---

*Feeder*-Kulturen ausgeschlossen werden können. Im Hinblick auf die anwendungsbezogene Verwendung co-kultivierter Weizen-Pistille für Genotypen oder Pflanzenspezies mit vergleichsweise geringer Neigung zur Pollenembryogenese wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass eine Zerteilung der Pistille einen signifikant positiven Einfluss sowohl auf den Anteil sich embryogen entwickelnder Pollen als auch auf die Größe der resultierenden Kalli hat. Obwohl sich durch das zusätzliche Zerschneiden der Pistille ein geringfügig erhöhter Arbeitsaufwand ergibt, ist dieser Befund Grundlage einer wesentlichen methodischen Verbesserung der Co-Kultivierung von *Feeder*-Gewebe dar. In weiterführenden Arbeiten wurde bereits gezeigt, dass dieser Effekt auch auf andere Spezies übertragbar ist.

---

## 6 Literaturverzeichnis

- Aaronson DS, Horvath CM** (2002) A road map for those who don't know JAK-STAT. *Science* **296**: 1653-1655
- Altenbach SB, Kothari KM, Tanaka CK, Hurkman WJ** (2007) Genes encoding the PR-4 protein wheatwin are developmentally regulated in wheat grains and respond to high temperatures during grainfill. *Plant Science* **173**: 135-143
- Barany I, Fadon B, Risueno MC, Testillano PS** (2010) Cell wall components and pectin esterification levels as markers of proliferation and differentiation events during pollen development and pollen embryogenesis in *Capsicum annum* L. *Journal of Experimental Botany* **61**: 1159-1175
- Barinova I, Clement C, Martiny L, Baillieul F, Soukupova H, Heberle-Bors E, Touraev A** (2004) Regulation of developmental pathways in cultured microspores of tobacco and snapdragon by medium pH. *Planta* **219**: 141-146
- Barinova L, Zhexembekova M, Barsova E, Lukyanov S, Heberle-Bors E, Touraev A** (2002) Antirrhinum majus microspore maturation and transient transformation in vitro. *Journal of Experimental Botany* **53**: 1119-1129
- Barnabas B, Pfahler PL, Kovacs G** (1991) Direct Effect of Colchicine on the Microspore Embryogenesis to Produce Dihaploid Plants in Wheat (*Triticum-Aestivum* L). *Theoretical and Applied Genetics* **81**: 675-678
- Bertoldi D, Tassoni A, Martinelli L, Bagni N** (2004) Polyamines and somatic embryogenesis in two *Vitis vinifera* cultivars. *Physiologia Plantarum* **120**: 657-666
- Binarova P, Hause G, Cenklova V, Cordewener JHG, Campagne MMV** (1997) A short severe heat shock is required to induce embryogenesis in late bicellular pollen of *Brassica napus* L. *Sexual Plant Reproduction* **10**: 200-208
- Blakeslee AF, Belling J, Farnham ME, Bergner AD** (1922) A Haploid Mutant in the Jimson Weed, "*Datura Stramonium*". *Science* **55**: 646-647
- Bloss TA, Witze ES, Rothman JH** (2003) Suppression of CED-3-independent apoptosis by mitochondrial beta NAC in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **424**: 1066-1071
- Bolle C** (2004) The role of GRAS proteins in plant signal transduction and development. *Planta* **218**: 683-692
- Borderies G, le Behec M, Rossignol M, Lafitte C, Le Deunff E, Beckert M, Dumas C, Matthys-Rochon E** (2004) Characterization of proteins secreted during maize microspore culture: arabinogalactan proteins (AGPs) stimulate embryo development. *European Journal of Cell Biology* **83**: 205-212
- Borg M, Brownfield L, Twell D** (2009) Male gametophyte development: a molecular perspective. *Journal of experimental botany* **60**: 1465-1478
- Bouche N, Fromm H** (2004) GABA in plants: just a metabolite? *Trends in Plant Science* **9**: 110-115
- Bouche N, Lacombe B, Fromm H** (2003) GABA signaling: a conserved and ubiquitous mechanism. *Trends in Cell Biology* **13**: 607-610
- Bouchereau A, Aziz A, Larher F, Martin-Tanguy J** (1999) Polyamines and environmental challenges: recent development. *Plant Sci.* **140**: 103-125
- Boutilier K, Offringa R, Sharma VK, Kieft H, Ouellet T, Zhang LM, Hattori J, Liu CM, van Lammeren AAM, Miki BLA, Custers JBM, Campagne MMV** (2002) Ectopic expression of BABY BOOM triggers a conversion from vegetative to embryonic growth. *Plant Cell* **14**: 1737-1749
-

- Brockstedt E, Otto A, Rickers A, Bommert K, Wittman-Liebold B** (1999) Preparative high-resolution two-dimensional electrophoresis enables the identification of RNA polymerase B transcription factor 3 as an apoptosis-associated protein in the human BL60-2 Burkitt lymphoma cell line. *Journal of Protein Chemistry* **18**: 225-231
- Büter B, Schmid JE, Stamp P** (1991) Effects of L-proline and post-plating temperature treatment on Maize (&i&gt;Zea mays&i&gt; L.) anther culture. *Plant Cell Reports* **10**: 325-328
- Castillo AM, Valles MP, Cistue L** (2000) Comparison of anther and isolated microspore cultures in barley. Effects of culture density and regeneration medium. *Euphytica* **113**: 1-8
- Centeno DC, Osorio S, Nunes-Nesi A, Bertolo ALF, Carneiro RT, Araújo WL, Steinhauser M-C, Michalska J, Rohrman J, Geigenberger P, Oliver SN, Stitt M, Carrari F, Rose JKC, Fernie AR** (2011) Malate Plays a Crucial Role in Starch Metabolism, Ripening, and Soluble Solid Content of Tomato Fruit and Affects Postharvest Softening. *The Plant Cell Online* **23**: 162-184
- Chia T, Thorneycroft D, Chapple A, Messerli G, Chen J, Zeeman SC, Smith SM, Smith AM** (2004) A cytosolic glucosyltransferase is required for conversion of starch to sucrose in Arabidopsis leaves at night. *Plant Journal* **37**: 853-863
- Chiancone B, Tassoni A, Bagni N, Germana MA** (2006) Effect of polyamines on in vitro anther culture of Citrus clementina Hort. ex Tan. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* **87**: 145-153
- Cho MS, Zapata FJ** (1988) Callus Formation and Plant-Regeneration in Isolated Pollen Culture of Rice (*Oryza-Sativa-L Cv Taipei 309*). *Plant Science* **58**: 239-244
- Cho WK, Chen XY, Chu H, Rim Y, Kim S, Kim ST, Kim SW, Park ZY, Kim JY** (2009) Proteomic analysis of the secretome of rice calli. *Physiologia Plantarum* **135**: 331-341
- Christie PJ, Hahn M, Walbot V** (1991) Low-Temperature Accumulation of Alcohol Dehydrogenase-1 Messenger-Rna and Protein-Activity in Maize and Rice Seedlings. *Plant Physiology* **95**: 699-706
- Cistue L, Soriano M, Castillo AM, Valles MP, Sanz JM, Echavarri B** (2006) Production of doubled haploids in durum wheat (*Triticum turgidum L.*) through isolated microspore culture. *Plant Cell Reports* **25**: 257-264
- Clement C, Pacini E, Jacquard C** (2011) Pollen vacuoles and their significance. *Planta* **234**: 217-227
- Cohen SA, Michaud DP** (1993) Synthesis of a Fluorescent Derivatizing Reagent, 6-Aminoquinolyl-N-Hydroxysuccinimidyl Carbamate, and Its Application for the Analysis of Hydrolysate Amino-Acids Via High-Performance Liquid-Chromatography. *Analytical Biochemistry* **211**: 279-287
- Cordewener J, Booij H, Vanderzandt H, Vanengelen F, Vankammen A, Devries S** (1991) Tunicamycin-Inhibited Carrot Somatic Embryogenesis Can Be Restored by Secreted Cationic Peroxidase Isoenzymes. *Planta* **184**: 478-486
- Coronado MJ, Hensel G, Broeders S, Otto I, Kumlehn J** (2005) Immature pollen-derived doubled haploid formation in barley cv. Golden Promise as a tool for transgene recombination. *Acta Physiologiae Plantarum* **27**: 591-599
- Cresti M, Blackmore S, van Went JL** (1992) Atlas of Sexual Reproduction in Flowering Plants. Springer Verlag, Berlin-Heidelberg
-

- Custers JBM, Cordewener JHG, Nollen Y, Dons HJM, Campagne MMV** (1994) Temperature Controls Both Gametophytic and Sporophytic Development in Microspore Cultures of Brassica-Napus. *Plant Cell Reports* **13**: 267-271
- Daghma DS, Kumlehn J, Melzer M** (2011) The use of cyanobacteria as filler in nitrocellulose capillaries improves ultrastructural preservation of immature barley pollen upon high pressure freezing. *Journal of Microscopy* **244**: 79-84
- Davies PA, Morton S** (1998) A comparison of barley isolated microspore and anther culture and the influence of cell culture density. *Plant Cell Reports* **17**: 206-210
- De Jong AJ, Cordewener J, Lo Schiavo F, Terzi M, Vandekerckhove J, Van Kammen A, De Vries SC** (1992) A carrot somatic embryo mutant is rescued by chitinase. *The Plant cell* **4**: 425-433
- Deutsch F, Kumlehn J, Ziegenhagen B, Fladung M** (2004) Stable haploid poplar callus lines from immature pollen culture. *Physiologia Plantarum* **120**: 613-622
- Devaux P, Li HC** (2003) High frequency regeneration of barley doubled haploid plants from isolated microspore culture. *Plant Science* **164**: 379-386
- Devries SC, Booij H, Janssens R, Vogels R, Saris L, Loschiavo F, Terzi M, Vankammen A** (1988) Carrot Somatic Embryogenesis Depends on the Phytohormone-Controlled Presence of Correctly Glycosylated Extracellular Proteins. *Genes & Development* **2**: 462-476
- Dias JCD** (2001) Effect of incubation temperature regimes and culture medium on broccoli microspore culture embryogenesis. *Euphytica* **119**: 389-394
- Dias JS, Martins MG** (1999) Effect of silver nitrate on anther culture embryo production of different Brassica oleracea morphotypes. *Scientia Horticulturae* **82**: 299-307
- Eady C, Lindsey K, Twell D** (1995) The Significance of Microspore Division and Division Symmetry for Vegetative Cell-Specific Transcription and Generative Cell Differentiation. *The Plant cell* **7**: 65-74
- Eudes F, Amundsen E** (2005) Isolated microspore culture of Canadian 6x triticale cultivars. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* **82**: 233-241
- Fernandez O, Bethencourt L, Quero A, Sangwan RS, Clement C** (2010) Trehalose and plant stress responses: friend or foe? *Trends in Plant Science* **15**: 409-417
- Forster BP, Heberle-Bors E, Kasha KJ, Touraev A** (2007) The resurgence of haploids in higher plants. *Trends in Plant Science* **12**: 368-375
- Fortes AM, Testillano PS, Risueno MD, Pais MS** (2002) Studies on callose and cutin during the expression of competence and determination for organogenic nodule formation from internodes of *Humulus lupulus* var. Nugget. *Physiologia Plantarum* **116**: 113-120
- Funfschilling U, Rospert S** (1999) Nascent polypeptide-associated complex stimulates protein import into yeast mitochondria. *Molecular Biology of the Cell* **10**: 3289-3299
- Garrido D, Eller N, Heberleborgs E, Vicente O** (1993) Denovo Transcription of Specific Messenger-Rnas during the Induction of Tobacco Pollen Embryogenesis. *Sexual Plant Reproduction* **6**: 40-45
- Garrido D, Vicente O, Heberleborgs E, Rodriguezgarcia MI** (1995) Cellular-Changes during the Acquisition of Embryogenic Potential in Isolated Pollen Grains of *Nicotiana-Tabacum*. *Protoplasma* **186**: 220-230
- Germana MA, Chiancone B** (2003) Improvement of Citrus clementina Hort. ex Tan. microspore-derived embryoid induction and regeneration. *Plant Cell Reports* **22**: 181-187
-

- Gervais C, Newcomb W, Simmonds DH** (2000) Rearrangement of the actin filament and microtubule cytoskeleton during induction of microspore embryogenesis in *Brassica napus* L. cv. Topas. *Protoplasma* **213**: 194-202
- Guha S, Maheshwari SC** (1964) In Vitro Production of Embryos from Anthers of *Datura*. *Nature* **204**: 497-&
- Guzman M, Arias FJZ** (2000) Increasing anther culture efficiency in rice (*Oryza sativa* L.) using anthers from ratooned plants. *Plant Science* **151**: 107-114
- Hanai H, Matsuno T, Yamamoto M, Matsubayashi Y, Kobayashi T, Kamada H, Sakagami Y** (2000) A secreted peptide growth factor, phytosulfokine, acting as a stimulatory factor of carrot somatic embryo formation. *Plant and Cell Physiology* **41**: 27-32
- Hause B, Hause G, Pechan P, Vanlammeren AAM** (1993) Cytoskeletal Changes and Induction of Embryogenesis in Microspore and Pollen Cultures of *Brassica-Napus* L. *Cell Biology International* **17**: 153-168
- Hema BP, Murthy HN** (2008) Improvement of in vitro androgenesis in niger using amino acids and polyamines. *Biologia Plantarum* **52**: 121-125
- Hiraga S, Sasaki K, Ohashi Y, Matsui H, Ito H** (2001) A large family of class III plant peroxidases. *Plant and Cell Physiology* **42**: 462-468
- Ho KM, Jones GE** (1980) Mingo Barley. *Canadian Journal of Plant Science* **60**: 279-280
- Hoekstra S, Vanzijderveld MH, Heidekamp F, Vandermark F** (1993) Microspore Culture of *Hordeum-Vulgare* L - the Influence of Density and Osmolality. *Plant Cell Reports* **12**: 661-665
- Hoekstra S, Vanzijderveld MH, Louwerse JD, Heidekamp F, Vandermark F** (1992) Anther and Microspore Culture of *Hordeum-Vulgare* L Cv Igri. *Plant Science* **86**: 89-96
- Hofer M, Touraev A, Heberle-Bors E** (1999) Induction of embryogenesis from isolated apple microspores. *Plant Cell Reports* **18**: 1012-1017
- Honys D, Reňák D, Twell D** (2006) Male gametophyte development and function. In S da Silva, ed, *Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology: advances and topical issues* Vol 1. Global Science Books, London, pp 76-87
- Honys D, Twell D** (2004) Transcriptome analysis of haploid male gametophyte development in *Arabidopsis*. *Genome biology* **5**: R85
- Hosp J, de Faria Maraschin S, Touraev A, Boutilier K** (2007) Functional genomics of microspore embryogenesis. *Euphytica* **158**: 275-285
- Hu GZ, Ronne H** (1994) Yeast Btf3 Protein Is Encoded by Duplicated Genes and Inhibits the Expression of Some Genes in-Vivo. *Nucleic Acids Research* **22**: 2740-2743
- Hu T, Kasha KJ** (1997) Improvement of isolated microspore culture of wheat (*Triticum aestivum* L) through ovary co-culture. *Plant Cell Reports* **16**: 520-525
- Huang B** (1986) Ultrastructural aspects of pollen embryogenesis in *Hordeum*, *Triticum* and *Paeonia*. In H Hu, Y Hongyuan, eds, *Haploids of higher plants in vitro*. Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg, pp 91-117
- Huang B, Bird S, Kemble R, Simmonds D, Keller W, Miki B** (1990) Effects of Culture Density, Conditioned Medium and Feeder Cultures on Microspore Embryogenesis in *Brassica-Napus* L Cv Topas. *Plant Cell Reports* **8**: 594-597
- Huang CN, Cornejo MJ, Bush DS, Jones RL** (1986) Estimating Viability of Plant-Protoplasts Using Double and Single Staining. *Protoplasma* **135**: 80-87
-

- Imamura J, Harada H** (1981) Stimulation of Tobacco Pollen Embryogenesis by Anaerobic Treatments. *Zeitschrift Fur Pflanzenphysiologie* **103**: 259-263
- Immonen S, Anttila H** (1999) Cold pretreatment to enhance green plant regeneration from rye anther culture. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* **57**: 121-127
- Immonen S, Anttila H** (2000) Media composition and anther plating for production of androgenetic green plants from cultivated rye (*Secale cereale* L.). *Journal of Plant Physiology* **156**: 204-210
- Indrianto A, Heberle-Bors E, Touraev A** (1999) Assessment of various stresses and carbohydrates for their effect on the induction of embryogenesis in isolated wheat microspores. *Plant Science* **143**: 71-79
- Jaattela M, Wissing D, Kokholm K, Kallunki T, Egeblad M** (1998) Hsp70 exerts its anti-apoptotic function downstream of caspase-3-like proteases. *Embo Journal* **17**: 6124-6134
- Jacquard C, Mazeyrat-Gourbeyre F, Devaux P, Boutilier K, Baillieux F, Clement C** (2009) Microspore embryogenesis in barley: anther pre-treatment stimulates plant defence gene expression. *Planta* **229**: 393-402
- Johnson PE, Patron NJ, Bottrill AR, Dinges JR, Fahy BF, Parker ML, Waite DN, Denyer K** (2003) A low-starch barley mutant, Riso 16, lacking the cytosolic small subunit of ADP-glucose pyrophosphorylase, reveals the importance of the cytosolic isoform and the identity of the plastidial small subunit. *Plant Physiology* **131**: 684-696
- Kaplan F, Kopka J, Haskell DW, Zhao W, Schiller KC, Gatzke N, Sung DY, Guy CL** (2004) Exploring the temperature-stress metabolome of Arabidopsis. *Plant Physiology* **136**: 4159-4168
- Kasha KJ, Letarte J, Simion E, Miner M** (2006) Arabinogalactans and arabinogalactan-proteins induce embryogenesis in wheat (*Triticum aestivum* L.) microspore culture (vol 24, pg 691, 2006). *Plant Cell Reports* **25**: 877-877
- Kasha KJ, Shim YS** (2003) The influence of pretreatment on cell stage progression and the time of DNA synthesis in barley (*Hordeum vulgare* L.) uninucleate microspores. *Plant Cell Reports* **21**: 1065-1071
- Kasha KJ, Simion E, Oro R, Yao QA, Hu TC, Carlson AR** (2001) An improved in vitro technique for isolated microspore culture of barley. *Euphytica* **120**: 379-385
- Kaspar S, Weier D, Weschke W, Mock HP, Matros A** (2010) Protein analysis of laser capture micro-dissected tissues revealed cell-type specific biological functions in developing barley grains. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **398**: 2883-2893
- Kathiresan A, Tung P, Chinnappa CC, Reid DM** (1997) gamma-aminobutyric acid stimulates ethylene biosynthesis in sunflower. *Plant Physiology* **115**: 129-135
- Kaydamov K** (1999) Isolierung und Charakterisierung von cDNA-Klonen aus frühen Stadien der somatischen Embryogenese von *Nicotiana plumbaginifolia*. Martin-Luther Universität, Halle
- Kelley RY, Zipf AE, Wesenberg DE, Sharma GC** (2002) Putrescine-enhanced somatic embryos and plant numbers from elite oat (*Avena* spp. L.) and reciprocal crosses. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* **38**: 508-512
- Kennedy RA, Rumpho ME, Fox TC** (1992) Anaerobic Metabolism in Plants. *Plant Physiology* **100**: 1-6
- Kim ST, Kang YH, Wang YM, Wu JN, Park ZY, Rakwal R, KumarAgrawal G, Lee SY, Kang KY** (2009) Secretome analysis of differentially induced proteins in rice
-

- suspension-cultured cells triggered by rice blast fungus and elicitor. *Proteomics* **9**: 1302-1313
- Kinnersley AM, Turano FJ** (2000) Gamma aminobutyric acid (GABA) and plant responses to stress. *Critical Reviews in Plant Sciences* **19**: 479-509
- Köhler F, Wenzel G** (1985) Regeneration of Isolated Barley Microspores in Conditioned Media and Trials to Characterize the Responsible Factor. *Journal of Plant Physiology* **121**: 181-191
- Koltunow AM, Grossniklaus U** (2003) Apomixis: a developmental perspective. *Annual review of plant biology* **54**: 547-574
- Kumar HGA, Ravishankar BV, Murthy HN** (2004) The influence of polyamines on androgenesis of *Cucumis sativus* L. *European Journal of Horticultural Science* **69**: 201-205
- Kumlehn J, Loerz H** (1999) Monitoring sporophytic development of individual microspores of barley (*Hordeum vulgare* L.). In C Clement, E Pacini, J Audran, eds, *Anther and pollen: from biology to biotechnology*. Springer, Berlin Heidelberg New, pp 183–189
- Kumlehn J, Serazetdinova L, Hensel G, Becker D, Loerz H** (2006) Genetic transformation of barley (*Hordeum vulgare* L.) via infection of androgenetic pollen cultures with *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Biotechnology Journal* **4**: 251-261
- Kunze I, Kunze G, Broker M, Manteuffel R, Meins F, Muntz K** (1998) Evidence for secretion of vacuolar alpha-mannosidase, class I chitinase, and class I beta-1,3-glucanase in suspension cultures of tobacco cells. *Planta* **205**: 92-99
- Kusano T, Berberich T, Tateda C, Takahashi Y** (2008) Polyamines: essential factors for growth and survival. *Planta* **228**: 367-381
- Kwon HK, Yokoyama R, Nishitani K** (2005) A proteomic approach to apoplastic proteins involved in cell wall regeneration in protoplasts of *Arabidopsis* suspension-cultured cells. *Plant Cell Physiol.* **46**: 843-857
- Lantos C, Juhasz AG, Somogyi G, Otvos K, Vagi P, Mihaly R, Kristof Z, Somogyi N, Pauk J** (2009) Improvement of isolated microspore culture of pepper (*Capsicum annuum* L.) via co-culture with ovary tissues of pepper or wheat. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* **97**: 285-293
- Letarte J, Simion E, Miner M, Kasha KJ** (2006) Arabinogalactans and arabinogalactan-proteins induce embryogenesis in wheat (*Triticum aestivum* L.) microspore culture. *Plant Cell Reports* **24**: 691-698
- Li H, Devaux P** (2001) Enhancement of microspore culture efficiency of recalcitrant barley genotypes. *Plant Cell Reports* **20**: 475-481
- Linsmaier EM, Skoog F** (1965) Organic Growth Factor Requirements of Tobacco Tissue Cultures. *Physiol Plant* **18**: 100-127
- Lippmann R, Kaspar S, Rutten T, Melzer M, Kumlehn J, Matros A, Mock HP** (2009) Protein and Metabolite Analysis Reveals Permanent Induction of Stress Defense and Cell Regeneration Processes in a Tobacco Cell Suspension Culture. *International Journal of Molecular Sciences* **10**: 3012-3032
- Lisec J, Schauer N, Kopka J, Willmitzer L, Fernie AR** (2006) Gas chromatography mass spectrometry-based metabolite profiling in plants. *Nature Protocols* **1**: 387-396
- Liu W, Zheng MY, Konzak CF** (2002) Improving green plant production via isolated microspore culture in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Cell Reports* **20**: 821-824
-

- 
- Lu RJ, Wang YF, Sun YF, Shan LL, Chen PD, Huang JH** (2008) Improvement of isolated microspore culture of barley (*Hordeum vulgare* L.): the effect of floret co-culture. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* **93**: 21-27
- Maliga P, Szbrezno.A, Marton L** (1973) Streptomycin-Resistant Plants from Callus Culture of Haploid Tobacco. *Nature New Biol.* **244**: 29-30
- Maluszynski M, Kasha K, Forster B, Szarejko I** (2003) Doubled Haploid Production in Crop Plants - A Manual, Kluwer, Dordrecht/Boston/London
- Maraschin SD, Lamers GEM, de Pater BS, Spaink HP, Wang M** (2003) 14-3-3 isoforms and pattern formation during barley microspore embryogenesis. *Journal of Experimental Botany* **54**: 1033-1043
- Maraschin SD, Vennik M, Lamers GEM, Spaink HP, Wang M** (2005) Time-lapse tracking of barley androgenesis reveals position-determined cell death within pro-embryos. *Planta* **220**: 531-540
- Maraschin SDF, Caspers M, Potokina E, Wulfert F, Graner A, Spaink HP, Wang M** (2006) CDNA array analysis of stress-induced gene expression in barley androgenesis. *Physiologia Plantarum* **127**: 535-550
- Maraschin SF, de Priester W, Spaink HP, Wang M** (2005) Androgenic switch: an example of plant embryogenesis from the male gametophyte perspective. *Journal of Experimental Botany* **56**: 1711-1726
- Marina M, Maiale SJ, Rossi FR, Romero MF, Rivas EI, Garriz A, Ruiz OA, Pieckenstain FL** (2008) Apoplastic polyamine oxidation plays different roles in local responses of tobacco to infection by the necrotrophic fungus *Sclerotinia sclerotiorum* and the biotrophic bacterium *Pseudomonas viridiflava*. *Plant Physiol.* **147**: 2164-2178
- Markesich DC, Gajewski KM, Nazimiec ME, Beckingham K** (2000) bicaudal encodes the Drosophila beta NAC homolog, a component of the ribosomal translational machinery. *Development* **127**: 559-572
- Martinez M, Cambra I, Carrillo L, Diaz-Mendoza M, Diaz I** (2009) Characterization of the Entire Cystatin Gene Family in Barley and Their Target Cathepsin L-Like Cysteine-Proteases, Partners in the Hordein Mobilization during Seed Germination. *Plant Physiology* **151**: 1531-1545
- Matros A, Kaspar S, Witzel K, Mock HP** (2011) Recent progress in liquid chromatography-based separation and label-free quantitative plant proteomics. *Phytochemistry* **72**: 963-974
- Matsubayashi Y, Sakagami Y** (1996) Phytosulfokine, sulfated peptides that induce the proliferation of single mesophyll cells of *Asparagus officinalis* L. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**: 7623-7627
- Matthys-Rochon E, Borderies G, le Bechec M, Rossignol M, Lafitte C, Le Deunff E, Beckert M, Dumas C** (2004) Characterization of proteins secreted during maize microspore culture: arabinogalactan proteins (AGPs) stimulate embryo development. *European Journal of Cell Biology* **83**: 205-212
- Matveeva NP, Starostenko NV, Tukeeva MI, Andreyuk DA, Blintsov AN, Ermakov IP** (1998) Development of isolated tobacco microspores as affected by extracellular factors secreted in vitro. *Russian Journal of Plant Physiology* **45**: 628-632
- Meijer EGM, Brown DCW** (1987) Role of Exogenous Reduced Nitrogen and Sucrose in Rapid High-Frequency Somatic Embryogenesis in *Medicago-Sativa*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* **10**: 11-19
-

- Mejza SJ, Morgant V, Dibona DE, Wong JR** (1993) Plant-Regeneration from Isolated Microspores of *Triticum-Aestivum*. *Plant Cell Reports* **12**: 149-153
- Mordhorst AP, Lorz H** (1993) Embryogenesis and Development of Isolated Barley (*Hordeum-Vulgare* L) Microspores Are Influenced by the Amount and Composition of Nitrogen-Sources in Culture Media. *Journal of Plant Physiology* **142**: 485-492
- Mordhorst AP, Toonen MAJ, deVries SC** (1997) Plant embryogenesis. *Critical Reviews in Plant Sciences* **16**: 535-576
- Morgenthal K, Wienkoop S, Wolschin F, Weckwerth W** (2007) Integrative profiling of metabolites and proteins: improving pattern recognition and biomarker selection for systems level approaches. In W Weckwerth, ed, *Metabolomics: Methods and Protocols*. Humana Press Inc, Totowa, pp 57-75
- Morrison RA, Evans DA** (1988) Haploid Plants from Tissue-Culture - New Plant-Varieties in a Shortened Time Frame. *Bio-Technology* **6**: 684-690
- Muyuan Z, Abing X, Miaobao Y, Chunnong H, Zhilong Y, Linji W, Jianjun Y** (1990) Effects of amino acids on callus differentiation in barley anther culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **22**: 201-204
- Niittyla T, Messerli G, Trevisan M, Chen J, Smith AM, Zeeman SC** (2004) A previously unknown maltose transporter essential for starch degradation in leaves. *Science* **303**: 87-89
- Nitsch C, Norreel B** (1973) Effect of Thermal Shock on Embryogenic Power of Pollen of *Datura-Innoxia* Cultured in Anther or Isolated from Anther. *Comptes Rendus Hebdomadaires Des Seances De L Academie Des Sciences Serie D* **276**: 303-&
- Nitsch JP, Nitsch C** (1969) Haploid Plants from Pollen Grains. *Science* **163**: 85-&
- Norstog K** (1967) Studies on Survival of Very Small Barley Embryos in Culture. *Bulletin of the Torrey Botanical Club* **94**: 223-&
- Nuutila AM, Hämäläinen J, Mannonen L** (2000) Optimization of media nitrogen and copper concentrations for regeneration of green plants from polyembryogenic cultures of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant Science* **151**: 85-92
- Obert B, Barnabas B** (2004) Colchicine induced embryogenesis in maize. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* **77**: 283-285
- Oh IS, Park AR, Bae MS, Kwon SJ, Kim YS, Lee JE, Kang NY, Lee SM, Cheong H, Park OK** (2005) Secretome analysis reveals an Arabidopsis lipase involved in defense against *Alternaria brassicicola*. *Plant Cell* **17**: 2832-2847
- Okushima Y, Koizumi N, Kusano T, Sano H** (2000) Secreted proteins of tobacco cultured BY2 cells: identification of a new member of pathogenesis-related proteins. *Plant Molecular Biology* **42**: 479-488
- Oliva M, Theiler G, Zamocky M, Koua D, Margis-Pinheiro M, Passardi F, Dunand C** (2009) PeroxiBase: a powerful tool to collect and analyse peroxidase sequences from Viridiplantae. *Journal of Experimental Botany* **60**: 453-459
- Olsen F** (1987) Induction of microspore embryogenesis in cultured anthers of *hordeum vulgare*. The effects of ammonium nitrate, glutamine and asparagine as nitrogen sources. *Carlsberg Research Communications* **52**: 393-404
- Ouedraogo JT, St-Pierre CA, Collin J, Rioux S, Comeau A** (1998) Effect of amino acids, growth regulators and genotype on androgenesis in barley. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* **53**: 59-66
- Pacini E** (1996) Types and meaning of pollen carbohydrate reserves. *Sexual Plant Reproduction* **9**: 362-366
-

- Palanivelu R, Brass L, Edlund AF, Preuss D** (2003) Pollen tube growth and guidance is regulated by POP2, an Arabidopsis gene that controls GABA levels. *Cell* **114**: 47-59
- Papadakis AK, Roubelakis-Angelakis KA** (2005) Polyamines inhibit NADPH oxidase-mediated superoxide generation and putrescine prevents programmed cell death induced by polyamine oxidase-generated hydrogen peroxide. *Planta* **220**: 826-837
- Papadakis AK, Siminis CI, Roubelakis-Angelakis KA** (2001) Reduced activity of antioxidant machinery is correlated with suppression of totipotency in plant protoplasts. *Plant Physiology* **126**: 434-444
- Parenicova L, de Folter S, Kieffer M, Horner DS, Favalli C, Busscher J, Cook HE, Ingram RM, Kater MM, Davies B, Angenent GC, Colombo L** (2003) Molecular and phylogenetic analyses of the complete MADS-box transcription factor family in Arabidopsis: New openings to the MADS world. *Plant Cell* **15**: 1538-1551
- Parthun MR, Mangus DA, Jaehning JA** (1992) The Egd1 Product, a Yeast Homolog of Human Btf3, May Be Involved in Gal4-DNA Binding. *Molecular and Cellular Biology* **12**: 5683-5689
- Passardi F, Penel C, Dunand C** (2004) Performing the paradoxical: how plant peroxidases modify the cell wall. *Trends in Plant Science* **9**: 534-540
- Pauk J, Puolimatka M, Toth KL, Monostori T** (2000) In vitro androgenesis of triticales in isolated microspore culture. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* **61**: 221-229
- Pecinka A, Dinh HQ, Baubec T, Rosa M, Lettner N, Mittelsten Scheid O** (2010) Epigenetic regulation of repetitive elements is attenuated by prolonged heat stress in Arabidopsis. *The Plant cell* **22**: 3118-3129
- Pinal CS, Tobin AJ** (1998) Uniqueness and redundancy in GABA production. *Perspectives on Developmental Neurobiology* **5**: 109-118
- Pulido A, Hernando A, Bakos F, Mendez E, Devic M, Barnabas B, Olmedilla A** (2006) Hordeins are expressed in microspore-derived embryos and also during male gametophytic and very early stages of seed development. *Journal of Experimental Botany* **57**: 2837-2846
- Rajesh MK, Radha E, Karun A, Parthasarathy VA** (2003) Plant regeneration from embryo-derived callus of oil palm - the effect of exogenous polyamines. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* **75**: 41-47
- Ramirez C, Chiancone B, Testillano PS, Garcia-Fojeda B, Germana MA, Risueno MC** (2003) First embryogenic stages of Citrus microspore-derived embryos. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica* **45**: 53-58
- Rashid A, Siddiqui AW, Reinert J** (1982) Sub-Cellular Aspects of Origin and Structure of Pollen Embryos of Nicotiana. *Protoplasma* **113**: 202-208
- Reinert J, Tazawa M, Semenoff S** (1967) Nitrogen Compounds as Factors of Embryogenesis in vitro. *Nature* **216**: 1215-1216
- Richards DE, Peng JR, Harberd NP** (2000) Plant GRAS and metazoan STATs: one family? *Bioessays* **22**: 573-577
- Riley R** (1974) The Status of haploid research in *In* K Kasha, ed, *Proceeding of the First International Symposium on Haploids in Higher Plants: Advances and Potential*. Univ. Guelph, Guelph, Canada, pp pp 3-9
- Ryan CA, Pearce G, Scheer J, Moura DS** (2002) Polypeptide hormones. *Plant Cell* **14**: S251-S264
- Sangwan RS, Sangwan-Norreel BS** (1996) Cytological and Biochemical Aspects of in vitro Androgenesis in Higher Plants. *In* JS Mohan, SK Sopyry, RE Veilleux, eds, *In vitro*

- Haploid Production in Higher Plants: Fundamental Aspects and Methods, Vol Volume 1. Springer, pp 95-106
- Schell J** (1997) Interdependence of pH, malate concentration, and calcium and magnesium concentrations in the xylem sap of beech roots. *Tree Physiology* **17**: 479-483
- Schreiber DN, Bantin J, Dresselhaus T** (2004) The MADS box transcription factor ZmMADS2 is required for anther and pollen maturation in maize and accumulates in apoptotic bodies during anther dehiscence. *Plant Physiology* **134**: 1069-1079
- Shariatpanahi ME, Bal U, Heberle-Bors E, Touraev A** (2006) Stresses applied for the re-programming of plant microspores towards in vitro embryogenesis. *Physiologia Plantarum* **127**: 519-534
- Shelp BJ, Bown AW, McLean MD** (1999) Metabolism and functions of gamma-aminobutyric acid. *Trends in Plant Science* **4**: 446-452
- Silva JC, Denny R, Dorschel C, Gorenstein MV, Li GZ, Richardson K, Wall D, Geromanos SJ** (2006) Simultaneous qualitative and quantitative analysis of the *Escherichia coli* proteome: a sweet tale. *Molecular & cellular proteomics : MCP* **5**: 589-607
- Silveira V, Floh EIS, Handro W, Guerra MP** (2004) Effect of plant growth regulators on the cellular growth and levels of intracellular protein, starch and polyamines in embryogenic suspension cultures of *Pinus taeda*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* **76**: 53-60
- Simmonds DH, Keller WA** (1999) Significance of preprophase bands of microtubules in the induction of microspore embryogenesis of *Brassica napus*. *Planta* **208**: 383-391
- Smith AM, Zeeman SC, Smith SM** (2005) Starch degradation. *Annual Review of Plant Biology* **56**: 73-98
- Smyth G** (2005) Bioinformatics and Computational Biology Solutions Using R and Bioconductor Book Series Title: Statistics for Biology and Health. *In* R Gentleman, VJ Carey, W Huber, RA Irizarry, S Dudoit, eds, *Limma: Linear Models for Microarray Data Book*. Springer, New York, pp 397-420
- Solis MT, Pintos B, Prado MJ, Bueno MA, Raska I, Risueno MC, Testillano PS** (2008) Early markers of in vitro microspore reprogramming to embryogenesis in olive (*Olea europaea* L.). *Plant Science* **174**: 597-605
- Stevenson JM, Pepera IY, Heilmann I, Persson S, Boss WF** (2000) Inositol signaling and plant growth. *Trends Plant Sci.* **5**: 252-258
- Stuart DA, Strickland SG** (1984) Somatic Embryogenesis from Cell-Cultures of *Medicago-Sativa* L .1. The Role of Amino-Acid Additions to the Regeneration Medium. *Plant Science Letters* **34**: 165-174
- Stuart R, Street HE** (1969) Studies on Growth in Culture of Plant Cells .4. Initiation of Division in Suspensions of Stationary-Phase Cells of *Acer Pseudoplatanus* L. *Journal of Experimental Botany* **20**: 556-&
- Sunderland N, Xu ZH** (1982) Shed Pollen Culture in *Hordeum-Vulgare*. *Journal of Experimental Botany* **33**: 1086-1095
- Sung ZR, Okimoto R** (1981) Embryonic Proteins in Somatic Embryos of Carrot. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America-Biological Sciences* **78**: 3683-3687
- Taji T, Ohsumi C, Iuchi S, Seki M, Kasuga M, Kobayashi M, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K** (2002) Important roles of drought- and cold-inducible genes for
-

- galactinol synthase in stress tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* **29**: 417-426
- Telmer CA, Newcomb W, Simmonds DH** (1993) Microspore Development in Brassica-Napus and the Effect of High-Temperature on Division *In vivo* and *In vitro*. *Protoplasma* **172**: 154-165
- Telmer CA, Newcomb W, Simmonds DH** (1995) Cellular-Changes during Heat-Shock Induction and Embryo Development of Cultured Microspores of Brassica-Napus Cv Topas. *Protoplasma* **185**: 106-112
- Thimm O, Blasing O, Gibon Y, Nagel A, Meyer S, Kruger P, Selbig J, Muller LA, Rhee SY, Stitt M** (2004) MAPMAN: a user-driven tool to display genomics data sets onto diagrams of metabolic pathways and other biological processes. *Plant Journal* **37**: 914-939
- Thompson K** (1972) Oil-seed rape, In Reports of the Plant Breeding Institute. *In*. Cambridge University Press, Cambridge pp 94-96
- Tiainen T** (1992) The Role of Ethylene and Reducing Agents on Anther Culture Response of Tetraploid Potato (*Solanum-Tuberosum* L). *Plant Cell Reports* **10**: 604-607
- Touraev A, Ilham A, Vicente O, HeberleBors E** (1996) Stress-induced microspore embryogenesis in tobacco: An optimized system for molecular studies. *Plant Cell Reports* **15**: 561-565
- Touraev A, Indrianto A, Wratschko I, Vicente O, HeberleBors E** (1996) Efficient microspore embryogenesis in wheat (*Triticum aestivum* L) induced by starvation at high temperature. *Sexual Plant Reproduction* **9**: 209-215
- Touraev A, Vicente O, HeberleBors E** (1997) Initiation of microspore embryogenesis by stress. *Trends in Plant Science* **2**: 297-302
- Tran HT, Plaxton WC** (2008) Proteomic analysis of alterations in the secretome of *Arabidopsis thaliana* suspension cells subjected to nutritional phosphate deficiency. *Proteomics* **8**: 4317-4326
- Tsuwamoto R, Fukuoka H, Takahata Y** (2007) Identification and characterization of genes expressed in early embryogenesis from microspores of *Brassica napus*. *Planta* **225**: 641-652
- Turesson S, Ljungberg A, Johansson N, Karlsson KE, Suijs LW, Josset JP** (2000) Large-scale production of wheat and triticale double haploids through the use of a single-anther culture method. *Plant Breeding* **119**: 455-459
- Twell D** (1994) The diversity and regulation of gene expression in the pathway of male gametophyte development. *In* RJ Scott, AD Stead, eds, *Molecular and cellular aspects of plant reproduction*, Vol 55. Cambridge University Press, Cambridge, pp 83-135
- van Bergen S, Kottenhagen MJ, van der Meulen RM, Wang M** (1999) The role of abscisic acid in induction of androgenesis: A comparative study between *Hordeum vulgare* L-cvs. Igri and Digger. *Journal of Plant Growth Regulation* **18**: 135-143
- Van Engelen FA, De Vries SC** (1992) Extracellular proteins in plant embryogenesis. *Trends in Genetics* **8**: 66-70
- Van Hengel AJ, Van Kammen A, De Vries SC** (2002) A relationship between seed development, Arabinogalactan-proteins (AGPs) and the AGP mediated promotion of somatic embryogenesis. *Physiologia Plantarum* **114**: 637-644
- Verelst W, Twell D, de Folter S, Immink R, Saedler H, Munster T** (2007) MADS-complexes regulate transcriptome dynamics during pollen maturation. *Genome Biology* **8**
-

- 
- Vernoud V, Horton AC, Yang ZB, Nielsen E** (2003) Analysis of the small GTPase gene superfamily of Arabidopsis. *Plant Physiology* **131**: 1191-1208
- Vrinten PL, Nakamura T, Kasha KJ** (1999) Characterization of cDNAs expressed in the early stages of microspore embryogenesis in barley (*Hordeum vulgare*) L. *Plant Molecular Biology* **41**: 455-463
- Walters DR** (2003) Polyamines and plant disease. *Phytochemistry* **64**: 97-107
- Wang M, van Bergen S, Van Duijn B** (2000) Insights into a key developmental switch and its importance for efficient plant breeding. *Plant Physiology* **124**: 523-530
- Warren GS, Fowler MW** (1981) Physiological Interactions during the Initial-Stages of Embryogenesis in Cultures of *Daucus-Carota* L. *New Phytologist* **87**: 481-486
- Wheeler JI, Irving HR** (2010) Evolutionary advantages of secreted peptide signalling molecules in plants. *Functional Plant Biology* **37**: 382-394
- Widholm JM** (1972) Use of Fluorescein Diacetate and Phenosafranine for Determining Viability of Cultured Plant-Cells. *Stain Technology* **47**: 189-&
- Wink M** (1994) The Cell-Culture Medium - a Functional Extracellular Compartment of Suspension-Cultured Cells. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* **38**: 307-319
- Xu ZH, Huang B, Sunderland N** (1981) Culture of Barley Anthers in Conditioned Media. *Journal of Experimental Botany* **32**: 767-778
- Xu ZH, Sunderland N** (1981) Glutamine, Inositol and Conditioning Factor in the Production of Barley Pollen Callus In vitro. *Plant Science Letters* **23**: 161-168
- Yamamoto Y, Nishimura M, Hara-Nishimura I, Noguchi T** (2003) Behavior of vacuoles during microspore and pollen development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant & cell physiology* **44**: 1192-1201
- Yang KS, Kim HS, Jin UH, Lee SS, Park JA, Lim YP, Pai HS** (2007) Silencing of NbBTF3 results in developmental defects and disturbed gene expression in chloroplasts and mitochondria of higher plants. *Planta* **225**: 1459-1469
- Yoda H, Fujimura K, Takahashi H, Munemura I, Uchimiya H, Sano H** (2009) Polyamines as a common source of hydrogen peroxide in host- and nonhost hypersensitive response during pathogen infection. *Plant Mol. Biol.* **70**: 103-112
- Yoda H, Yamaguchi Y, Sano H** (2003) Induction of hypersensitive cell death by hydrogen peroxide produced through polyamine degradation in tobacco plants. *Plant Physiol.* **132**: 1973-1981
- Zablackis E, Huang J, Muller B, Darvill AG, Albersheim P** (1995) Structure of Plant-Cell Walls .34. Characterization of the Cell-Wall Polysaccharides of *Arabidopsis-Thaliana* Leaves. *Plant Physiology* **107**: 1129-1138
- Zaki MAM, Dickinson HG** (1991) Microspore-Derived Embryos in Brassica - the Significance of Division Symmetry in Pollen Mitosis-I to Embryogenic Development. *Sexual Plant Reproduction* **4**: 48-55
- Zheng MY, Liu W, Weng Y, Polle E, Konzak CF** (2001) Culture of freshly isolated wheat (*Triticum aestivum* L.) microspores treated with inducer chemicals. *Plant Cell Reports* **20**: 685-690
- Zheng XM, Black D, Chambon P, Egly JM** (1990) Sequencing and Expression of Complementary-DNA for the General Transcription Factor-Btf3. *Nature* **344**: 556-559
- Zheng XM, Moncollin V, Egly JM, Chambon P** (1987) A General Transcription Factor Forms a Stable Complex with Rna Polymerase-B(Ii). *Cell* **50**: 361-368
-

## 7 Abkürzungsverzeichnis

AGP	Arabinogalaktanprotein
D N A	Desoxyribonukleinsäure
DCI	Dansylchlorid
EE	Esigsäureethylester
ELS	Embryostruktur
EM	Vergößerte Mikrospore
EMRT	Exakte Masse Retentionzeit Paare
EtOH	Ethanol
Gc	Generative Zelle
GC-MS	Gaschromatographie-Massenspektrometrie
GDC	Glukuronsäure Decarboxylase
GFP	Grün-Fluoreszierendes-Protein
HMW	<i>high molecular weight fraction</i>
	Hochleistungsflüssig-
HPLC	Flüssigchromatographie
HSP	Hitzeschockprotein
HXK	Hexokinase
IAA	Indolessigsäure
IMS	induzierte Mikrospore
KPB Medium	Kumlehns Barley Pollen Medium
LC	Flüssigchromatographie
LMW	<i>low molecular weight fraction</i>
MCS	Multizelluläre Struktur
MeCN	Acetonitril
MeOH	Methanol
MS	Massenspektrometrie
NAA	Naphtalensäure
NLS	Kernlokalisierungssignal
PCD	Programmierter Zelltod
PDA	Photodiodenarray
Pollenembryogenese	Pollenembryogenese
RM	Wurzelmeristem
RMS	reguläre Mikrospore
RNA	Ribonukleinsäure
SC	Scutellum.
SEM	Sprossapikalmeristem
SM	star like Mikrospore,
SPE	Festphasenextraktion
TF	Transkriptionsfaktor
UPLC	<i>Ultrapformance</i> -Flüssigchromatographie
V	Vakuole

## 8 Curriculum vitae

### ANGABEN ZUR PERSON

---

Name	Lippmann
Vorname	Rico
Geburtstag	22.01.1983
Geburtsort	Lichtenstein/Sa.
Staatsangehörigkeit	Deutsch
Mail	lippmann@ipk-gatersleben.de

### AUSBILDUNG /WISSENSCHAFTLICHER WERDEGANG

---

01/2008-01/2012	Wissenschaftlicher Mitarbeiter (Doktorand) und Anfertigung der Promotion am Leibniz Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung, Gatersleben, Abteilung Physiologie und Zellbiologie, AG Angewandte Biochemie
09/2007-11/2007	Wissenschaftlicher Mitarbeiter am John Innes Centre, Norwich UK, (Dept. Metabolic Biology bei Dr. Stanislav Kopriva)
07/2007-08/2007	Wissenschaftlicher Mitarbeiter, Martin-Luther-University Halle-Wittenberg, Abt. Ökologische Pflanzenbiochemie
2006-2007	Diplomarbeit an der Naturwissenschaftlichen Fakultät I – Biowissenschaften im Institut Biochemie/Biotechnologie, Abt. Ökologische Pflanzenbiochemie : „Vergleich der Metall- und Thiolpeptidhomöostase in verschiedenen Wildtypstämmen von <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> DANGEARD unter Schwermetallstress“, „Sehr Gut“ (1,2)
2002-2007	Studium der Biochemie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, „Gut“ (1,7)
2001-2002	Wehrdienst im Führungsunterstützungsregiment 70
2001	Erlangen der allg. Hochschulreife (Abitur) Abschluss „Gut“
1993-2001	Gymnasium Prof. Dr. Max Schneider in Lichtenstein

---

### **Publikationen**

Riewe D., Koochi M., Lisek J., Pfeiffer M., **Lippmann R.**, Willmitzer L., Altmann, T: *A tyrosine aminotransferase involved in tocopherol synthesis in Arabidopsis.*, The Plant Journal (2012), submitted

**Lippmann, R.**, Kaspar, S., Rutten, T., Melzer, M., Kumlehn, J., Matros, A., Mock, H.-P.: *Protein and Metabolite Analysis Reveals Permanent Induction of Stress Defense and Cell Regeneration Processes in a Tobacco Cell Suspension Culture.*, Int. J. Mol. Sci. (2009), 10, 3012-3032

Bräutigam A., **Lippmann R.**, Krauss G.-J., Wesenberg D.: “*Cadmium induced thiol peptides in Chlamydomonas reinhardtii strains*” in Sulfur Metabolism in Plants - Regulatory Aspects Significance of Sulfur in the food chain, Agriculture and the Environment, Backhuys Publishers, Leiden Margraf Publishers, Weikersheim, 2009, pp. 273-276, ISBN 978-3-8236-1547-7

### **Vorträge**

**Lippmann R.**, Witzel K., Kaspar, S., Matros, A., Mock, H.-P.: v.v. H-P.Mock „*Plant proteomics to support breeding and biotechnological applications*“ - 3rd International Symposium “Frontiers in Agriculture Proteome Research”, Tsukuba, Japan, 08.-10.11.2011

**Lippmann, R.**, Matros, A., Kumlehn, J. & Mock H.-P.: „*Identification of Potential Feeder Substances Promote Pollen Embryogenesis (Pollenembryogenese) from the Secretome of Pistils*“ – Plant Science Student Conference, Gatersleben, 15.-18.06.2010

**Lippmann, R.**, Matros, A. & Mock H.-P.: „*Investigation of Scopolin Accumulation in different subpopulations from a tobacco cell suspension culture*“, Plant Science Student Conference, Halle, 23.-26.06.2009

**Lippmann R.**, Mock H.-P.: „*Stress-related metabolites in cells and culture media of a tobacco cell suspension culture*“ – 6. Treffen der Deutschen Botanischen Gesellschaft: “Sektion Naturstoffe”, Fulda, 30.03.-01.04.2009

Bräutigam, A., **Lippmann, R.**, Krauß, G. J. & Wesenberg, D.: v.v. D. Wesenberg *Cadmium induced thiol peptides in Chlamydomonas reinhardtii strains.* - 7th Workshop on Sulfur Metabolism in Plants, Warschau (Polen), 13.-16. Mai 2008

---

---

Bräutigam, A., **Lippmann, R.**, Krauß, G. J. & Wesenberg, D.: v.v. A. Bräutigam „*Cadmium induced thiol peptides in Chlamydomonas reinhardtii strains.*“ - Pau (Frankreich), 11. Juli 2008

### **Poster**

**Lippmann, R.**, & H.-P. Mock: „*Euphorbia lathyris, a potential crop for third generation biofuels – A proteomic approach*“ – 11. GABI Status Seminar, Potsdam/Germany, 15.-17.03.2011

**Lippmann, R.**, & H.-P. Mock: „*Euphorbia lathyris, a potential crop for third generation biofuels – A proteomic approach*“ Meeting COST Action FA0603, Dijon/France, 25.-27.05.2011

**Lippmann, R.**, Matros, A., Hensel G., Kumlehn, J. & H.-P. Mock: „*Purification of feeder compounds stimulating pollen embryogenesis*“ -11. GABI Status Seminar, Potsdam/Germany, 15.-17.03.2011

Hensel, G., Bäumlein, H., Mock, H.-P., Melzer, M., Altschmied, L., Daghma, D.S., Gryczka, C., Koszegi, D., **Lippmann, R.**, Matros, A., Plasun, K. & Kumlehn, J.: „*GABI-Pollenembryogenese a project aiming to elucidate initial mechanisms of pollen embryogenesis*“ – Institutstag IPK, Gatersleben, 04.-05.10.2010

**Lippmann, R.**, Kaspar, S., Matros, A., & Mock, H.-P.: “*Comparitive protein analysis revealed specific functions in two subpopulations from a tobacco root cell culture*” – Int. Conference on Proteomics in Plants, Microorganisms and Environment, Luxemburg, 18.-20.10.2010

**Lippmann, R.**, Matros, A., Kumlehn, J. & Mock, H.-P.: *Mass spectrometric identification of potential feeder substances beneficial to pollen embryogenesis.* – 43. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Massenspektrometrie (DGMS), Halle/Salle, 07.-10.03.2010.

**Lippmann, R.**, Matros, A., Kumlehn, J. & Mock, H.-P.: *Identification of potential feeder substances beneficial to pollen embryogenesis.* – 10<sup>th</sup> GABI Status Seminar, Potsdam, 09.-11.03.2010.

Hedtmann, C., Kaspar, S., **Lippmann, R.**, Döll, S., Matros, A., de Jaeger, G., Witzel, K., & Mock, H.-P.: *Analysis of Abiotic Stress Responses by Proteomic Approaches. FESPB meeting, Valencia, Spanien, 4. – 9.7.2010*

---

---

Kaspar, S., **Lippmann, R.**, Merx, K., Weier, D., Matros, A., Weschke, W. & Mock, H.-P.: *Analysis of spatial and temporal changes in protein and metabolite patterns during barley grain development.* – Institutstag IPK, Gatersleben, 12.-13.10.2009.

**Lippmann, R.**, M. Müller, M. Hajirezaei, W. Weschke, A. Matros & H.-P. Mock: *A GC-MS based platform for metabolite analysis.* – Institutstag IPK, Gatersleben, 29.-30.09.2008.

**Lippmann, R.**, Mock, H.-P. & Kumlehn, J.: *Combined Proteomic and Metabolic analysis of a tobacco cell suspension culture.*– Plant Science Student Conference, Gatersleben, 01.-04.07.2008

**Lippmann, R.**, Matros, A. & Mock, H.-P.: *Establishment of GC-MS metabolite profiling for different complex samples from various plant tissues.* – PSE Young Scientists Meeting (Future Trends in Phytochemistry), Bad Herrenalb, 26.-29.03.2008.

### **Auszeichnungen**

Vortragspreis (1.Platz) - *Identification of Potential Feeder Substances Promote Pollen Embryogenesis (Pollenembryogenese) from the Secretome of Pistils* – Plant Science Student Conference, Gatersleben, 15.-18.06.2010

---

## 9 Danksagung

Hiermit möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben.

Bei PD Dr Hans-Peter Mock, bedanke ich mich für die Möglichkeit diese Arbeit in seiner Arbeitsgruppe anfertigen zu dürfen und die Überlassung des interessanten Themas und die Diskussionen und eingebrachten Ideen während der Arbeit.

Bei Dr. Jochen Kumlehn, mit seiner Expertise auf dem Gebiet der Pollenembryogenese, möchte ich mich besonders bedanken, für die zahlreichen Hinweise und Ideen die zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben, sowie die zahlreichen Diskussionen über Ergebnisse und Hypothesen.

Dr. Andrea Matros danke ich für die zahlreichen Hilfestellungen während der gesamten Zeit und besonders für die Einweisung in die Bedienung der nanoUPLC-MS für sämtliche Proteinmessungen.

Ingrid Otto und Andrea Müller danke ich für die Hilfe bei der Isolation der Mikrosporenkulturen und hervorragende technische Unterstützung bei der Kultivierung der Pollen.

Diaa Dhagma danke ich recht herzlich für die Bereitstellung der Elektronenmikroskopischen Bilder, die innerhalb des GABI-Pollenembryogenese Projektes entstanden sind. Dabei möchte ich nicht versäumen, auch allen Mitgliedern des Konsortiums zu danken, die sich in die Diskussionen eingebracht haben.

Dr. Mohammad-Reza Hajirezaei danke ich für die Hilfe bei der Messung phosphorylierter Metabolite und Nukleotide

Dr. Svetalana Friedel möchte ich für die statistische Auswertung der Proteindaten mit „R“ und die Bereitstellung des Skriptes danken.

Bei Annegret Wolf möchte ich mich für die technische Unterstützung bei den zahlreichen Nebenprojekten bedanken die innerhalb der Zeit angefallen sind und in dieser Arbeit unerwähnt geblieben sind.

Außerdem danke ich natürlich allen Mitgliedern der Gruppe Angewandte Biochemie .

Zuletzt danke ich natürlich auch meiner Familie für die fortwährende Unterstützung während der gesamten Studien- und Promotionszeit.

---

## **10 Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig, ohne fremde Hilfe und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel verfasst habe. Die den benutzen Werken wörtlich und inhaltlich entnommen Stellen sind als solche kenntlich gemacht. Ich versichere, dass die Arbeit an keiner anderen Einrichtung zur Erlangung des Doktorgrades eingereicht wurde.

Gatersleben, den 30. Januar 2012

---

## 11 Anhang

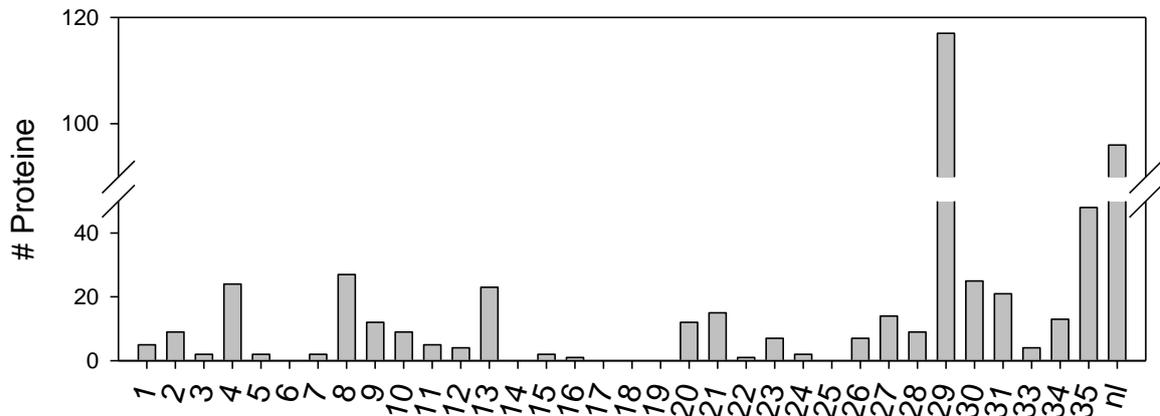


Abbildung 56: Klassifizierung der identifizierten Proteine in die entsprechenden SuperBins der MapMan Annotation (Klassifizierung im Original übernommen).

„1 photosynthesis (PS), 2 major CHO metabolism, 3 minor CHO metabolism, 4 glycolysis , 5 – fermentation, 6 gluconeogenese/ glyoxylate cycle, 7 –OPP, 8 TCA / org.transformation , 9 mt electron transport / ATP synthesis, 10 cell wall, 11 lipid metabolism, 12 N-metabolism, 13 amino acidmetabolism, 14 S-assimilation, 15 metal handling, 16 secondary metabolism, 17 hormone metabolism, 18 Cofactor/vitamine metabolism, 19 tetrapyrrole synthesis, 20 stress, 21 redox.regulation, 22 polyamine metabolism, 23 nucleotide metabolism, 24 –Biodegradation, 25 5 C-metabolism, 26 –miscellaneous, 27 RNA, 28 DNA, 29 protein, 30 signalling, 31 cell, 33 development, 34 transport, 35 not assigned , unlinked“. Unlinked bedeutet, dass es zu diesem Harvest\_35 Identifier Keinen vernetzten Contig in MapMan gab.

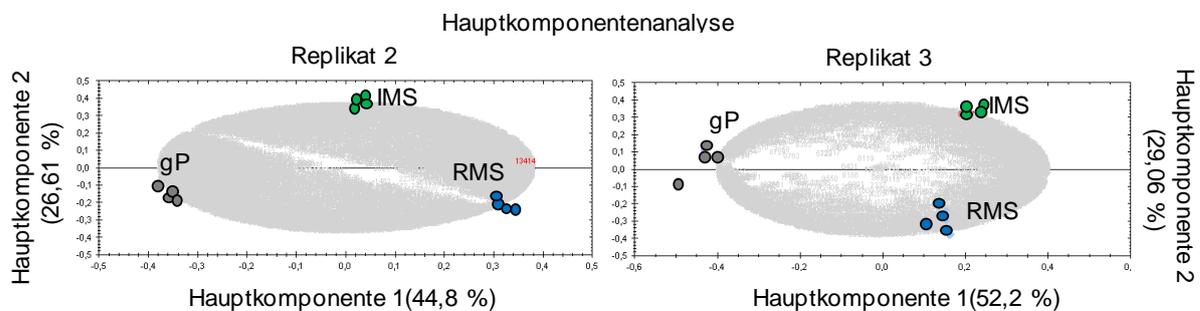


Abbildung 57: Hauptkomponentenanalyse der zwei weiteren biologischen Replikate der integrativen Proteinanalyse.

Gezeigt sind nicht induzierte Reguläre Mikrosporen (RMS), kältestress induzierte Mikrosporen (IMS) und gametophytische Pollen.

**Tabelle 11: Proteinidentifizierung der am stärksten regulierten Protein nach Induktion der Pollenembryogenese-Kompetenz mittels Kältestress und 4 Tagen Kultivierung in KPB Medium im Vergleich zu gametophytischen Pollen.**

Die entsprechenden Identifier der Harvest Datenbank (Harvest\_35 ID) wurden mit dem *Basic Local Alignment Tool* (BLAST) gegen die UniRef\_90 Datenbank Akzessionen gesucht. Die dazugehörige Beschreibung wurde dem entsprechenden UniRef\_90 Eintrag entnommen. Log2 Wert ist das Verhältnis der Mittelwerte aus embryogenen Pollen zu vakuolisierten Mikrosporen.

Harvest_35 ID	UniRef_90 (p-value)	Annotation	log2 Ratio		p-value 1	p-value 2
			n1	n2		
35_799	Q9LEE4	Translation initiation factor, eIF-5A	-6.38	-3.04	0.0000	0.0252
35_13796	Q0WRN6	Polyubiquitin 4 UBQ4	-5.53	-2.84	0.0044	0.0037
35_2506	Q9LKJ3	Starch phosphorylase H	-3.19	-2.55	0.0011	0.0039
35_38580	O23255	Adenosylhomocysteinase	-2.19	-1.81	0.0004	0.0061
35_50110	Q7XJ80	Cytosolic heat shock protein 90	-1.91	-1.60	0.0006	0.0246
35_5439	Q6QF99	Expansin EXPB5	-1.32	-2.44	0.0000	0.0020
35_21226	Q942J6	Putative L-ascorbate oxidase	-1.51	-1.85	0.0000	0.0019
35_14470	O24581	Luminal-binding protein 3 precursor	-1.72	-1.41	0.0001	0.0407
35_14175	P10987	Actin-5C precursor	-1.32	-1.96	0.0056	0.0019
35_16870	Q5NBQ0	Pyruvate kinase	-1.22	-2.05	0.0015	0.0310
35_15404	Q8L808	Putative cytochrome c oxidase subunit	-1.24	-1.83	0.0005	0.0112
35_15382	O22523	DNA-binding protein GBP16	-1.67	-0.76	0.0000	0.0409
35_217	Q5I7L4	60S ribosomal protein L6	-1.42	-1.10	0.0002	0.0331
35_15967	Q41591	Voltage dependent anion channel	-0.33	-2.73	0.0056	0.0057
35_14766	Q5I7L5	60S ribosomal protein L36	-0.70	-1.94	0.0019	0.0149
35_22826	Q94JN3	Profilin	-1.07	-1.18	0.0001	0.0080
35_15427	Q6ZDY8	Succinate dehydrogenase mitochondrial precursor	-0.46	-2.26	0.0035	0.0020
35_14619	P37833	Aspartate aminotransferase, cytoplasmic	0.40	0.71	0.0050	0.0317
35_41835	Q9WR81	Polyprotein (Fragment)	0.35	0.96	0.0119	0.0338
35_1109	Q9ZQY1	Pyruvate dehydrogenase E1	0.40	1.14	0.0463	0.0116

---

35_1230	Q10SR3	70 kDa heat shock protein	0.51	0.94	0.0008	0.0164
35_49	Q43247	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, cytosolic 3	0.53	0.97	0.0024	0.0391
35_1092	Q40082	Xylose isomerase	0.54	1.07	0.0090	0.0124
35_16379	Q940P8	TCP-1/cpn60 chaperonin family protein	0.76	1.12	0.0004	0.0180
35_15893	Q6K669	Leucine aminopeptidase 2, chloroplastic precursor	0.41	1.82	0.0357	0.0032
35_1748	O64464	Proteasome subunit beta type-1	1.02	0.85	0.0011	0.0464
35_2228	Q75M19	Putative 26S proteasome regulatory subunit	1.11	0.77	0.0004	0.0498
35_10965	P00828	ATP synthase subunit beta, chloroplastic	1.06	0.92	0.0167	0.0317
35_13822	Q84P97	Eukaryotic porin family protein	0.81	1.42	0.0005	0.0112
35_1056	P93616	Poly(A)-binding protein	0.86	1.60	0.0005	0.0032
35_27112	Q2TZ28	Molecular chaperones HSP70/HSC70	0.35	2.70	0.0126	0.0019
35_15073	Q6YZX6	Putative aconitate hydratase, cytoplasmic	0.82	1.86	0.0008	0.0301
35_16233	Q01JY8	OSIGBa0116M22.11 protein	0.82	2.04	0.0215	0.0065
35_14509	Q10N21	L-ascorbate peroxidase 1, cytosolic	0.39	2.91	0.0126	0.0245
35_15023	Q8RZ18	Probable mitochondrial import receptor subunit TOM20	0.89	2.07	0.0016	0.0021
35_15129	Q10Q21	Mitochondrial processing peptidase beta subunit	1.19	1.55	0.0008	0.0050
35_1031	Q5XUV6	Proteasome subunit beta type	1.78	0.71	0.0004	0.0381
35_1011	Q10AT9	Mitochondrial prohibitin complex protein 2	0.66	3.21	0.0012	0.0019
35_1143	Q7XY25	Glutaredoxin	1.23	2.09	0.0069	0.0021
35_730	Q65XK0	Ketol-acid reductoisomerase	0.83	3.17	0.0008	0.0019
35_280	P42210	Phytpsin precursor (Aspartic proteinase)	1.78	1.44	0.0001	0.0041
35_14081	P11139	Tubulin alpha-1 chain	1.43	2.41	0.0006	0.0050
35_17471	Q6YX79	GHMP kinase-like protein	1.08	3.18	0.0002	0.0020
35_39371	P02276	Histone H2A.2.1	1.71	2.07	0.0018	0.0098
35_15245	Q42835	Beta-D-glucan exohydrolase, isoenzyme	1.64	2.21	0.0003	0.0165
35_14706	Q9XEA6	Cysteine synthase	2.10	1.42	0.0076	0.0331
35_13936	Q43214	Protein H2A.6	1.97	1.86	0.0000	0.0029
35_15208	P46274	Mitochondrial outer membrane porin	2.22	1.74	0.0002	0.0080

---

```

P17513 -----MEFSG-----SPLTLFCCVF-----FLFLTGS LAQG- 26
P17514 -----MEFSG-----SPMALFCCVF-----FLFLTGS LAQG- 26
Q207U1 MKAHTLIILAFALFLGAASAEQCGRQANGALCPNRLCCSQHGWCSTDEYCKNGCQSQC 60

P17513 -----IGSIVTNDLFNEMLKNRNDGRC PANGFYTYDAFIAAANSFPGFGTSG 73
P17514 -----IGSIVTSDLFNEMLKNRNDGRC PANGFYTYDAFIAAANSFPGFGTTG 73
Q207U1 GQTPTPTNPGSGDVGRIITPAIFDQMLKYRNDARCP SNGFYSYNAFISATR SFPFGGTTG 120

P17513 DDTARRKEIAAFFGQTSHE T TGGSLSA--EPFTGGYCFVRQNDQ-----SD 117
P17514 DDTARRKEIAAFFGQTSHE T TGGSLSA--EPFTGGYCFVRQNDQ-----SD 117
Q207U1 DDA TRKRELA A FLGQTSHE T TGGWPSAPDGPFAWGYCFIRERNQDTYCS PNQQWPCAPGQ 180

P17513 RYYGRGPIQLTNRNNYEKAGNAIRQDLVNNPDLVATDATISFKTAIWFWMT P QDNKPS SH 177
P17514 RYYGRGPIQLTNRNNYEKAGTAIGQELVNNPDLVATDATISFKTAIWFWMT P QDNKPS SH 177
Q207U1 KYYGRGPIQLTHNYNYGPAGRALGLNLLNPNDSVATDPTV SFKTAIWFWMT P QGNKPS SH 240

P17513 DVIIGSWTPSAADQSANRAPGCGVITNIINGGIECGVGPNAAVEDRIGYRRYCGMLNVA 237
P17514 DVIIGRWTPSAADQANRVPGYGVITNIINGGIECGIGRNDAVEDRIGYRRYCGMLNVA 237
Q207U1 DVIIGKWQPSGADSAAGRVPYGVITNIINGGLECGRGPDSRVADRIGFFKRYCDILRIG 300

P17513 PGDNLDCYNQRNFAQG 253
P17514 PGENLDCYNQRNFGQG 253
Q207U1 YGNLDCNNQR PFA-- 314

```

**Abbildung 58: CLUSTAL W Alignment** der drei annotierten Chitinase Isoformen aus Kulturmedium der S2LS3 Tabaksuspensionskultur.

Peptide die zur Annotierung der jeweiligen Akkzession führten sind in grau markiert. Schwarz unterlegte Aminosäuren zeigen die charakteristischen Unterschiede innerhalb der Isoformen.



---

A2Y1G8	Putative uncharacterized protein	<i>Oryza sativa</i>	20708	10.8497	278.7098	4	10	20.442
A2Y5F9	Putative uncharacterized protein	<i>Oryza sativa</i>	44772	4.732	309.6841	4	34	11.9512
A2Y790	ATP synthase subunit beta	<i>Oryza sativa</i>	54797	7.3418	406.4328	4	38	12.6953
A2Y8G6	6 phosphogluconate dehydrogenase decarboxylating	<i>Oryza sativa</i>	49165	7.9962	148.9907	3	29	6.5022
A2YEW5	Fructose biphosphate aldolase	<i>Oryza sativa</i>	57624	7.1213	111.0939	1	35	2.5501
A2YNI1	Putative uncharacterized protein	<i>Oryza sativa</i>	43656	6.6667	251.0552	4	42	12.8866
A2YP51	Putative uncharacterized protein	<i>Oryza sativa</i>	34524	4.8159	115.9549	1	17	2.6163
A2YP65	Putative uncharacterized protein	<i>Oryza sativa</i>	14364	7.3118	93.3633	1	10	9.1603
A2YQR2	Fructose biphosphate aldolase	<i>Oryza sativa</i>	38369	6.6786	178.859	2	30	6.6298
A2YUZ4	Putative uncharacterized protein	<i>Oryza sativa</i>	91230	5.1925	372.7793	5	71	6.7485
A2YZ92	Putative uncharacterized protein	<i>Oryza sativa</i>	40734	8.8149	119.7967	2	27	9.9476
A2Z2B0	Putative uncharacterized protein	<i>Oryza sativa</i>	90695	4.8246	261.3465	4	71	6.6002
A2Z2G4	Putative uncharacterized protein	<i>Oryza sativa</i>	65303	4.7802	143.0353	4	53	8.6655
A2ZB26	Putative uncharacterized protein	<i>Oryza sativa</i>	131535	4.7444	214.661	2	60	1.7617
A2ZB30	Putative uncharacterized protein	<i>Oryza sativa</i>	62463	4.6941	128.0052	1	37	1.773
A2ZL18	Putative uncharacterized protein	<i>Oryza sativa</i>	121611	6.0139	355.7351	5	97	5.9701
A2ZPX3	Putative uncharacterized protein	<i>Oryza sativa</i>	12359	5.5917	285.4974	2	14	19.8276
A2ZSP0	Putative uncharacterized protein	<i>Oryza sativa</i>	81536	7.1656	275.5613	3	44	5.0314
A3A143	Putative uncharacterized protein	<i>Oryza sativa</i>	51940	5.8856	261.9365	3	40	6.639
A3A2M9	Putative uncharacterized protein	<i>Oryza sativa</i>	35457	6.8608	82.647	2	22	7.3099
A3A7Q0	Putative uncharacterized protein	<i>Oryza sativa</i>	36309	7.7417	134.8275	5	28	16.4134
A3ABR0	Putative uncharacterized protein	<i>Oryza sativa</i>	25583	5.4977	184.9478	3	24	15.0862
A3AC74	Putative uncharacterized protein	<i>Oryza sativa</i>	144080	5.7345	174.595	4	102	3.3463
A3AG33	Enolase	<i>Oryza sativa</i>	44136	4.6454	409.0943	4	29	13.3005
A3AP01	Putative uncharacterized protein	<i>Oryza sativa</i>	40889	5.6212	153.7155	2	25	7.4866
A3AZB6	Putative uncharacterized protein	<i>Oryza sativa</i>	90379	6.6546	388.0324	4	52	6.401
A3B055	Putative uncharacterized protein	<i>Oryza sativa</i>	78738	5.2249	347.1749	6	42	11.4286
A3B6L7	ATP synthase subunit beta	<i>Oryza sativa</i>	51556	5.3835	400.8699	3	33	12.0833
A3B7G1	Nucleoside diphosphate kinase	<i>Oryza sativa</i>	21459	8.4437	155.6079	3	15	23.0769
A3BCL4	Putative uncharacterized protein	<i>Oryza sativa</i>	35732	10.9017	291.2581	3	28	10.0946
A3BDG2	Fructose biphosphate aldolase	<i>Oryza sativa</i>	56756	7.1212	111.0939	1	34	2.5926

---

---

A3BIF2	Putative uncharacterized protein	<i>Oryza sativa</i>	39763	9.9816	148.1302	2	25	7.7562
A3BMN4	Putative uncharacterized protein	<i>Oryza sativa</i>	32279	5.0621	119.1779	1	15	2.8037
A3BNK8	Putative uncharacterized protein	<i>Oryza sativa</i>	46496	4.372	128.4444	2	49	6.0241
A3BQX7	Putative uncharacterized protein	<i>Oryza sativa</i>	31319	10.3553	106.5687	3	31	14.5455
A3BRY5	Putative uncharacterized protein	<i>Oryza sativa</i>	54294	9.7531	119.9698	2	34	4.7893
A3BSV6	Putative uncharacterized protein	<i>Oryza sativa</i>	89897	8.554	335.4984	5	72	6.4838
A3BUA7	Putative uncharacterized protein	<i>Oryza sativa</i>	130882	5.3458	283.2754	4	100	5.756
A3BUJ5	Putative uncharacterized protein	<i>Oryza sativa</i>	48001	4.4703	135.5595	1	45	2.8369
A3BWT0	Putative uncharacterized protein	<i>Oryza sativa</i>	42560	9.1912	136.8396	3	35	9.5238
A3BZ47	Histone H4	<i>Oryza sativa</i>	30913	11.8022	286.2476	4	29	16.1404
A3BZV5	Putative uncharacterized protein	<i>Oryza sativa</i>	103917	4.9907	292.3824	7	82	10.4053
A3C891	Putative uncharacterized protein	<i>Oryza sativa</i>	142083	4.9706	224.4431	3	69	2.9688
A3C895	Putative uncharacterized protein	<i>Oryza sativa</i>	57385	4.9446	138.1792	1	37	1.9493
A3CB04	Putative uncharacterized protein	<i>Oryza sativa</i>	30906	6.7293	250.6113	3	21	10.6762
A3CEL7	Putative uncharacterized protein	<i>Oryza sativa</i>	79187	5.7757	185.5807	2	35	4.1899
A3CEM2	Putative uncharacterized protein	<i>Oryza sativa</i>	73256	5.1568	180.7282	2	37	3.211
A3CHV0	Putative uncharacterized protein	<i>Oryza sativa</i>	120313	5.9756	355.3505	7	101	8.1998
A6MZF0	Transaldolase 2	<i>Oryza sativa</i>	19415	8.9617	153.1562	2	14	10.6742
A6MZX0	5 methyl tetrahydropteroyl triglutamate homocysteine methyltransferase	<i>Oryza sativa</i>	22651	4.7479	152.5524	3	13	13.8095
A6N038	Mitochondrial ADP ATP carrier protein	<i>Oryza sativa</i>	18124	10.171	180.0982	3	11	17.2619
A6N0G6	Enolase	<i>Magnoliophyta</i>	25319	4.602	314.6075	5	16	19.9134
A6N160	Glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase cytosolic	<i>BEP clade</i>	22580	5.8903	201.9802	2	15	12.3223
A8CCK8	Cytosolic glutathione reductase	<i>Triticeae</i>	53045	6.0364	224.1624	4	32	12.0724
A9RZY1	Predicted protein	<i>Embryophyta</i>	20777	10.3411	275.4109	4	11	24.8619
B2BGW5	ATP synthase beta subunit	<i>Viridiplantae</i>	25932	4.7867	161.2279	1	22	4.5082
O23755	Elongation factor 2	<i>Magnoliophyta</i>	93738	5.8759	212.5786	4	65	6.1684
O24186	10 kDa chaperonin	<i>Oryza sativa</i>	10608	9.1785	98.9701	1	12	12.2449
O24207	Enoyl ACP reductase precursor	<i>Oryza sativa</i>	39877	9.2893	110.4751	2	27	8.8773
O50003	60S ribosomal protein L12	<i>Magnoliophyta</i>	17871	9.4312	158.9803	2	20	16.8675
O64393	Wheatwin 2 precursor	<i>Triticeae</i>	15856	7.9175	105.5036	1	7	8.7838

---

---

O81237	6 phosphogluconate dehydrogenase decarboxylating	<i>Poaceae</i>	53022	5.8456	184.1634	6	33	12.3967
O82705	RGP1 protein	<i>Oryza sativa</i>	39451	7.888	211.0663	5	38	15.1862
P08477	Glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase cytosolic	<i>BEP clade</i>	33214	6.1923	433.6187	7	27	22.2951
P09189	Heat shock cognate 70 kDa protein	<i>Magnoliophyta</i>	71182	4.9092	273.9403	6	54	12.1352
P13905	Elongation factor 1 alpha	<i>Embryophyta</i>	49470	9.4614	539.7784	6	43	12.6949
P17784	Fructose bisphosphate aldolase cytoplasmic isozyme	<i>Poaceae</i>	38839	7.0984	233.7905	3	32	9.7765
P19023	ATP synthase subunit beta mitochondrial precursor	<i>Poaceae</i>	59067	5.9729	563.8469	5	37	13.0199
P24067	Luminal binding protein 2 precursor	<i>Magnoliophyta</i>	73039	4.9103	245.1419	3	62	4.6757
P24629	Heat shock cognate 70 kDa protein 1	<i>Magnoliophyta</i>	71242	4.9545	394.3785	7	54	14.7692
P27322	Heat shock cognate 70 kDa protein 2	<i>Embryophyta</i>	70662	4.8807	252.0479	5	51	10.559
P29185	Chaperonin CPN60 1 mitochondrial precursor	<i>Magnoliophyta</i>	61173	5.5302	403.3562	12	50	29.2894
P29510	Tubulin alpha 2 alpha 4 chain	<i>Eukaryota</i>	49509	4.743	122.0589	3	35	12.6667
P34937	Triosephosphate isomerase cytosolic	<i>Triticeae</i>	26719	5.2194	1046.24	8	19	44.2688
P42210	Phytopsin precursor		54191	5.048	217.2758	3	35	6.1024
P42795	60S ribosomal protein L11 1	<i>Spermatophyta</i>	20817	10.2682	142.4321	2	11	9.8901
P42895	Enolase 2	<i>Poaceae</i>	48132	5.6028	506.9852	7	34	19.0583
P48494	Triosephosphate isomerase cytosolic	<i>Oryza</i>	27046	5.204	170.9637	2	20	13.0435
P52589	Protein disulfide isomerase precursor	<i>Triticeae</i>	56498	4.8027	690.0789	14	49	29.1262
P59220	Calmodulin 7	<i>Eukaryota</i>	16836	3.9106	117.4989	2	26	24.8322
P80607	Alpha 1 4 glucan protein synthase UDP forming	<i>Poaceae</i>	41177	5.6774	260.1938	4	41	13.7363
Q01HY2	OSIGBa0138H21 OSIGBa0138E01 14 protein	<i>Oryza sativa</i>	80869	6.4211	125.3662	3	48	4.4444
Q01I46	OSIGBa0092M08 6 protein	<i>Oryza sativa</i>	18100	4.4733	120.1582	4	16	36.5269
Q06572	Pyrophosphate energized vacuolar membrane proton pump		79481	5.0733	266.7416	3	37	5.2493
Q08277	Heat shock protein 82	<i>Magnoliophyta</i>	81839	4.7983	185.7029	4	71	7.6923
Q08G39	Ribosomal protein L3	<i>BEP clade</i>	44066	10.4295	269.1658	8	37	24.7396
Q0DBM5	Os06g0550000 protein	<i>Oryza sativa</i>	37331	11.8887	255.4176	2	26	7.1429
Q0DJC0	Os05g0302700 protein	<i>Oryza sativa</i>	40951	10.0466	199.0815	3	32	8.1579
Q0DS57	Os03g0332500 protein	<i>Oryza sativa</i>	58826	9.425	163.8195	6	33	14.8496
Q0DWU5	Os02g0794700 protein	<i>Oryza sativa</i>	33164	5.3688	173.2759	3	19	11.3924
Q0DX85	Os02g0768600 protein	<i>Oryza sativa</i>	32980	5.4547	205.7341	4	29	14.6259
Q0E3B7	Os02g0184200 protein	<i>Poaceae</i>	82342	5.1601	265.8177	3	39	5.0761

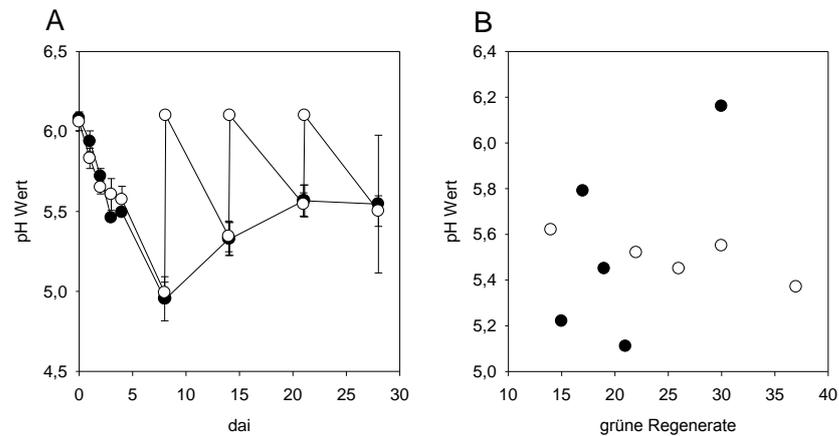
---

---

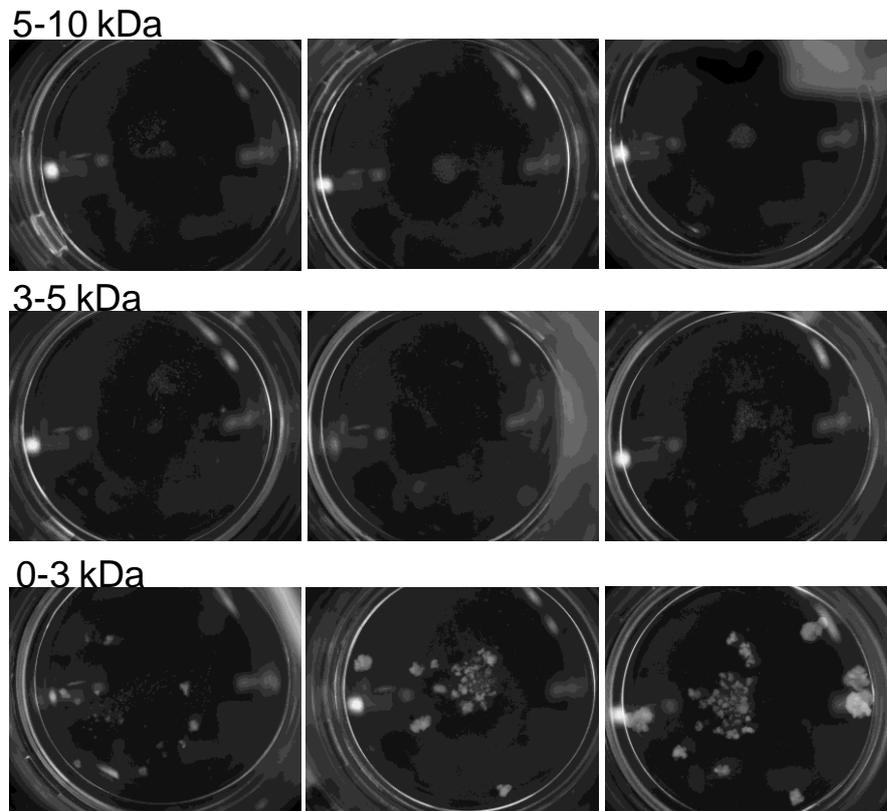
Q0IN14	Os12g0514500 protein	<i>Oryza sativa</i>	91423	5.0306	333.0992	5	80	7.8915
Q0ISV7	Adenosylhomocysteinase	<i>Oryza sativa</i>	51424	6.1567	397.8339	7	38	14.8936
Q0IY81	Os10g0355800 protein	<i>Oryza sativa</i>	84007	5.8819	216.1066	2	48	8.6162
Q0J0Z5	Os09g0474300 protein	<i>Oryza sativa</i>	74758	9.1472	252.6828	4	58	8.104
Q0J1T7	Os09g0413500 protein	<i>Oryza sativa</i>	7035	11.7019	124.4622	2	3	38.7097
Q0J5V5	Os08g0398700 protein	<i>Oryza sativa</i>	97842	5.0717	364.8299	5	70	8
Q0JCL7	Os04g0462900 protein	<i>Poaceae</i>	31445	5.9899	172.185	3	22	9.8976
Q0JFF3	Os04g0107900 protein	<i>Oryza sativa</i>	27940	4.3676	121.9471	2	30	9.6386
Q10LW7	60S ribosomal protein L10 putative expressed	<i>Oryza sativa</i>	25259	10.8468	131.6947	1	17	5.3333
Q10MQ2	Aspartate aminotransferase putative expressed	<i>Oryza sativa</i>	49826	8.4904	134.9495	5	39	13.5776
Q10QZ5	Elongation factor 1 alpha putative expressed	<i>Sttophyta</i>	38268	7.734	458.7606	5	36	13.8329
Q1ENF0	Cystatin Hv CPI8	<i>Hordeum vulgare</i>	12853	10.0952	292.2928	3	8	30.3279
Q2QY82	Arabinoxylan arabinofuranohydrolase isoenzyme AXAH I	<i>Oryza sativa</i>	63624	4.717	192.3434	2	35	3.6842
Q2QY88	Alpha L arabinofuranosidase C terminus family protein expressed	<i>Oryza sativa</i>	72831	5.1264	185.5807	2	29	3.1818
Q2QZ41	Heat shock cognate 70 kDa protein putative expressed	<i>Oryza sativa</i>	67278	4.7743	330.9921	5	49	16.0976
Q2R3R6	Transposon protein putative Pong sub class	<i>Oryza sativa</i>	65969	6.3834	144.4021	1	38	3.3557
Q2RAZ2	Alpha L arabinofuranosidase C terminus family protein expressed	<i>Oryza sativa</i>	73421	4.567	128.0052	1	36	1.5221
Q3MUP2	Glutathione S transferase	<i>Triticeae</i>	25009	6.3918	178.3249	4	17	15.7658
Q43260	Glutamate dehydrogenase	<i>Poaceae</i>	43994	6.0782	115.4252	4	27	12.8954
Q43764	Chitinase	<i>Triticeae</i>	27035	8.488	102.7621	2	22	15.625
Q43772	UTP glucose 1 phosphate uridylyltransferase	<i>BEP clade</i>	51612	5.0213	339.0545	9	37	26.6385
Q4LB12	Methionine synthase 2 enzyme	<i>Poaceae</i>	84375	5.9235	230.6796	5	56	6.7885
Q53RJ5	DnaK protein	<i>Oryza sativa</i>	73328	5.2051	265.4897	2	54	2.8401
Q5JK10	Putative transaldolase	<i>Oryza sativa</i>	46402	6.0163	293.425	5	39	12.7315
Q5TKF4	Nucleoside diphosphate kinase	<i>Oryza sativa</i>	25921	9.0353	157.9291	3	18	13.3891
Q69T90	Pantothenate kinase like	<i>Oryza sativa</i>	40459	4.6269	183.7324	4	31	12.0548
Q69V57	Fructose bisphosphate aldolase	<i>Oryza sativa</i>	37730	7.7913	113.4785	1	27	3.9106
Q6ER94	2 Cys peroxiredoxin BAS1 chloroplast precursor	<i>Oryza sativa</i>	28079	5.5761	134.2953	4	22	15.7088
Q6K669	Leucine aminopeptidase 2 chloroplast precursor	<i>Oryza sativa</i>	61779	8.1383	222.6651	4	38	7.3579
Q6K683	MutT nudix protein like	<i>Oryza sativa</i>	87388	4.8344	140.5292	4	64	5.5412

---

Q6K9N6	Succinyl CoA ligase GDP forming beta chain mitochondrial precursor	<i>Oryza sativa</i>	45062	5.9119	201.7228	5	42	14.218
Q6Z4G3	Putative reversibly glycosylated polypeptide	<i>Oryza sativa</i>	41252	5.9789	256.7	4	42	10.1093
Q6ZCV7	Putative heat shock protein	<i>Oryza sativa</i>	88292	4.8203	257.4338	6	72	10.4459
Q6ZGJ7	Putative inorganic pyrophosphatase	<i>Oryza sativa</i>	20457	4.4149	207.9698	3	17	18.6813
Q70XZ6	ATP synthase subunit beta	<i>Spermatophyta</i>	53650	5.0339	167.3562	1	37	2.2
Q75HF7	Putative prohibitin	<i>Oryza sativa</i>	46064	5.4802	159.6699	2	30	6.6667
Q7M237	Superoxide dismutase EC 1.15.1.1 Cu Zn III cytosolic	<i>Oryza sativa</i>	4963	8.005	139.7112	1	1	25
Q7X9L9	QM	<i>BEP clade</i>	20070	10.8593	115.3292	1	12	13.4831
Q7XAC0	H pyrophosphatase	<i>Oryza sativa</i>	79635	5.7849	281.2836	4	41	8.2794
Q84MY1	Putative reversibly glycosylated polypeptide 3 partial	<i>Oryza sativa</i>	17177	6.7874	82.8884	2	14	11.6883
Q8GVD3	Thioredoxin H	<i>Triticeae</i>	12685	5.1394	191.5143	2	17	15.2542
Q8H4B9	Putative translational inhibitor protein	<i>Oryza sativa</i>	18805	9.7537	398.9442	8	20	45.5556
Q8LGM6	HSP90 like protein	<i>Oryza sativa</i>	29538	4.9166	102.1111	1	22	4.5113
Q8LMD5	Enolase	<i>Oryza sativa</i>	33603	5.5554	311.9443	4	21	12.5413
Q8LPA8	Deoxymugineic acid synthase 2	<i>Hordeum vulgare</i>	27050	6.1842	218.8106	5	14	22.4409
Q8LPA9	Deoxymugineic acid synthase 1	<i>Hordeum vulgare</i>	38355	5.5913	227.0695	5	25	15.3203
Q8LQ68	Hexokinase 6	<i>Oryza sativa</i>	55086	5.8903	95.2875	1	34	5.7312
Q8S1Y0	Putative transaldolase	<i>Oryza sativa</i>	55402	6.395	271.2527	3	43	6.1896
Q8W012	Alpha L arabinofuranosidase beta D xylosidase isoenzyme ARA I	<i>Hordeum vulgare</i>	81943	5.5018	232.7303	7	53	10.4247
Q93WM8	Flavin containing polyamine oxidase precursor	<i>Hordeum vulgare</i>	55406	6.1553	123.6599	4	31	8.4848
Q948T6	Lactoylglutathione lyase	<i>Oryza sativa</i>	32532	5.3465	208.1293	4	22	14.7766
Q96468	2 Cys peroxiredoxin BAS1 chloroplast precursor	<i>Liliopsida</i>	23284	5.3386	269.0424	5	19	27.1429
Q9ATV7	Arabinoxylan arabinofuranohydrolase isoenzyme AXAH II	<i>Hordeum vulgare</i>	71953	5.0609	221.2782	3	31	4.4207
Q9LEH7	Chitinase II	<i>Hordeum vulgare</i>	27109	8.9647	149.4882	3	18	18.4739
Q9M589	Prohibitin	<i>Poaceae</i>	32059	10.1799	154.1149	3	21	13.4948
Q9SCN8	Cell division control protein 48 homolog D	<i>Magnoliophyta</i>	90283	4.8543	181.1089	3	70	3.681
Q9SWF5	Adenosylhomocysteinase	<i>Magnoliophyta</i>	53306	5.475	182.104	5	35	10.5155
Q9XEI3	Beta D glucan exohydrolase isoenzyme ExoI	<i>Hordeum vulgare var</i>	67862	6.2388	659.2828	11	49	22.2222



**Abbildung 59: A) pH-Wert Änderung während der Kultivierung von Embryogenese-kompetenten Pollen regulär ohne (schwarz) und mit Mediumwechsel (weiß) jeweils nach 7 d. B) Korrelation zwischen pH-Wert nach Tag 28 und Generierung grüner Regenerate.**



**Abbildung 60: Aufnahmen aller drei biologischen Replikate der Millicellkultivierung mit verschiedenen Fraktionen von Konditioniertem Pistillmedium, welches durch Größenausschluss aufgetrennt wurde. Die entsprechenden Molekulargewichte sind in der Abbildung aufgeführt.**

**Generierte GC-MS Bibliothek mit den charakteristischen Fragmentmassen der TMS-Derivate bei 70 eV, die Retentionszeit in der verwendeten Methode und die dazugehörigen Retentionszeit-Indizes (RI) sowie der Vergleich mit der bereits veröffentlichten Golm-Metabolit-Datenbank.**

Lib ID	Name	Masse 1	Masse 2	RT [min]	RI	RI Golm
1	Lactat (2TMS)	147	117.1	6.64	1048	1047
2	Oxalat	147.1	190.1	6.73	1053	1134
3	Alanin (2TMS)	116.08	147.06	7.62	1099	1103
4	Hydroxylamin	133.1	249.1	7.9	1110	1101
5	Valin (2TMS)	144.11	218.1	10.45	1212	1222
6	Urea	171.1	147.1	11.12	1239	1269
7	Benzoat (1TMS)	179.1	105.3	11.25	1244	1270
8	Analyt RI1263	174.1		11.76	1263	
13	Phosphat (3TMS)	299.1		11.89	1268	1297
9	Leucin (2TMS)	158.12	232.15	11.91	1269	1295
10	Glycerol (3TMS)	147	204	12.01	1273	1292
11	Isoleucin (2TMS)	158.1	218.1	12.46	1291	1313
14	Prolin (2TMS)	142.1		12.52	1293	1332
12	Glycin (2TMS)	174.1	248.1	12.76	1302	1326
15	Succinat (2TMS)	147.1	247.1	13	1312	1341
16	Glycerat (3TMS)	189.1	292.1	13.43	1329	1352
17	Fumarat (2TMS)	245.1	147.1	13.97	1350	1372
18	Serin (3TMS)	204	217.99	14.21	1359	1380
19	Unknown 1	141.1	147.06	14.42	1368	
	Threonic acid 1-4					
20	lactone (2TMS)	247.1		14.45	1369	1398
21	Threonin (3TMS)	217.99	117	14.86	1385	1403
22	b-Alanin (3TMS)	174.11	248.1	15.87	1426	1440
23	Unknown2	186.98	146	16.41	1448	
24	á-Amino isobutyric acid	174.1	147.1	16.59	1455	
26	Malat (3TMS)	147.06	233.1	17.41	1488	1488
27	Unknown3	115.1	243	17.63	1497	1508
28	Pyroglutamat 2TMS)	156.1	230.1	18.06	1515	1529
29	Aspartat (3TMS)	232.1	147.1	18.16	1519	1519
30	4-Hydroxyprolin (3TMS)	230.1	140.1	18.28	1525	1526
31	4-Aminobuttersaeure	174.1	147.1	18.34	1527	1533
32	Unkown4	131	147	18.42	1531	1550
33	Arginin TMS	142.1	207.06	20.39	1615	
34	Glutamat (3TMS)	246.1	156.1	20.49	1619	1626
35	Phenylalanin (2TMS)	217.98	192	20.53	1621	1641
	Triethanolamine					
36	(3TMS)	262.1	188.1	20.68	1628	
37	Laureat (1TMS)	117.1	257.18	21.22	1652	1664
38	Asparagin (3TMS)	231.1	141.1	21.57	1667	1681
39	Putrescin (4TMS)	174.1		23	1733	1745
40	Glutamin (3TMS)	156.08	245.15	23.8	1771	1782
41	Ornithin (4TMS)	142.1	174.1	24.72	1815	1820
42	Citrat (4TMS)	273.05	147.06	24.78	1818	1820
43	Isocitrat (4TMS)	273	147	24.82	1820	1821
	Dehydroascorbat Dimer					
44	(Ascorbat)	173.06	157.05	25.26	1841	1853
45	Tetradecanoat (1TMS)	285.1	117.05	25.41	1849	1852
	Fructose methoxyamin					
46	(5TMS) 1	307.14	217.1	25.88	1872	1866
	Fructose methoxyamin					
47	(5TMS) 2	307.14	217.1	26.08	1882	1875

---

48	Mannose methoxyamin (5TMS)	319.1	204.1	26.25	1890	1894
49	Glucose methoxyamin (5TMS) 1	319.15	205.1	26.37	1896	1890
50	Glucose methoxyamin (5TMS) 2	319.15	205.1	26.72	1914	1908
51	Lysin (4TMS)	174.1	317.2	26.83	1920	1916
52	Mannitol (6TMS) 1	319.15	205.1	27.01	1929	1927
52a	Sorbitol	319.15	205.1	27.19	1938	
53	Tyrosine (3TMS)	319.15	205.1	27.12	1935	1928
54	Analyte RI2032	204.09	217.1	28.97	2032	
55	Hexadecanat (1TMS)	117.25	313.25	29.2	2044	2045
56	Inositol (6TMS)	305.13	191.1	30	2088	2091
57	Octadecanat 1TMS)	341.28	117.1	32.7	2240	2243
58	Analyte RI2377	129.05	112.1	35.1	2377	
59	Contaminant	149.1	167.1	37.3	2528	
60	Saccharose (8TMS)	361	270.98	38.92	2637	2640
61	Analyte RI2663	73.04	204.1	39.3	2663	
62	Galactinol (9TMS)	204.1	217.1	39.48	2675	
63	Unknown 6(sugar)	361.1	217.1	40.06	2716	2744
64	Unknown 7(sugar)	361.1	217.1	40.16	2723	
65	Maltose (8TMS) 1	361.16	217.1	40.34	2735	2741
67	Trehalose (8TMS)	361.16	217.1	40.44	2743	2742
66	Maltose (8TMS) 2	361.16	217.1	40.73	2763	2765
68	Unknown 8	193.1	119.04	43.48	2966	
	Unknown 9					
69	(sugarderivat) Unknown 10	204.1	217.1	43.7	2983	
70	(melibiose)	204.1	217.1	45.57	3119	
71	Unknown 11	351.1	207.03	46.9	3214	
72	b-Sitosterol (1TMS)	129.07	396.37	48.01	3387	3377

---

