

Molekulare Analyse der Chalkonsynthasegene *C2* und *Whp* aus *Zea mays* (L.)

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

des Fachbereiches Biologie

der Universität Hamburg

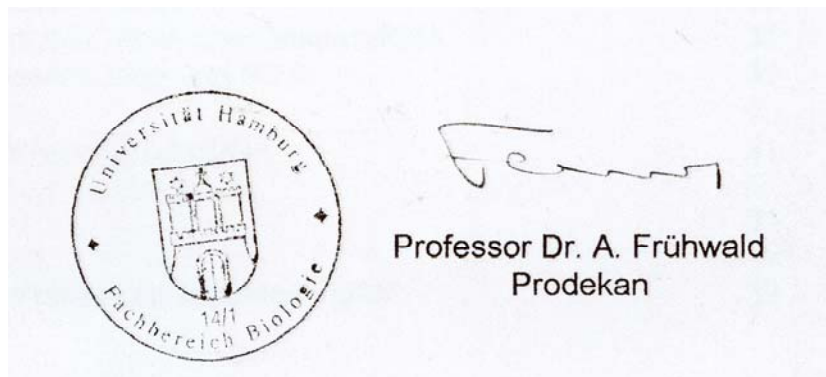
vorgelegt von Helene Kirsch aus Hamburg

Hamburg, 2001

Genehmigt vom
Fachbereich Biologie der
Universität Hamburg
auf Antrag von Herrn Professor Dr. U. Wienand

Weitere Gutachter der Dissertation:
Herr Professor Dr. H. Lörz

Tag der Disputation: 01. Februar 2002



Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	IV
1. Einleitung	1
1.1 Der Anthocyanbiosyntheseweg in <i>Zea mays</i> L.	2
1.1.1 Die Chalkonsynthasegene <i>C2</i> und <i>Whp</i>	11
1.1.2 Beschreibung der dominanten inhibitorischen Mutationen des <i>C2</i> -Gens (<i>C2-Idf</i>) und des <i>Intensifier</i> -Gens (<i>InD</i>)	14
1.2 Zielsetzung der Arbeit	19
2. Material und Methoden	
2.1 Biologisches Material	21
2.1.1 Pflanzenmaterial und Anzucht	21
2.1.2 Bakterienstämme, Phagen und Vektoren	21
2.2 Chemikalien, Enzyme und sonstige Verbrauchsmaterialien	22
2.3 Oligonukleotide	23
2.4 Größenstandards	25
2.5 Puffer und Nährmedien	25
2.6 Isolierung von DNA	27
2.6.1 Isolierung von genomischer DNA	27
2.6.2 Isolierung von Phagen DNA	28
2.6.3 Isolierung von Plasmid DNA	28
2.6.3.1 TELT-Mini-Plasmid-Präparation	28
2.6.3.2 Mini-Plasmid-Präparation für DNA-Sequenzierung	29
2.6.3.3 Maxi-Plasmid-Präparation	29
2.6.4 Isolierung von DNA-Fragmenten und PCR-Produkten aus Agarosegelen	29
2.6.5 Konzentrationsbestimmung von DNA	30
2.7 Isolierung von Gesamt- und Poly(A) ⁺ -RNA	30
2.7.1 Isolierung von Gesamt-RNA	30
2.7.2 Isolierung von Poly(A) ⁺ -RNA aus Gesamt-RNA	31
2.7.3 Konzentrationsbestimmung von RNA	31
2.8 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA	31
2.9 Southern-Blot-Transfer	31
2.10 Analyse von Bakterien-Kolonien durch „Colony Lifts“	32

2.11 Hybridisierung	32
2.12 Waschen der Membran und Detektion der Sonden	33
2.12.1 Waschen der Membran	33
2.12.2 Nachweis radioaktiv markierter Sonden	33
2.12.3 Nachweis Digoxigenin-markierter Sonden	33
2.13 PCR-Analyse	34
2.13.1 Standard-PCR	34
2.13.2 Kolonie-PCR	34
2.13.3 Phagen-PCR	35
2.14 RT-PCR-Analyse	35
2.14.1 cDNA-Synthese	35
2.14.2 RT-PCR	35
2.15 Markierung von Nukleinsäuren	37
2.15.1 Markierung von DNA mit DIG-dUTP durch PCR	37
2.15.2 Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten	37
2.16 Klonierung von DNA-Fragmenten	39
2.16.1 Klonierung von PCR-Fragmenten	39
2.16.2 Klonierung von DNA-Fragmenten in Vektoren	40
2.16.3 Auffüllen von überhängenden Enden	40
2.16.4 Ligation eines DNA-Fragmentes in einen Vektor	41
2.17 Herstellung und Transformation kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	41
2.17.1 Transformation kompetenter Zellen mit der CaCl ₂ -Methode	41
2.17.2 Elektrotransformation	42
2.18 Herstellung und Durchmusterung einer genomischen Bank	42
2.18.1 Herstellung einer genomischen Bank	42
2.18.2 Screening der genomischen Bank	45
2.18.3 Amplifikation der genomischen Bank	45
2.19 Sequenzierung von DNA und computergestützte Auswertung von DNA- und Proteinsequenzen	46
2.20 Biolistische transiente Transformation von Maisembryonen	46
2.20.1 Vorbehandlung der Gewebe	48
2.20.2 Vorbereitung der Transformationsansätze	48
2.20.3 Transformation mit der Partikelkanone	49
2.20.4 Proteinextraktion	50
2.21 Nachweis der Aktivität von Reporter genen	50
2.21.1 Luciferase-Assay	50
2.21.2 β-Glucuronidase-Assay	51

3. Ergebnisse	53
3.1 Expressionsanalyse von regulierenden und strukturellen Anthocyanbiosynthesegenen mittels RT-PCR	54
3.2 Analyse der <i>C2-Idf</i> -Mutante	61
3.2.1 Molekulare Charakterisierung der <i>C2-Idf</i> -Mutante	62
3.2.2 Herstellung und Screening einer <i>C2-Idf</i> genomischen Bank	64
3.2.3 Analyse der <i>C2-Idf</i> -Mutante auf genomischer Ebene mittels PCR	68
3.3 Molekulare Analyse des <i>Whp</i> -Gens aus den Mais-Genotypen <i>C1^S</i> und <i>inc2Whp</i>	79
3.3.1 Isolierung und Charakterisierung von cDNAs des <i>Whp</i> -Gens	80
3.3.2 Analyse der abgeleiteten Proteine der <i>Whp</i> -Sequenzen	89
3.3.3 Isolierung und Analyse einer genomischen <i>Whp</i> -Sequenz aus dem Genotyp <i>inc2Whp</i>	91
3.4 Isolierung und Charakterisierung des <i>Whp</i> -Promotors aus den beiden Genotypen <i>inc2Whp</i> und <i>C1^S</i>	96
3.5 Transiente Transformation von Maisembryonen	101
3.5.1 Herstellung der Promotor-Reportergeren Konstrukte	104
3.5.2 Analyse der Promotor-Aktivität der <i>C2-Idf</i> -Kopie 55	107
3.5.3 Vergleich der Aktivitäten der <i>Whp</i> -Promotoren aus den Genotypen <i>C1^S</i> und <i>LC</i> (Wildtyp)	111
3.5.4 Untersuchungen zur Wirkung des <i>InD</i> -Proteins auf die Promotoren der Strukturgene <i>C2-Idf-55</i> , <i>Whp</i> und <i>A1</i>	114
4. Diskussion	125
4.1 <i>C2-Idf</i> -Mutante	126
4.2 <i>C1^S</i> -Mutante	143
4.3 Das <i>InD</i> -Gen inhibiert die durch <i>C1</i> und <i>R</i> induzierte Promotor-Aktivität der Chalkonsynthesegene	151
4.4 Ausblick	158
5. Zusammenfassung	160
6. Literaturverzeichnis	164
7. Anhang	177

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenosin
Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
C1	<i>Color 1</i>
C1 ^S	<i>Color 1 „strong“</i>
C2	<i>Color-2</i>
C2-Idf	<i>C2-Inhibitor diffuse</i>
ca.	circa
cDNA	komplementäre DNA (complementary – engl.)
CHI	<i>Chalkonflavonisomerase</i>
CHS	<i>Chalkonsynthase</i>
Ci	Curie
CoA	Coenzym A
CSPD	Disodium 3-(4-methoxyspiro{1,2-dioxetane-3,2'-(5'-chloro) tricyclo [3.3.1.1 ^{3,7}]decan}-4-yl) phenyl-phosphat
DAP	Tage nach der Pollinierung (D ays a fter p ollination – engl.)
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DIG	Digoxigenin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Dnase	Desoxyribonuklease
dof	<u>D</u> NA binding with <u>o</u> ne <u>f</u> inger
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DRF	<i>Dihydroflavonol-4-Reduktase</i>
DTT	Threo-1,4-dimercapto-2,3 butandiol
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
dUTP	Desoxyuridintriphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtOH	Ethanol
F3`H	<i>Flavonoid-3`-Hydroxylase</i>
F3H	<i>Flavonoid-3-Hydroxylase</i>
G	Guanosin
gDNA	genomische DNA
GHN	Gewächshausnummer
GST	<i>Glutathion-S-Transferase</i>
GUS	<i>β-D-Glucuronidase</i>
h	Stunde
<i>In</i>	<i>Intensifier</i>
<i>InD</i>	<i>Intensifier dilute</i>
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalacto-pyranosid
kb	Kilobasenpaare
kD	Kilodalton
l	Liter
LC	Mais Wildtyp-Linie (Line C, color converted W22)
<i>Luc</i>	<i>Luciferase</i> aus Feuerfliege <i>Photinus pyralis</i>

M	molar
mg	Milligramm
µg	mikrogramm
min	Minuten
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
mmol	Millimol
mol	Mol
mRNA	Boten-RNA
ng	Nanogramm
<i>nos</i>	<i>Nopalinsynthase-Terminator aus Agrobacterium tumefaciens</i>
°C	Grad Celsius
OD	Optische Dichte
ORF	offener Leserahmen
<i>pAct1</i>	<i>Actin1</i> Promotor aus Reis
<i>PAL</i>	<i>Phenylalanin-Ammonium-Lyase</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pfu	Plaques bildende Einheiten (plaque forming units – engl.)
PTGS –	post-transcriptional gene silencing
pM	Pikomol
RNA	Ribonukleinsäure
Rnase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
rRNA	ribosomale RNA
RNA _i –	interfering
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkription-PCR
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
SSC	Natriumchlorid-Natriumcitrat
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TE	Tris-EDTA
Tet	Tetracyclin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TGS –	transcriptional gene silencing
U	Enzymeinheit (U nit)
<i>UF3GT</i>	<i>UDP-Glucose-3-oxy-Glucosyl-Transferase</i>
UTR	untranslatierte Region
UV	Ultraviolettes Licht
V	Volt
v/v	Volumen/Volumen
Vol.	Volumen
w/v	Gewicht/Volumen (w eicht/ v olumen – engl.)
<i>Whp</i>	<i>White pollen</i>
x g	Erdbeschleunigung
X-Gal	(5-Brom-4-chlor-3-indolyl)-β-D-galactosid

1. Einleitung

Archäologische Auffindungen vermitteln, dass Mais bereits seit vielen Jahren (von 5000 v. Chr. bis 1500 n. Chr.) von Indianerstämmen Südamerikas angebaut wurde. Im 16. Jahrhundert wurde Mais durch die Spanier und Portugiesen nach Europa, Südasien und Afrika gebracht und kurz darauf in allen Kontinenten kultiviert.

Auch heute ist Kulturmais (*Zea mays* L.) eine der wichtigsten Getreidearten, die hinter Weizen (*Triticum aestivum* L.) und Reis (*Oryza sativa* L.) weltweit am häufigsten angebaut wird. Zu den wichtigsten Maisproduzenten gehören die USA, China und Brasilien. In den Entwicklungsländern dient Mais als Grundnahrungsmittel. Da die Maisproteine (*Zeine*) arm an den essentiellen Aminosäuren Lysin und Tryptophan sind, wird Mais in den hochentwickelten Ländern überwiegend als Viehfutter angebaut (Silomais und Körnermais). In der Lebensmittelindustrie werden aus Mais als Nebenprodukte Sirup, Glucose, Maismehl, Corn flakes und vitaminreiches Maisöl gewonnen. Aus dem Rohstoff Maisstärke wird in den Industrieländern eine Vielzahl von Produkten hergestellt: Kunststoffe, Chemikalien, Wasch- und Reinigungsmittel sowie pharmazeutische Produkte.

Aufgrund der wirtschaftlich wichtigen Bedeutung von Mais werden zahlreiche Zuchtziele durch Anwendung von züchterischen, biotechnologischen und molekularbiologischen Verfahren verfolgt: die Verbesserung der Proteinzusammensetzung, eine verbesserte Krankheitsresistenz und die Erzeugung kältetoleranter und frühreifender Maissorten. Dabei liefern molekularbiologische Untersuchungen zur Identifizierung von Genen und zur Aufklärung ihrer Funktion und Regulation wichtige Basisinformationen.

Die Regulation von Genaktivitäten kann auf verschiedenen Ebenen erfolgen, z.B. in den Bereichen Transkription und Translation oder auch durch die Modifikation von Genprodukten.

Der Anthocyanbiosyntheseweg stellt ein gut geeignetes Modellsystem für molekularbiologische Studien zur Regulation der Genexpression dar. Die durch Mutationen von Genen der Anthocyanbiosynthese hervorgerufenen phänotypischen

Veränderungen der Körner sind leicht zu erkennen und für die Pflanze meistens nicht nachteilig. Ein weiterer Vorteil ist, dass eine Vielzahl eigenständiger Nachkommen (Körner auf einem Maiskolben) untersucht werden kann.

1.1 Der Anthocyanbiosyntheseweg in *Zea mays* L.

Anthocyane gehören zu einer Gruppe der sekundären aromatischen Pflanzenstoffe, den Flavonoiden (*flavus* = gelb). Anthocyane sind wasserlöslich und liegen als Glucoside in den Zellsaftvakuolen vor. Durch Glucosylierung von Flavonoiden (Glucose, Galaktose, Arabinose) wird eine höhere Stabilität gegen Oxidation oder enzymatische Degradation erreicht. Anthocyane sind für die blaue bis rote Färbung von Blüten, Samen und anderen Pflanzengewebe verantwortlich und üben mehrere Funktionen in der Pflanze aus. Sie schützen vor Schädigungen durch ultraviolette Strahlung und sind an der Abwehr von Pathogenen wie Viren, Viroiden, Bakterien und Pilzen beteiligt (Stapleton und Walbot, 1993). Durch attraktive Farben von Samen und Blütenblättern werden Tiere angelockt, die für die Verbreitung der Samen und Pollen sorgen (Epperson und Clegg, 1987). Außerdem sind bei einigen Pflanzen Anthocyane für die Entwicklung von fertilem Pollen essentiell (Mo *et al.*, 1992).

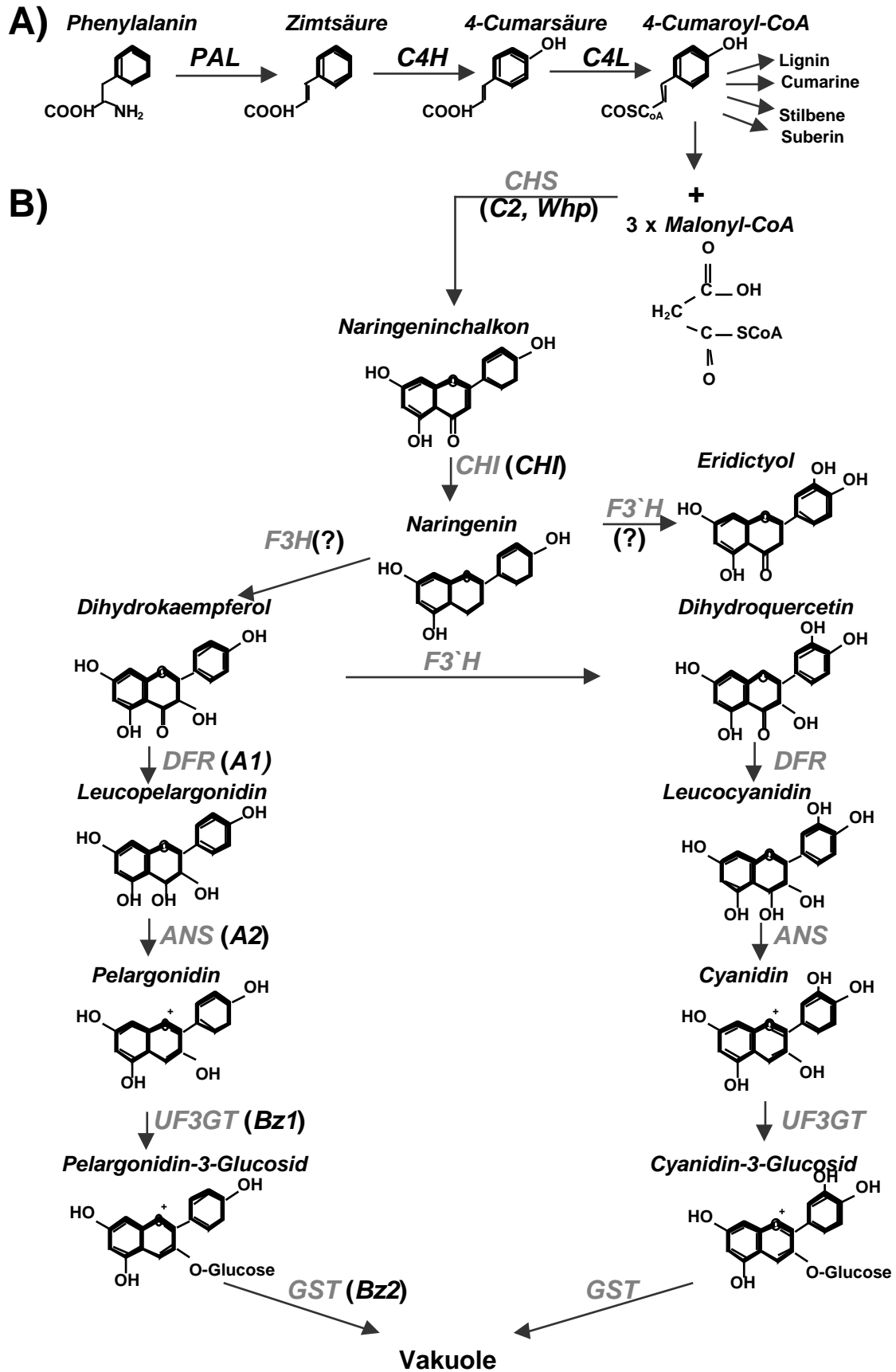
Durch die biochemische Analyse („precursor feeding studies“, McCormic, 1978) von Anthocyanmutanten konnte die Reihenfolge der an der Anthocyanbiosynthese beteiligten Gene bei Mais bestimmt werden.

Als direkte Vorstufe für die Synthese von phenolischen Verbindungen dient Phenylalanin, das aus dem Shikimatbiosyntheseweg hervorgeht. Die oxidative Deaminierung von Phenylalanin zu Zimtsäure wird durch die *Phenylalanin-Ammoniumlyase* (*PAL*) katalysiert (Abb. 1.1-1). *PAL* tritt als Schlüsselenzym bei der Abzweigung des Sekundärstoffwechsels vom Primärstoffwechsel der aromatischen Aminosäuren bzw. Proteine auf. Die Aktivierung von *PAL* erfolgt durch unterschiedliche Faktoren: UV-Licht, Elicitoren und Ethylen. Die Umsetzung von Zimtsäure zu 4-Cumarsäure erfolgt durch die *Zimtsäure-4-Hydrolase* (*C4H*) und führt zur Entstehung von 4-Cumarsäure. Die Modifizierung von 4-Cumarsäure durch die 4-

Cumarin:CoA-Ligase (C4L) führt zu den Ausgangsverbindungen für die Synthese der Flavonoide (Abb. 1.1-1).

Der erste Schritt des Anthocyanbiosyntheseweges ist die Kondensation von drei Molekülen *Malonyl-CoA* mit einem Molekül *4-Cumaroyl-CoA* durch das Schlüsselenzym *Chalkonsynthase (CHS)*. Die Expression der *CHS* wird auch durch verschiedene biotische Faktoren (z.B. Pathogenbefall) und abiotische Stressfaktoren wie Verwundung oder UV-Licht induziert (Kreuzaler *et al.*, 1983). Das entstehende instabile Produkt *Naringenin-Chalkon* wird durch das Enzym *Chalkon-Flavanon-Isomerase (CHI)* zu *Naringenin* modifiziert. Die weitere Umsetzung von *Naringenin* kann auf zwei Weisen erfolgen: 1) In Gegenwart des dominanten *Pr*-Allels entsteht durch eine Hydroxylierungsreaktion mit Hilfe einer *Flavanon-3'-Hydroxylase (F3'H)* *Eridictyol*, das mit Hilfe von *F3H* zu *Dihydroquercetin* hydroxyliert wird. 2) Die Hydroxylierung von *Naringenin* mit Hilfe von *F3H* führt zur Entstehung von *Dihydrokaempferol*, das in der Anwesenheit des *Pr*-Allels durch die Aktivität von *F3'H* zu *Dihydroquercetin* hydroxyliert werden kann. Die weiteren Modifikationen von *Dihydrokaempferol* und *Dihydroquercetin* verlaufen parallel: zunächst erfolgt eine Reduzierung durch die *Dihydroflavonol-4-Reduktase (DFR)* zu *Leucopelargonidin* und *Leucocyanidin*. Die weitere enzymatische Modifizierung von *Leucocyanidinen* zu *Anthocyanidinen* ist noch nicht gut charakterisiert. Heller und Forkmann (1988) behaupten, dass die Entstehung von *Pelargonidin* und *Cyanidin* durch eine Oxidation und eine Dehydrierung durch die *Anthocyanidinsynthase (ANS)* katalysiert wird. Die anschließende Glucosylierung mit Hilfe einer *UDP-Flavonoid-3-Oxy-Glucosyl-Transferase (UF3GT)* führt zu den Endprodukten *Pelargonidin-3-Glucosid* und *Cyanidin-3-Glucosid*, die unterschiedliche Farben aufweisen. Der Transport von fertigen Pigmenten in die Vakuole erfolgt, nach der Anheftung eines Glutathions mit Hilfe einer *Glutathion-S-Transferase (GST)*, durch eine *Glutathion-Pumpe* (Marrs *et al.*, 1995).

Abb. 1.1-1: Der Anthocyanbiosyntheseweg in *Zea mays* L. A) Herleitung des Anthocyanbiosyntheseweges aus dem Phenylpropan-Stoffwechsel. Enzyme – siehe Text. B) Anthocyanbiosyntheseweg: mit grau sind die Abkürzungen der beteiligten Enzyme angegeben: *CHS*–*Chalkonsynthase*, *CHI*–*Chalkon-Flavanol-Isomerase*, *F3H*–*Flavanon-3-Hydroxylase*, *DFR*–*Dihydroflavonol-4-Reduktase*, *ANS*–*Anthocyanidinsynthase*, *UF3GT*–*UDP-Glucose-Flavonoid-3-Oxyglucosyl-Transferase*, *GST*–*Glutathion-S-Transferase*. Strukturgene, die für diese Enzyme kodieren, sind in Klammern angegeben.



An der Pigmentierung von Pflanzengewebe sind sowohl Struktur- als auch Regulatorgene der Anthocyanbiosynthese beteiligt. Die Strukturgene des Anthocyanbiosyntheseweges bei Mais (*C2*, *Whp*, *A1*, *A2*, *Bz1* und *Bz2*) kodieren für diejenigen Enzyme, die durch schrittweise Modifikation entsprechender Substrate letztendlich zu einem farbigen Produkt (*Pelargonidin-3-Glucosid* oder *Cyanidin-3-Glucosid*) führen (Abb.1.1-1). Bis auf das für die *Flavonon-3-Hydroxylase (F3H)* kodierende Gen sind die Strukturgene aus Mais isoliert und charakterisiert worden (Tab. 1.1.-1). Bei der Genisolierung spielten transponierbare Elemente (Transposons) eine zentrale Rolle.

Strukturgen	Genprodukt	Kloniert mit Transp.	Referenz
<i>C2</i> (Colored 2)	<i>CHS</i>	<i>En/Spm</i>	Wienand <i>et al.</i> , 1986
<i>Whp</i> (White pollen)	<i>CHS</i>	<i>C2</i> -cDNA-Sonde	Franken <i>et al.</i> , 1991
<i>CHI</i> (Chalkon isomerase)	<i>CHI</i>	Unter Verwendung der Primer aus konserv. Region des <i>CHI</i> -Gens aus <i>Petunia</i> , <i>Antirrhinum</i> und <i>Phaseolus</i>	Grotewold und Peterson, 1994
<i>Pr</i> (Purple)	<i>F3H</i>	nicht kloniert	Larson <i>et al.</i> , 1986
<i>A1</i> (Anthocyanin 1)	<i>DFR</i>	<i>En/Mu1</i>	O'Reilly <i>et al.</i> , 1985
<i>A2</i> (Anthocyanin 2)	<i>ANS</i>	<i>En/Spm</i>	Menssen <i>et al.</i> , 1990
<i>Bz1</i> (Bronze 1)	<i>UD3GT</i>	<i>Ac</i>	Fedoroff <i>et al.</i> , 1984
<i>Bz2</i> (Bronze-2)	<i>GST</i>	<i>Ds</i>	Theres <i>et al.</i> , 1987

Tab. 1.1-1: Strukturgene des Anthocyanbiosyntheseweges aus Mais (*Zea mays* L.)

Transposons sind bestimmte Genbereiche, die die Fähigkeit besitzen, ihre Position im Genom zu verändern. Für die Transposition dieser Elemente ist ein auf dem Transposon kodiertes Enzym, die Transposase, erforderlich. Nicht alle Transposons einer Familie besitzen jedoch die kodierende Sequenz für dieses Gen. Bei den von B. McClintock (1948) gefundenen *Ac/Ds*-Elementen (*Ac* - activator, *Ds* - dissociation) aus Mais besitzt z.B. nur das *Ac*-Element das für die Transposase kodierende Gen, das *Ds*-Element jedoch nicht. In diesem Fall kann sich das *Ac*-Element unabhängig vom *Ds*-Element bewegen, jedoch erfolgt die Transposition des *Ds*-Elementes nur in Anwesenheit des *Ac*-Elementes (Müller-Neumann *et al.*, 1984;

Pohlmann *et al.*, 1984). Durch die Integration eines transponierbaren Elementes in den Bereich eines Gens, z. B. eines Anthocyanogens, kann die Genaktivität stark beeinflusst oder ganz unterdrückt werden, was im Fall der Anthocyanogene eine Auswirkung auf die Farbausprägung hat.

Im Lauf der Zeit wurden bei Mais andere Transposon-Familien, z.B. *Spm/En* (*En* – Enhancer, *Spm* – Suppressor mutator) und *Mu/MuDR*- (Mutator) gefunden und charakterisiert (Pereire *et al.*, 1985, 1986; Gierl und Saedler, 1992; Bennetzen und Springer, 1994; Qin und Ellingboe, 1990; Talbert *et al.*, 1989; Chandler *et al.*, 1988). Bei anderen Pflanzen (z.B. Sojabohne, Löwenmäulchen) und anderen Organismen konnten ähnliche transponierbare Elemente identifiziert werden: *E. coli*: *IS*- und *Tn*-Elemente; *Drosophila melanogaster copia*-, *fb*- Sequenzen und *P*-Elemente (Kröger und Hobom, 1982).

Mit Hilfe der Transposon-Tagging-Methode (Wienand und Saedler, 1987) wurden mehrere Anthocyanogene aus Mais isoliert und charakterisiert. Die durch die Transposonaktivität veränderten DNA-Abschnitte der betroffenen Gene können mit der AIMS-Methode (Amplification of insertion mutagenized sites) und unter anderem mit der RFLP-Analyse (Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismen) identifiziert werden. Dabei wird die mit Restriktionsenzymen gespaltene DNA aus einer Kontroll-Linie (Wildtyp) und aus der Mutanten-Linie über Gelelektrophorese aufgetrennt. Banden beider Linien miteinander verglichen und hinsichtlich einer Korrelation zwischen den Polymorphismen (Unterschiede im Fragmentmuster) und dem Phänotyp untersucht.

Die Aktivierung der Strukturgene erfolgt entwicklungs- und gewebespezifisch durch die regulierenden Gene *C1*, *P*, *R*, *B*, *Pl*, *In* und *Vp1* (Dooner *et al.*, 1991). Diese Gene kodieren für Transkriptionsfaktoren. In der Tabelle 1.1-2 sind alle bis heute bekannten Regulatorgene der Anthocyanbiosynthese aus Mais zusammengefasst und den Strukturgenen, deren Expression sie beeinflussen sowie ihrem Wirkungsort gegenübergestellt.

Regulatorgen	Strukturgen	Wirkungsgewebe	Referenz
<i>R(S)</i> (Red)	<i>C2, Whp, A1, Bz1</i>	Korn	Perrot und Cone, 1989
<i>C1</i> (Colored1)	<i>C2, Whp, A1, Bz1</i>	Aleuron, Scutellum	Cone <i>et al.</i> , 1986; Paz-Ares <i>et al.</i> , 1986, 1987
<i>In</i> (Intensifier)	<i>Whp, Bz1</i>	Aleuron	Burr <i>et al.</i> , 1996
<i>B</i>	<i>A1, Bz1</i>	grüne Pflanzengewebe (Blattscheide, Hüllblatt)	Chandler <i>et al.</i> , 1989; Styles <i>et al.</i> , 1973
<i>P</i>	<i>C2, Whp, CHI, A1</i>	Perikarp	Chen <i>et al.</i> , 1987
<i>Pl</i> (Purple plant)	<i>Bz1</i>	Pflanzengewebe	Cone und Burr, 1989
<i>Vp1</i> (Viviparous1)	<i>C2, Whp, Bz1, C1</i>	Samen, indirekte Wirkung auf <i>C1</i> -Gen	McCarty <i>et al.</i> , 1988, 1989; Hattori <i>et al.</i> , 1992.
<i>R(P)</i>	<i>A1, Bz1</i>	ganze Pflanze	Dellaporta <i>et al.</i> , 1988
<i>R(Sn)</i>	<i>PAL, C2, Whp, CHI, A1, Bz1</i>	Scutellum	Tonelli <i>et al.</i> , 1991
<i>R(Lc)</i>	Nicht nachgewiesen	Blattspreite	Ludwig <i>et al.</i> , 1989

Tab. 1.1-2: Regulative Gene des Anthocyanbiosyntheseweges aus Mais (*Zea mays* L.)

Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeiten der Anthocyanbiosynthese-Regulatoren zu *myb*- und *myc*-Proto-Onkogenen aus Tieren und Hefen (Dooner *et al.*, 1991; Holton und Cornish, 1995), lassen sich diese Transkriptionsfaktoren aus Mais in zwei Klassen aufteilen:

- *myb*-Transkriptionsfaktoren besitzen eine basische N-terminale Region (DNA-Bindedomäne, die eine Bindung an Promotoren der „Zielgene“ vermittelt) und eine saure C-terminale Region (Aktivierungsdomäne, die mit anderen Proteinen des Transkriptionsapparates interagieren kann) (Paz-Ares *et al.*, 1986, 1987; Goff *et al.*, 1992; Cone und Burr, 1989). Zu dieser Gruppe gehören die *C1*, *Pl*, *P* und *Vp1* Gene.

- *myc*-Transkriptionsfaktoren besitzen eine saure N-terminale Domäne (Aktivierungsdomäne) und eine basische C-terminale Domäne, welche ein basisches Helix-Loop-Helix-Motiv (b-HLH) enthält, das für die DNA-Bindung notwendig ist (Ludwig *et al.*, 1989; Goff *et al.*, 1990). Eine Ähnlichkeit zu dieser Proteinklasse weisen die Produkte der *R*-, *B*- und *In*-Gene auf.

Die Untersuchungen von Coe und Neuffer (1977) sowie von Styles und Ceska (1977) zeigen, dass das *P*-Gen die Synthese von Pigmenten im Perikarp des Maiskorns und im Kolben reguliert (Tab. 1.1-2).

Beim Mais wurden mehrere *R*-Allele isoliert. Diese regulieren die Pigmentierung in unterschiedlichen Pflanzenteilen: das *R(Sn)*-Allel im Scutellum, das *R(S)*-Allel im Maiskorn, das *R(Lc)*-Allel im Blatt und das *R(P)*-Allel in der übrigen Pflanze.

Das *B*-Gen weist eine hohe Homologie zum *R*-Gen auf, da es sich vermutlich um eine Duplikation des *R*-Gens handelt (Coe, 1959; Styles *et al.*, 1973). Das *B*-Gen interagiert mit dem *PI*-Gen und beide gemeinsam sorgen für die Pigmentbildung in mehreren Pflanzenteilen (Styles *et al.*, 1973). Die *PI*-cDNA weist eine hohe Homologie zur *C1*-cDNA auf, so daß es sich bei dem *PI*-Gen möglicherweise um eine Duplikation des *C1*-Gens handelt (Cone *et al.*, 1993).

Im Maiskorn ist das *Vp1*-Gen sowohl an der Reifung als auch an der Pigmentierung des Aleurons beteiligt (Robertson, 1955). Das *Vp1*-Gen wirkt aktivierend auf das *C1*-Gen und dadurch indirekt auch auf die Expression des *C2*-Gens (Hattori *et al.*, 1992). Das Aleuron der Pflanzen, in denen die *vp1*-, *vp-mc*- und *vp-c*-Allele homozygot vorliegen, ist farblos (Robertson, 1965; Scheffler und Peterson, 1985). Biochemische Analysen des *vp1*-Aleurons zeigen, dass die Konzentration von *PAL*-, *CHS*- und *UFGT*-Enzymen im Vergleich zum *Vp1*-Aleuron stark reduziert ist (Dooner, 1983; Dooner und Nelson, 1979). Zusätzlich sind auch Enzyme aus dem Primärstoffwechselweg, wie z.B. die *Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase*, die *Alkohol-Dehydrogenase*, die *Catalase*, die *UDPG-Pyrophosphorylase* und die *Sucrose-Synthase* betroffen (Dooner, 1985).

Das *In*-Gen (*Intensifier*) beeinflusst die Synthese von Anthocyanen im Aleuron negativ, da das Genprodukt vermutlich eine Repressoraktivität besitzt (Coe und Neuffer, 1977; Burr *et al.*, 1996).

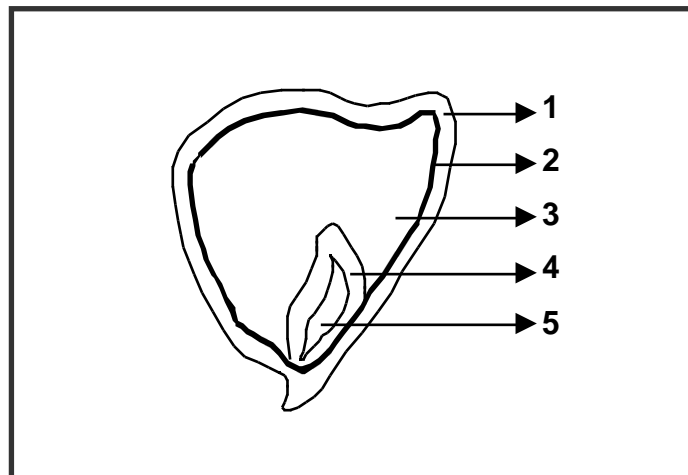


Abb. 1.1-2: Schematische Darstellung eines Querschnitts durch ein Maiskorn. 1) Pericarp, 2) Aleuron, 3) Endosperm, 4) Scutellum, 5) Embryo.

Die Farbe eines Maiskorns wird durch die Synthese und die darauffolgende Akkumulation von Anthocyanen in der Aleuronschicht bestimmt. Das Aleuron ist die stoffwechselaktive einzellige äußere Gewebeschicht des Endosperms (Abb. 1.1-2). Für die Aktivierung der Anthocyanstrukturgene im Aleuron und im Scutellum ist das Vorhandensein von *R*- und *C1*-Genprodukten erforderlich. Die Pigmentierung erfolgt nur, wenn *R*- und *C1*-Gene homozygot dominant vorliegen (Larson, 1989).

Das putative *C1*-Protein ist 273 AS lang und besitzt zwei Domänen: eine basische in der N-terminalen Region (ca. 120 AS), die eine 40%ige Homologie zur DNA-Bindedomäne von *myb*-Transkriptionsfaktoren aufweist und eine kurze saure Domäne (AS 234-261) in der C-terminalen Region, die ein α -Helix-Motiv ausbilden kann (Paz-Ares *et al.*, 1987). Vergleichbare α -Helix-Motive sind auch in den Aktivierungsdomänen vieler Transkriptionsfaktoren enthalten (Ptashne, 1988).

Das von der cDNA-Sequenz abgeleitete *R*-Protein (610 AS) hat eine kurze saure N-terminale Region (220 AS), die vermutlich als Transaktivierungsdomäne wirkt (Goff *et al.*, 1992) und eine lange basische C-terminale Region, die eine Homologie zu Helix-Loop-Helix DNA-Binde-Domänen aufweist (Ludwig *et al.*, 1989). An dem C-terminalen Ende des Proteins ist eine weitere zum *B*- und zum *In*-Protein homologe Region vorhanden, deren Funktion noch nicht verstanden ist.

Es ist bekannt, dass die Expression von Anthocyaninen lichtreguliert ist. Im Promotor des *CHS*-Gens aus Petersilie wurde ein Sequenzelement für die Lichtregulierung, die „G-Box“, mit einem zentralen Sequenzmotiv ACGT, gefunden. Solche Sequenzmotive wurden auch in den Promotoren von *C1*-, *C2*-, und *Whp*-Genen identifiziert. An diese Boxen können Transkriptionsfaktoren der *myc*-Familie binden, die ein bZIP-Motiv aufweisen (Weisshaar *et al.*, 1991). Die bZIP-Proteine enthalten eine basische DNA-Binde-Domäne und eine Leucin-Zipper-Domäne, die für die Dimerisierung von zwei Transkriptionsfaktoren notwendig ist (Dangl *et al.*, 1989). Allerdings ist eine vergleichbare Leucin-Zipper-Domäne bei den bislang bekannten *myc*-ähnlichen Transkriptionfaktoren aus Mais nicht vorhanden.

Es gibt mehrere Hinweise, dass der Anthocyanbiosyntheseweg durch mehrere sowohl biotische, als auch abiotische Faktoren induziert werden kann. Die molekularen Grundlagen der Mechanismen dieser Genregulation konnten jedoch bislang noch nicht endgültig geklärt werden. Die molekulare Analyse von Mutanten des Anthocyanbiosyntheseweges, d.h. von Pflanzen, deren phänotypische Veränderungen in der Farbstoffsynthese auf die Aktivität der Anthocyanogene zurückzuführen sind, können zur Aufklärung dieser Mechanismen beitragen.

Bei Mais sind eine Vielzahl von Farbmутanten bekannt. Am interessantesten sind Mutationen, die einen dominanten Charakter aufweisen. Drei solcher Mutationen sind *C1^S*, *C2-Idf* (*Inhibitor diffuse*) und *InD* (*Intensifier dilute*).

Das *C1^S*-Allel („S“-strong, stark) ist dominant über das regulative *C1*-Wildtyp-Allel (Cone *et al.*, 1986). Die *C1^S*-Mutante weist nicht nur im Aleuron, sondern auch in anderen Pflanzenteilen eine besonders intensive Färbung auf. Die Ergebnisse aus molekularen Analysen dieser Linie zeigen, dass in dem kodierenden Bereich des *C1*-Gens dieses Allels keine Änderungen gegenüber dem Wildtyp-Allel vorhanden sind (Tapp, 1990; Scheffler *et al.*, 1993). Allerdings sind Sequenzunterschiede in den 5`- und 3`-nicht translatierten Regionen (UTRs) vorhanden. Die *C2-Idf*-Mutante unterscheidet sich phänotypisch vollständig von der *C1^S*-Mutante. In dieser Linie sind nicht nur die Körner farblos, sondern auch die Pigmentierung der gesamten übrigen Pflanze ist verringert (Greenblatt, 1975). In dieser Mutante ist das *C2*-Strukturgen, das für das Schlüsselenzym des Anthocyanbiosyntheseweges, die *Chalkonsynthase*

(*CHS*), kodiert, verändert. Die Mutation weist außerdem interessanterweise einen dominant inhibitorischen Charakter auf. Eine genauere Beschreibung dieser Mutante erfolgt in Kapitel 1.1.2.

Desweiteren wurden verschiedene Mutanten für das als Anthocyanbiosynthese-Repressor wirkende regulative *In*-Gen beschrieben. Eine dieser Mutationen wird durch das *InD*-Allel repräsentiert. Das *InD*-Allel (*Intensifier Dilute*) ist ein dominant inhibitorisches Allel über das *In*-Wildtypgen (Coe, 1970; Rojek, 1996). Auch auf diese Mutation wird im weiteren Verlauf (1.1.2) detaillierter eingegangen.

1.1.1 Die Chalkonsynthasegene *C2* und *Whp*

Eine zentrale Rolle im Anthocyanbiosyntheseweg (Abb. 1.1-1) spielt das Enzym *Chalkonsynthase* (*CHS*). Das erste *CHS*-Gen wurde aus Petersilie isoliert (Kreuzaler *et al.*, 1983). Unter Verwendung des *CHS*-Gens aus Petersilie als heterologe Sonde konnten die *CHS*-Gene aus anderen Pflanzen isoliert werden. Bei *Petunia hybrida* konnte das Vorhandensein von 12 *CHS*-Genen nachgewiesen werden, von denen allerdings nur zwei (*chsA* und *chsJ*) exprimiert werden (Koes *et al.*, 1989; Reif *et al.*, 1985). Aus *Antirrhinum majus* wurde ein *CHS*-Gen (*Nivea*) kloniert (Bonas *et al.*, 1984).

Das erste der zwei *CHS*-Gene aus Mais (*C2*, *colored 2*) wurde mit Hilfe der „transposon tagging“ Methode isoliert (Wienand *et al.*, 1986). Das zweite *CHS*-Gen (*Whp*, *white pollen*) wurde unter Verwendung einer *C2*-cDNA-Sonde kloniert (Franken *et al.*, 1991).

Beim Vergleich der DNA- und Aminosäure-Sequenzen des *CHS*-Gens aus Mais (*C2*) mit den *CHS*-Genen aus anderen Pflanzen (Niesbach-Klösigen *et al.*, 1987) wurden Homologien von ca. 66% auf DNA-Ebene und von ca. 83% auf Aminosäure-Ebene gefunden.

Die Sequenzhomologie zwischen den beiden *CHS*-Genen aus Mais, *C2* und *Whp*, beträgt im Bereich der kodierenden Region 95% (Franken *et al.*, 1991). Sequenzunterschiede finden sich im Promotorbereich, den 5`- und 3`-UTRs sowie im einzigen Intron. Die Struktur beider Gene ist schematisch in der Abbildung 1.1.1-1 dargestellt.

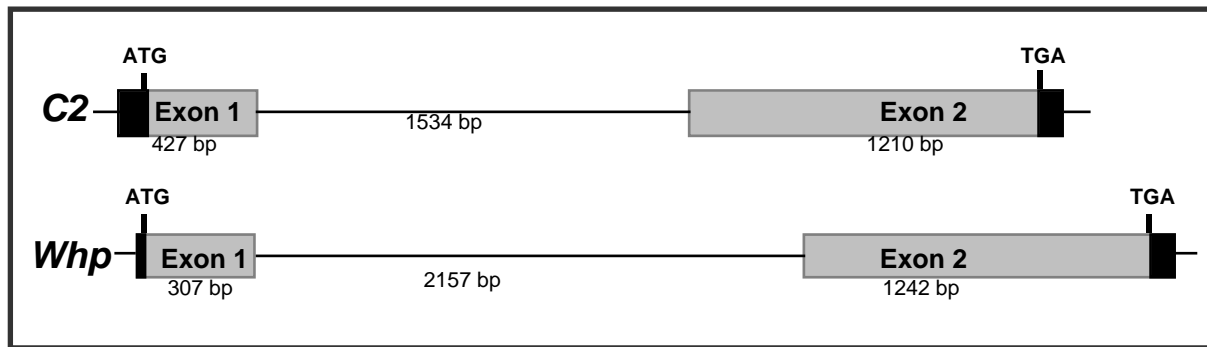


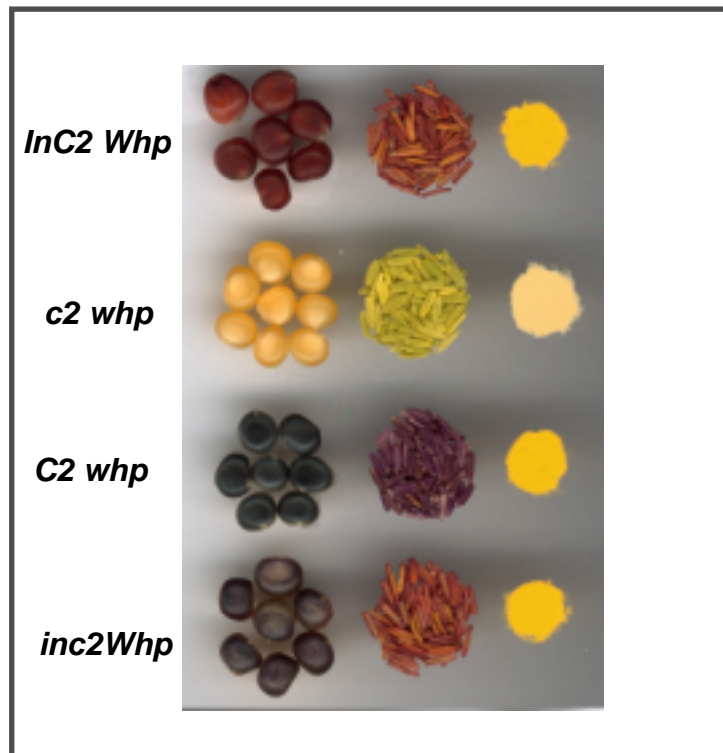
Abb. 1.1.1-1: Schematische Darstellung der Struktur der Chalkonsynthasegene *C2* und *Whp* aus Mais (*Zea mays* L.) Mit grau sind die homologen Exon-Bereiche der beiden Chalkonsynthasegene gekennzeichnet. Mit schwarz sind nicht-homologe Regionen der Exons dargestellt. Die Länge der Exons und Introns ist in Basenpaaren (bp) angegeben.

Im Wildtyp liegen alle Chalkonsynthasegene homozygot dominant vor (*C2/C2,Whp/Whp*) und die Maiskörner weisen eine rote Färbung auf (Abb. 1.1.1-2). Dies bedeutet, dass in der Wildtypelinie beide *CHS*-Gene (*C2* und *Whp*) funktionell sein können und aufgrund der Aktivität von regulativen Genen (*R1*, *C1* und *In*) gewebespezifisch im Aleuron reguliert werden.

Wenn beide Chalkonsynthasegene rezessiv (*c2/c2,whp/whp*) vorliegen, wird keine *Chalkonsynthase* gebildet, was zur Mutation „*white pollen*“ führt. In dieser Mutante sind die Körner, Antheren und Pollen farblos, da ihnen jegliche Flavonoide fehlen (Coe *et al.*, 1981). Die Selbstbefruchtung dieser Linie unterbleibt, weil Pollen ohne Flavonoide conditional steril ist.

Die Anwesenheit eines der zwei funktionellen Chalkonsynthasegene hat eine Pigmentierung der Maiskörnern und fertilen Pollen zur Folge (*c2/c2,Whp/Whp* und *C2/C2,whp/whp*). Allerdings kann das *Whp*-Gen die Funktion des *C2*-Gens nur dann komplementieren, wenn das regulative *Intensifier*-Gen (*In*) homozygot rezessiv vorliegt (Coe und Neuffer, 1977). Die Farbstoffsynthese im Aleuron der Linie *in/in,c2/c2,Whp/Whp* ist deshalb allein auf die Aktivität des *Whp*-Gens

zurückzuführen. In der Linie mit einem dominanten *In*-Allel (*In/In,c2/c2,Whp/Whp*) sind die Maiskörner dagegen farblos (nicht gezeigt). Das homozygot dominante *In*-Gen hat offensichtlich einen inhibitorischen Einfluß auf das *Whp*-Gen im Aleuron. Die genaue Wirkungsweise des *In*-Genproduktes ist jedoch noch nicht bekannt.



1.1.1-2: Darstellung der Phänotypen verschiedener Maislinien. *InC2Whp*: Wildtyp (*wt*), beide Chalkonsynthasegene *C2* und *Whp* liegen homozygot dominant vor; *c2whp*: rezessive Doppelmutante, in der keines der beiden *CHS*-Gene funktionsfähig ist (farblose Körner und steriler Pollen); *C2whp*: nur das *C2*-Gen ist funktionsfähig; *inc2Whp*: das *Whp*-Gen kann die Funktion des *C2*-Gens komplementieren, da das regulative Gen *Intensifier* homozygot rezessiv (*in/in*) vorliegt. Ein dominantes *Intensifier*-Allel übt eine reprimierende Wirkung auf die Expression des *Whp*-Gens, aber nicht auf die Expression des *C2*-Gens aus (Coe und Neuffer, 1977).

Ergebnisse aus Protein- und RNA-Analysen des Aleurons der Linien *In/In,c2/c2,,Whp/Whp* und *in/in,c2/c2,Whp/Whp* von Franken (1991) zeigen, dass in beiden Genotypen gleiche Mengen von *Whp*-spezifischen Transkripten vorliegen, aber nur in der *in/in,c2/c2,Whp/Whp*-Linie das *CHS*-Protein vorhanden ist. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Regulation des *Whp*-Gens durch das *In*-Gen auf der Translationsebene stattfindet.

Hinweise auf die Ursachen für eine Färbung der Maiskörner des Genotyps *in/in,c2/c2,Whp/Whp* wurden von Burr *et al.* (1996) und Herrmann (2000) gefunden. Die Ergebnisse der molekularen Untersuchungen des *in*-Allels und der *in*-cDNAs

zeigen, dass aufgrund der Genstruktur vermutlich keine vollständigen *in*-mRNAs in der Pflanze vorliegen und deshalb auch das Intensifierprotein wahrscheinlich in diesem Genotyp nicht funktionell ist (Herrmann, 2000).

1.1.2 Beschreibung der dominanten inhibitorischen Mutationen des *C2*-Gens (*C2-Idf*) und des *Intensifier*-Gens (*InD*)

Die *C2-Idf*-Mutante:

Bei der Doppelbefruchtung (Nawaschin, 1898) in höheren Pflanzen entsteht in der Regel durch Fusion einer haploiden Spermazelle mit der haploiden Eizelle ein diploider Embryo und durch Fusion einer haploiden Spermazelle mit der diploiden Zentralzelle ein triploides Endosperm. Deshalb liegen im Endosperm nach der Kreuzung von zwei verschiedenen Pflanzen zwei Kopien eines Gens aus der Mutterpflanze und eine Kopie dieses Gens aus der Vaterpflanze vor.

In der Mutante *C2-Idf* (*Inhibitor diffuse*), in der das an der Anthocyanbiosynthese beteiligte *C2*-Gen (*Chalkonsynthase*) betroffen ist, werden im Aleuron keine Pigmente produziert (Greenblatt, 1975). Die Körner dieser Linie sind deshalb farblos. Molekulare Untersuchungen auf RNA- und Proteinebene an Maiskörnern der *C2-Idf*-Linie zeigen, dass in der Mutante keine *C2*-spezifischen Transkripte detektierbar sind (Borchert, 1998). In der Linie konnte außerdem kein *CHS*-Protein nachgewiesen werden (Franken *et al.*, 1991). Transkripte des *Whp*-Gens sind zwar vorhanden, werden aber vermutlich nicht translatiert, weil in der Linie das dominante *In*-Allel vorliegt (siehe 1.1.1).

Die in der vorliegenden Arbeit als Wildtyp eingesetzte Maislinie *LC* (color converted *W22*, *In/In, C2/C2, Whp/Whp*) hat braunrote Körner. Bei der Kreuzung des Wildtyps mit der Linie *C2-Idf* (*In/In, Whp/Whp*) gehen aus der F1 Generation Pflanzen hervor, die im Endosperm zwei *C2*-Allele des Wildtyps und ein Allel der Mutantepflanze haben. Bei diesen Pflanzen ist die Pigmentierung der Maiskörner verringert (Abb.1.1.2-1). Bei der reziproken Kreuzungen ist eine Reduktion der Pigmentierung aufgrund der Zunahme der *C2-Idf*-Allele zu erkennen. Das deutet

darauf hin, dass das *C2-Idf*-Allel einen dominanten inhibitorischen Einfluss auf das *C2*-Wildtyp-Allel hat.

Frühere Untersuchungen lassen vermuten, dass das mutierte *C2*-Gen, im *C2-Idf*-Allel in drei defekten Genkopien vorliegt. Bislang konnten demzufolge auch keine *C2*-Transkripte nachgewiesen werden (Wienand *et al.*, 1991; Borchert, 1998).

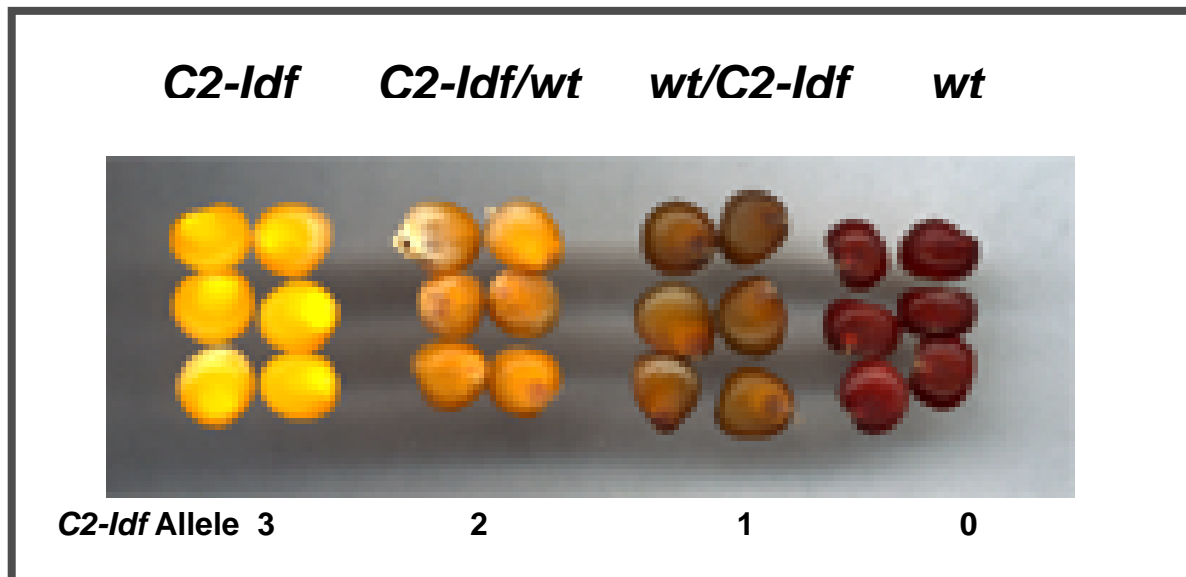


Abb. 1.1.2-1: Phänotypen der Körner der *C2-Idf*-Mutante (*C2-Idf*), des Wildtyps (*wt*), und der reziproken Kreuzungen (*C2-Idf/wt*; *wt/C2-Idf*). Die Anzahl der in den jeweiligen Pflanzen enthaltenen *C2-Idf*-Allele ist unter der Abbildung angegeben. Die Ausprägung des dominanten inhibitorischen Einflusses des *C2-Idf*-Allels auf die Pigmentierung der Aleuronschicht von Maiskörnern ist deutlich sichtbar.

Zwei unvollständige *C2-Idf*-Genkopien wurden bereits teilweise kloniert und durch Sequenzanalyse charakterisiert (Wienand, unveröffentlicht; Borchert, 1998). Die Struktur dieser als Klon 55 (8 kb) und Klon *Qb* (5 kb) bezeichneten genomischen *C2-Idf*-Klone ist schematisch im Vergleich mit dem Wildtyp Allel in der Abbildung 1.1.2-2 dargestellt.

Im Promotorbereich und im 5'-UTR-Bereich der beiden *C2-Idf*-Klone 55 und *Qb* liegen im Vergleich zu dem *C2*-Wildtypallel einige Sequenz-Abweichungen vor. Dieses sind durch 7 Deletionen (von einem bis max. 5 Nukleotiden) und 11 Nukleotidaustausche (Borchert, 1998; Abb. 4.1-2). Im 5'-UTR kommt eine Insertion von 8 Nukleotiden und eine Duplikation von 3 Nukleotiden vor. Im Promotor des *C2*-

Idf-Klons *Qb*, liegt zusätzlich zu diesen Sequenzänderungen liegt eine Insertion (1165 bp) vor, die Homologie zu einem transponierbaren Element der *CACTA*-Gruppe aufweist. Die *CACTA*-Sequenz enthält am 5' und 3'-Ende eine Duplikation von drei Basen (TGA) und die typischen „Sequenzwiederholungen“, was ein charakteristisches Merkmal für die transponierbaren Elemente der *CACTA*-Gruppe ist. Diese Basenduplikation (TAG), die als „footprint“ bezeichnet wird liegt an der gleichen Position im Klon 55 vor. Sie ist offensichtlich durch die Exzision eines inserierten *CACTA*-Elementes entstanden.

Die Sequenzen des ersten Exons der beiden *C2-Idf*-Klone 55 und *Qb* sind mit der Sequenz des Wildtyp-Allels identisch. Ein Unterschied der beiden *C2-Idf*-Genkopien gegenüber dem *C2*-Wildtyp-Allel ist eine Insertion von 239 bp im Intron 1 (Abb. 1.1.2-2).

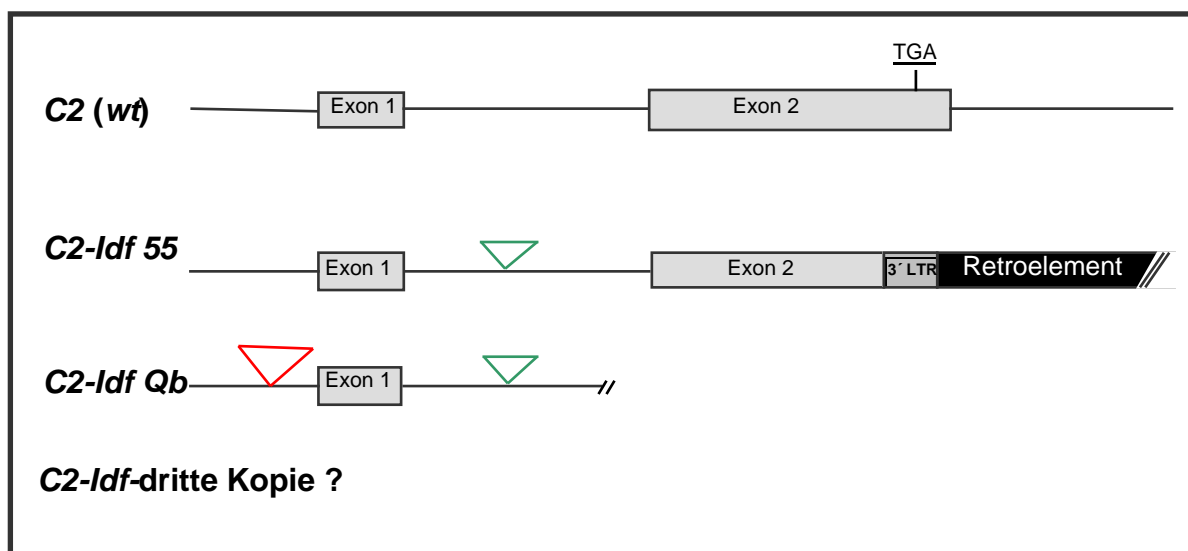


Abb. 1.1.2-2: Schematische Darstellung der *C2-Idf*-Klone *Qb* und 55 im Vergleich mit dem *C2*-Wildtypgen (*C2, wt*). Strukturvergleich der unvollständigen *C2-Idf*-Klone 55 und *Qb* mit dem Wildtyp (nach Daten von Borchert, 1998). Mit einem grünen Dreieck ist eine Insertion im Intron der beiden *C2-Idf*-Klone dargestellt. Der *C2-Idf*-Klon 55 ist im zweiten Exon durch ein Retrotransposon der *PREM-2* Familie unterbrochen. Das Retrotransposon ist in 3'-5' orientiert. Der Bereich des „long terminal repeat“ ist markiert (3'LTR). Mit einem rotem Dreieck ist die Insertion eines *CACTA*-Elementes (1,165 kb) im Promotor des *C2-Idf*-Klons *Qb* gekennzeichnet. Beide *C2-Idf*-Klone sind im 3'-Bereich unvollständig. Die Sequenz der dritten *C2-Idf*-Genkopie ist bislang unbekannt. TGA = Stoppcodon im Exon 2 der *C2*-Wildtypsequenz.

Im *C2-ldf*-Klon 55 ist das zweite Exon durch die Insertion eines Retrotransposons unterbrochen. Der bislang klonierte Teil des Retrotransposons ist 3 kb lang. Die Sequenz des Retroelementes enthält das 3`LTR (long terminal repeat) und einen Teil der kodierenden Region. Die Sequenz des transponierbaren Elementes weist eine 75%ige Homologie zu dem Retrotransposon *PREM-2* (Pollen retro element maize-2, Turcich *et al.*, 1996) aus Mais auf. Auch die Sequenz des *C2-ldf*-Klons *Qb* ist am 3`-Ende unvollständig, die bricht im Intron ab, 275 bp vor Beginn des zweiten Exons. Die Sequenz der aufgrund von Southern-Analysen postulierten dritten *C2*-Genkopie ist zur Zeit noch unbekannt.

Die *InD*-Mutante:

Das regulative *In*-Gen (*Intensifier*) hat einen negativen Einfluss auf die Pigmentbildung und hemmt die Aktivität des *Whp*-Gens im Aleuron (Coe und Neuffer, 1977). Die genomische Wildtyp-Sequenz und die *In*-cDNA wurden bereits kloniert und charakterisiert (Burr *et al.*, 1996). Das putative *In*-Protein weist eine Homologie zu *R*- und *B*-Proteinen aus Mais auf, die wiederum eine Ähnlichkeit zu *myc*-Transkriptionsfaktoren zeigen.

Wenn das *In*-Gen rezessiv vorliegt (*in*), ist die Pigmentierung in der Aleuronschicht verstärkt (Fraser, 1924). Die molekulare Analyse der *in*-cDNAs und der genomischen Sequenz des *in*-Allels lässt vermuten, dass kein vollständiges Protein synthetisiert werden kann, da im Intron 2 ein langes Retroelement inseriert ist. Zwar liegen kurze polyadenylierte *in*-Transkripte vor, diese enthalten jedoch nur einen sehr geringen Teil der kodierenden Sequenz (Herrmann, 2000).

Das *InD*-Allel (*Intensifier dilute*) ist eine mutierte Form des *In*-Gens des Wildtyps. Im Vergleich zum *In*-Allel weist das *InD*-Allel eine verstärkte inhibitorische Wirkung auf die Pigmentsynthese im Aleuron auf. Der Anthocyangehalt in der *InD*-Linie ist im Vergleich zum Wildtyp um 75% geringer (Rojek, 1996). Die Maiskörner der *InD*-Linie weisen nur eine hellrosa Pigmentierung auf. Bei der Kreuzung des

Wildtyps mit der *InD*-Linie ist eine Reduktion der Pigmentierung mit Zunahme der *InD*-Allele zu beobachten (Abb. 1.1.2-3), was darauf hindeutet, dass das *InD*-Allel, ebenso wie das *C2-Idf*-Allel, einen dominanten inhibitorischen Einfluss auf das *In*-Wildtyp-Allel besitzt.

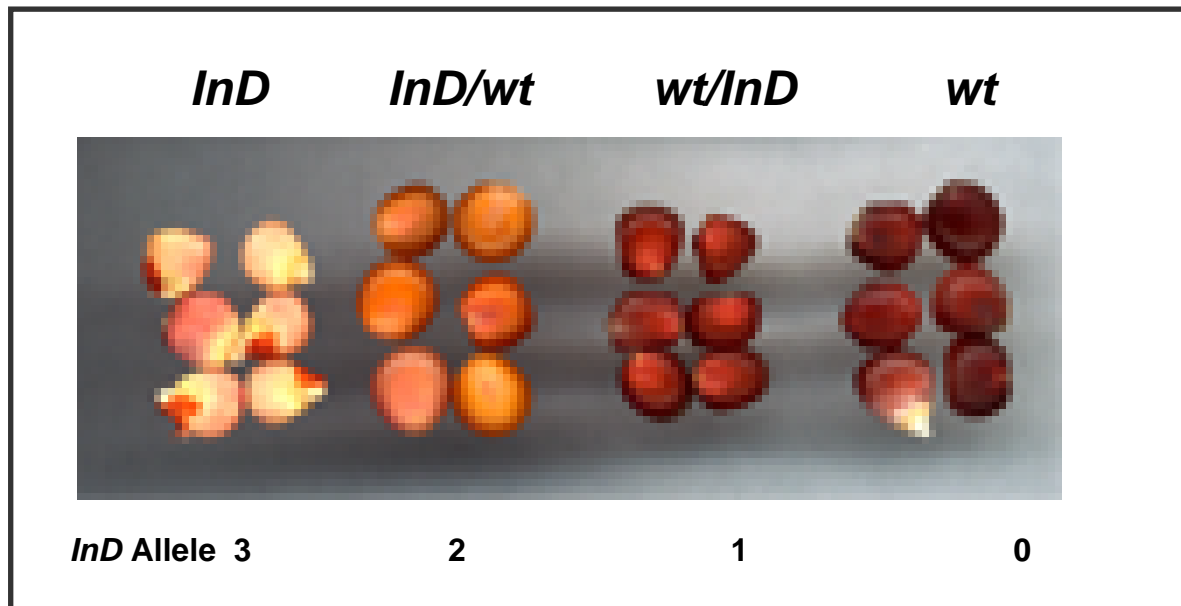


Abb. 1.1.2-3: Phänotypen der Körner der *InD*-Mutante (*InD*), des Wildtyps (*wt*), und der reziproken Kreuzungen (*InD/wt*; *wt/InD*). Die Anzahl der in den jeweiligen Pflanzen enthaltenen *InD*-Allele ist unter der Abbildung angegeben. Die Ausprägung des dominanten inhibitorischen Einflusses des *InD*-Allels auf die Pigmentierung der Aleuronschicht von Maiskörnern ist deutlich sichtbar.

Durch Northern- und Western-Blot Analysen mit Proben aus dem Aleuron von Pflanzen der Kreuzung zwischen der *InD*-Linie und dem Wildtyp konnte gezeigt werden, dass bei Zunahme des *InD*-Allels zwar die gleiche Menge an *CHS*-Transkripten vorhanden ist, es jedoch zu einer Abnahme des *CHS*-Proteins kommt (Rojek, 1996).

Die molekularen Untersuchungen des *InD*-Allels auf genomischer und cDNA-Ebene zeigten, dass die abgeleitete Aminosäuresequenz des *InD*-Proteins homolog zu den Proteinen *In*, *R* und *B* ist, aber einige Unterschiede in der Aminosäuresequenz im Bereich der Transaktivierungsdomäne besitzt (Rojek, 1996).

1.2 Zielsetzung der Arbeit

Obwohl, die Ergebnisse aus den bislang durchgeführten molekularen Forschungen über Anthocyanbiosynthese-Mutanten viel zur Aufklärung der Genregulation des Anthocyanbiosyntheseweges beigetragen haben, sind viele Frage noch nicht vollständig geklärt.

In den Maislinien *C2-Idf* und *C1^S* sind einerseits ein regulatives Gen und andererseits ein Strukturgen der Anthocyanbiosynthese mutiert. Die Aktivität beider Gene ist entscheidend für die Funktion des Anthocyanbiosyntheseweges in Mais. Da bei der Anthocyanbiosynthese die Struktur- und die Regulatorgene sehr komplex miteinander in Wechselwirkung stehen, soll in der vorliegenden Arbeit zunächst untersucht werden, welchen Einfluss die Mutationen *C2-Idf* und *C1^S* auf andere Gene der Anthocyanbiosynthese ausüben. Zur Klärung dieser Frage sollen die *C2-Idf*- und die *C1^S*-Linie hinsichtlich der Expression von Anthocyanbiosynthesegenen im Aleuron mittels RT-PCR untersucht werden. Auf diese Weise sollen Hinweise auf die Mechanismen gefunden werden, wie die mutierten Gene eine veränderte Anthocyanbiosynthese hervorrufen. Basierend auf den erhaltenen Ergebnissen soll begonnen werden, mögliche Gründe für signifikante Veränderungen in der Expression einzelner Gene zu identifizieren.

Um weitere Antworten zur inhibierenden Funktion des *C2-Idf*-Allels zu finden, soll die genomische Struktur der *C2-Idf*-Genkopien in Fortführung vorhergehender Arbeiten (Wienand *et al.*, 1991; Borchert, 1998) weiter charakterisiert werden.

Einen weiteren Schwerpunkt der Arbeit soll die Analyse des Schlüsselenzyms der Anthocyanbiosynthese, die *Chalconsynthase* bilden. Im Mais sind zwei Chalkonsynthasegene, *C2* und *Whp* vorhanden. Während die genomische Sequenz und die cDNA-Sequenz des *C2*-Gens bereits isoliert und charakterisiert worden ist (Wienand, 1986), ist vom *Whp*-Gen bislang nur die genomische Sequenz und ein Teil der cDNA bekannt (Franken, 1991). Da verschiedene Versuche zur Klonierung der vollständigen *Whp*-cDNA bislang erfolglos verlaufen sind (Franken, Rojek, unveröffentlicht), soll im Rahmen der vorliegenden Arbeit die *Whp*-cDNA kloniert und analysiert werden.

Die Regulation verschiedener Strukturgene der Anthocyanbiosynthese scheint auf komplexe Art durch verschiedene regulatorische Gene sowohl auf der Ebene der Transkription als auch ebenfalls der Ebene der Translation zu erfolgen (1.1). In dieser Arbeit soll deshalb der regulierende Einfluss der *myc*- und *myb*-homologen Regulatoren *C1*, *R* und *InD* auf die Promotoren der beiden Chalkonsynthasegene untersucht werden. Für diese Untersuchungen sollen transiente Expressionsanalysen mit Hilfe eines Reportergensystems durchgeführt werden.

Ziel dieser Experimente ist es, die Kenntnisse über Protein- und Protein-DNA-Interaktionen bei der Regulation dieses Biosyntheseweges zu vertiefen.

2. Material und Methoden

2.1 Biologisches Material

2.1.1 Pflanzenmaterial und Anzucht

Alle in dieser Arbeit verwendeten Pflanzenlinien sind in der Tabelle 2.1.1-1 beschrieben.

Genotyp	Ac-Nummer	GH-Nummer	Anwendung
<i>LC</i>	Ac Zm 3046	1623	RT-PCR, PCR Biolistische Transformation
<i>C2-Idf</i>	Ac Zm 559	1620,1842	genomische Bank, RT-PCR, PCR, genomische Klone
<i>C1^S</i>	Ac Zm 578 C ^S	1621	RT-PCR, PCR, <i>Whp</i> -cDNA, <i>Whp</i> - Promotor
<i>in,c2,Whp</i>	Ac 92-18	198	RT-PCR, <i>Whp</i> -cDNA
<i>in,c2,Whp</i>	Ac Zm 1805	1808	PCR, <i>Whp</i> -Promotor, genomischer <i>Whp</i> -Klon
<i>in,C2/c2,whp</i>	Ac Zm 1911 (9414)	2275	Biolistische Transformation
<i>in,C2/c2,whp</i>	Ac 3484	3484	Biolistische Transformation

Tab. 2.1.1-1: Verwendete Maislinien.

Die Maispflanzen wurden im Gewächshaus mit einer sechzehnständigen Lichtperiode bei 24°C und einer achtständigen Dunkelperiode bei 16°C angezogen. Die Lichtstärke betrug 24.000-25.000 Lux bei einer Luftfeuchtigkeit von 55-95%.

2.1.2 Bakterienstämme, Phagen und Vektoren

E. coli-Stämme:

XI1-Blue-MRA (P2)	$\Delta(\text{mcrA})183 \Delta(\text{mcrCB-hsdSMR-mrr})173 \text{ endA1 supE44 thi-1 gyrA96 relA1 lac (P2 lysogen) (Stratagene)}$
XI1-Blue	$\text{recA1 endA1 GYRA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac}[F'proAB \text{ lacI}^q \Delta M15 \text{ Tn10 (Tet}^r)]$
DH5 α F'	$F' \text{ endA1 hsdR17 (r}_K^- \text{m}_K^+) \text{ supE44 thi-1 recA1 gyrA (Na}^+) \text{ relA1}\Delta(\text{lacIZYA-argF}) \text{ U169 deoR } (\Phi 80\text{dlac}\Delta(\text{lacZ})\text{M15})$
TOP 10'	(Invitrogen)

Phagemid

Lambda *DASH*[®]II/*EcoRI* (Stratagene)

Vektoren:

pCR[®] 2.1-TOPO[®] Ampicillin, Kanamycin (Invitrogen)

Plasmid-Konstrukte:

Luciferase-nos-pUC 119 (statt <i>NheI</i> - <i>Bam</i> HI)	(Baum, Dissertation, Hamburg, 1999)
p108-C2 Gen	(Wienand <i>et al.</i> , 1986)
p 37 C2-cDNA	(Wienand, Hamburg, AMP I, unveröffentlicht)
p 38 C2 Promotor (0.8 <i>Hinf</i> I)	(Wienand, Hamburg, AMP I, unveröffentlicht)
p 55 C2- <i>Idf</i> Klon 55	(Wienand, Hamburg, AMP I, unveröffentlicht)
p <i>Qb</i> C2- <i>Idf</i> Klon <i>Qb</i>	(Borchert, Dissertation, Hamburg, 1998)
p102-Whp Gen	(Franken <i>et al.</i> , 1991)
p 179 A1-Prom.In/Ex-Luc-nos	(Schrell, Dissertation, Köln, 1991)
p <i>Act1</i> -R1-cDNA-nos	(Reddy, Hamburg, AMP I, unveröffentlicht)
p <i>Act1</i> -C1-cDNA-nos	(Reddy, Hamburg, AMP I, unveröffentlicht)
p <i>Act1</i> -InD1-cDNA(InD1, Klon 2.1, TG2.1)-no	(Hoffmann, Hamburg, unveröffentlicht)
35S-Luciferase-nos	(Montgomery <i>et al.</i> , 1993)
35S-β-Glucuronidase-nos	(Montgomery <i>et al.</i> , 1993)
p 39 (<i>R</i> -cDNA)	(Wessler, Wienand, Hamburg, AMP I)
p 1 (<i>C1</i> -cDNA)	(Paz Ares <i>et al.</i> , 1987)
p 30 (<i>A1</i> -cDNA)	(O`Reilly <i>et al.</i> , 1985)

Alle Konstrukte besitzen eine Ampicillinresistenz.

2.2 Chemikalien, Enzyme und sonstige Verbrauchsmaterialien

Alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden, sofern nicht anders beschrieben, im Reinheitsgrad „p.A.“ oder reinst von den nachstehenden Firmen bezogen:

Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)	MBI-Fermentas (St. Leon-Rot)
Biometra (Göttingen)	Gibco BRL (Eggenstein)
Biomol (Hamburg)	Boehringer Mannheim (Mannheim)
Bio Rad (München)	Biozym (Oldenburg)
Merck (Darmstadt)	Stratagene (Heidelberg)
Roth (Karlsruhe)	Sigma (München)
Pharmacia (Freiburg)	Qiagen (Hilden)
Serva (Heidelberg)	Roche (Mannheim)

Kits

Lambda DASH[®] II/*Eco*RI Vector Kit, Stratagene (Heidelberg)
 Gigapack[®] III Gold Packaging Extract, Stratagene (Heidelberg)
 Qiagen[®] Lambda Midi Kit, Qiagen (Hilden)
 TOPO[®] TA Cloning-Kit, Invitrogen (Groningen, NL)
 PolyA Tract[®] mRNA Isolation System IV Promega
 Concert[™] Rapid Plasmid Miniprep, Life Technologies/Gibco BRL (Karlsruhe)
 Concert[™] Rapid Plasmid Maxiprep, Life Technologies/Gibco BRL (Karlsruhe)

GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit, Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)
 Prime It[®] II Random Prime Labeling Kit, Stratagene (Heidelberg)
 DNA-labeling Kit, Boehringer Mannheim, (Mannheim)
 Luciferase Assay System (Promega, USA)
 Gus-light[™] chemiluminescent reporter gene assay System (Tropix, PE Biosystems, Bedford, USA)

Membranen und Röntgenfilme

Nylon-Membran: Hybond[™] NX, Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)
 Nitrocellulose Membran: Hybond[™] C-pure, Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)
 Röntgenfilm: Hyperfilm[™] -MP, Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)

Enzyme

Taq-DNA-Polymerase 5U, Life Technologies/Gibco BRL (Karlsruhe)
 T4-DNA-Ligase 1U, Life Technologies/Gibco BRL (Karlsruhe)
 Restriktionsendonucleasen 10U, Life Technologies/Gibco BRL (Karlsruhe); MBI Fermentas (St. Leon Roth)
 DNase I (RNase frei) 10U, Life Technologies/Gibco BRL (Karlsruhe)
 RNaseOUT[™] RNase-Inhibitor 40U, Life Technologies/Gibco BRL (Karlsruhe)
 Rnase A, Life Technologies/Gibco BRL (Karlsruhe)
 Super Script[™] II Reverse Transkriptase 200U, Life Technologies/Gibco BRL (Karlsruhe)
 Klenow-Fragment I der *E.coli* DNA-Polymerase) 5U, Life Technologies/Gibco BRL (Karlsruhe)

2.3 Oligonukleotide

Die Synthese spezifischer Oligonukleotide erfolgte bei Gibco-BRL (Eggenstein).

Tab. 2.3-1: Liste der verwendeten genspezifischen Primern.

Bezeichnung	Sequenz 5`-3`	Bindestelle	Tm °C
C2-Promotor 5`-800	<u>gggTcgAccTAcTAcTAgTAcTAc</u> TgTgT	5`-C2 Promotor, mit <u>SalI</u> : 795-775	66
C2/Idf-Promotor 3`-Bereich	<u>ccgTcgAccgTcgTcgTcgTccTcTcccc</u> Tc	3`-C2-Idf, nach dem ATG mit <u>SalI</u> : 216-239	75
JK5` C2-04	AgcgTTAcATgcAccTgA	5`-Exon 2: 1.973-1.990	49
JK3` C2-17	cATcTcgTcgAggATgAAgAgg	3`-Exon 2: 2.821-2.799	59
JK5` C2-23	ccgcc <u>TgA</u> TTcATcgATTcATcAAcg	5`-Exon 2 / mit <u>TgA</u> ins 3`-UTR	72
JK3` C2-24	cgTTgATgAATcgATgAA <u>TcA</u> ggcgg	3`, mit <u>TgA</u> ins Exon 2(rück. v. 23)	72
JK3` C2-25	gTgcgAcTgAcAgTAcATg	3`-UTR ins Exon 2	56
JK5` C2-Idf-26	CgTccTcTTcgTgAAAgTcgccTAg	5`-55-spez., im RETRO-Element	78

Bezeichnung	Sequenz 5'-3'	Bindestelle	Tm °C
JK5' C2-ldf-27	gcAcAcAcTcAcAgAcTcAcAg	5'-ldf-Intron, vor dem Insert	68
JK5' C2-ldf-28	gcTgTTgTgTAgTAcAccAcAcc	5'-Qb-spezifisch., CACTA-Element	70
JK3' C2-35	TcAggTgcATgTAacgT	3'-rück. von JK5' C2-04, Exon 2: 1.973-1.990	49
JK5' C2-ldf-36	gggccTAATcATcgTc	Intronbereich, hinter der Insertion	50
JK5' C2-37	gccgTgcccTAccAAcA	5'-C2-Intron, im Bereich der ldf-spezifischen Insertion	60
JK5' C2-38	gAAATTcAAgAggATgTg	5'-Ende des Exons 1	50
JK5' C2 UTR-41	<u>AAgTcgAcccAcAgcTcccAcAcAcA</u>	5'-Anfang ORF, mit <u>SalI</u> , (Schmidt, Uni. Hamburg, 2000; C2-Vor)	77
JK5' PREM-42	ccATccAccTTTTggAAc	5'-ldf-55 spez., im RETRO (Pos. 5.673)	49
JK5' PREM-3'LTR-44	TgAAAgTcgccTAgAgg	5'-Bereich im PREM-2 vom 3' LTR	49
JK5' Whp-18	AgcggTAcATgcAccTgAcggA	5'-Exon 2 (Anfang): 3.323-3.344	65
JK3' Whp-19	cgTAgTcgggTcgTTcATgTcTggAg	3'-Exon 2,3, UTR: 4.363-4.345	62
JK5' Whp-22	ccATTAAGAcTAGcTAAcTAGcgT	5'-Exon 1 (Anfang ORF): 892-915	67
JK3' Whp-31	AcgcTAGTTAgcTAGTcTTAATgg	3'-rück. von 5'-22 (30 bp vor der TATA-Box)	67
JK5' Whp-32	AcgTAcATgTTccTAAATcgTAAc	5'-Bereich, 360 bp vor der TATA-Box (16-40)	70
JK5' Whp-33	gcTAGggcAcAgcAgTAcgATAcA	5'-Intron	76
JK5' Whp-34	gccATggTcATgccATgcAgg	5'-Bereich des Intron Richtung Exon 2	68
JK5' Whp-39	cAAATcTgAATTTTccgAAgA	Whp-Promotor 1 kb vor ATG	56
JK3' Whp-40	<u>AAgTcgAccgATcgTcTcTcTTccTc</u>	3' nach ATG, mit <u>SalI</u> , (Schmidt, Uni. Hamburg, 2000; SWhpR)	68
JK5' R1-03	TAAgAcTAAgAgAAgcccAg	5'-Exon 7/1: 168-1.188	51
Nat-OL-009(3'R1)	cgATgTccAAATTTccAgcTg	3'-Ende des R1-Gens (Techen, Uni. Hamburg)	57
JK5' A1-10	gcAAgTgTcTgcTcAcTcAgT	5'-Exon 1/19-40	59
JK3' A1-11	cATccggTcATcTTgAcg	3'-Exon 3/761-780	59
JK5' C1-12	TgcgTcggTgcggcAAgAgc	5'-Exon 2/ 1.303-1.323	63
JK3' C1-14	ccTcAcgTcgTccATccAgTc	3'-Exon 3/2.045-2.065	56
5' ZmRPL39 a	cAcgcAccTAGggTTTTcgc	5'-Rib.-Gen (Dresselhaus <i>et al.</i> , 1999)	62
3' ZmRPL39 e	cgTTgATcAAcTgTggAccTcA	3'-Rib.-Gen (Dresselhaus <i>et al.</i> , 1999)	62

Für Sequenzreaktionen und zur Amplifikation der Klone aus dem Polylinker von pUC 119 und pCR[®] 2.1-TOPO[®] (Invitrogen) wurden Vektorprimer verwendet:

T3: 5'-AAT TAA CCC TCA TCA AAG GG-3'
T7: 5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG-3'
MB (M 13 for): 5'-GTA AAA CGA CGG CCA GT-3'
BT (M 13 rev): 5'-CAG GAA ACA GCT ATG AC-3'

2.4 Größenstandards

In der Arbeit wurden folgende DNA Längenstandards verwendet:

Smart-Ladder	Eurogentec (Seraing, Belgien)
1 kb Ladder	Boehringer Mannheim (Mannheim)
DNA molecular marker II	Roche (Mannheim)
DNA molecular marker III	Boehringer Mannheim (Mannheim)

2.5 Puffer und Nährmedien

Die Herstellung allgemeiner Puffer und Medien und die Durchführung molekularbiologischer Standardmethoden erfolgte nach Sambrook *et al.* (1989). Bei Verwendung von Kits oder anderen Reagenzien wurden, wenn nicht anders angegeben, die Angaben des Herstellers befolgt.

Lösungen für Hybridisierungspuffer:

50 x Denhardt's: 5 g Ficoll
5 g Polyvinylpyrrolidone
5 g BSA
ad 500 ml H₂O

20 x SSPE: 1,4 M NaCl
0,2 M NaH₂PO₄
20 mM EDTA, pH 7,4

Nährmedien:

LB-Medium: 10 g Caseinhydrolysat;
5 g Hefeextrakt
10 g NaCl
ad 1 l H₂O (pH 7,4)

NZY-Medium:	10 g NZ-Amine (Caseinhydrolysat) 5 g Hefeextrakt 5 g NaCl 2 g $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ ad 1 l H_2O (pH 7,4)
LB-Agarplatten:	1 l LB-Medium, 15 g Bacto-Agar
NZY-Agarplatten:	1 l NZY-Medium, 15 g Bacto-Agar
NZY-Top-Agar:	1 l NZY-Medium, 7,5 g Agarose
Ampicillin-Stammlösung:	100 mg/ μl Ampicillin
IPTG-Stammlösung:	100 mM IPTG
X-Gal-Stammlösung:	40 mg/ml X-Gal in Dimethylformamid

Stocklösungen für N6 1 100 25₇₀₀ Medium:

<i>N6 Macrosalze</i> (V 1 l):	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 4,63 g KNO_3 28,30 g $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ 1,66g $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ 1,85 g KH_2PO_4 4,0 g ad 1 l H_2O (autoklavieren)
<i>N6 Microsalze</i> (V 100 ml):	H_3BO_3 160 mg $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ 387 mg $\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ 150 mg KJ 80 mg ad 100 ml H_2O (autoklavieren)
<i>Fe/EDTA</i> (V 200 ml):	EDTA 744 mg und $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ 705 mg getrennt in je 100 ml H_2O lösen, erwärmen, unter Rühren zusammengeben und langsam unter Rühren abkühlen lassen. Wenn die Lösung ausfällt, nochmals erwärmen. Lichtgeschützt aufbewahren.
<i>N 6 Vitamine</i> (V 100 ml):	Thiamin-HCl 0,1 g Glycine 0,2 g Pyridoxine-HCl 0,05 g Nicotinacid 0,05 g in 100 ml Wasser lösen, steril filtrieren in 5 ml Aliquots einfrieren.

Inositol 50 mg/ml, in Wasser lösen und steril filtrieren.

2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (2,4-D) 1 mg/ml in etwas Wasser anlösen. Löst sich erst vollständig nach Zugabe von etwas 1 M KOH. Auf Endvolumen auffüllen, steril filtrieren.

Zunächst wird ein 2 x N6 Medium hergestellt, welches danach im Verhältnis 1:1 mit 1.5% Phytogel (von Sigma, autoklavieren) gemischt wird und dann zum Erstellen von Festmedium in Petrischalen verwendet wird.

Für 1 l 2x N6 1 100 25₇₀₀ Medium:

N6 Macro	200 ml	Inositol	4 ml
N6 Micro	2 ml	Silbernitrat	3,4 mg (1 ml)
Na/FeEDTA	4 ml	2,4-D	2 ml
N6 Vitamine	2 ml	Casaminosäuren	200 mg
Sucrose	300 g	Prolin	5,8 g

pH 5,8; Lösung in 200 ml Aliquots steril filtrieren.

2.6 Isolierung von DNA

2.6.1 Isolierung von genomischer DNA

Genomische DNA wurde aus Blattmaterial von Mais nach Dellaporta *et al.* (1983) isoliert. In flüssigem Stickstoff wurde das Blattmaterial zu feinem Pulver gemörsert und in 15 ml Extraktionspuffer (100 mM Tris-HCl, pH 8; 500 mM NaCl; 50 mM EDTA) aufgenommen. Nach Zugabe von 2 ml 10% SDS wurde der Ansatz kräftig gemischt, 20 min bei 65°C in einem Wasserbad inkubiert und anschließend einer Kalium-Acetat-Fällung (5 ml 5 M KAc) für 20 min bei -20°C unterworfen. Der nach der Zentrifugation (35 min, 4°C, 4000xg) erhaltene Überstand wurde durch Miracloth filtriert und einer Fällung mit 10 ml eiskaltem Isopropanol für 30 min bei -20°C unterworfen. Der Fällungsansatz wurde abzentrifugiert (35 min, 4°C, 4000xg) und das getrocknete Pellet in 0,7 ml TE (50 mM Tris/10 mM EDTA, pH 8) resuspendiert. Dann wurde der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt und nach Zugabe von RNase (1 µl RNase, 10 mg/ml) 30 min bei 37°C inkubiert. Nach RNase-Verdau und zweimaliger Phenolisierung wurde die erhaltene wässrige Phase mit 1/10 Volumen Na₂Acetat (3 M, pH 5,2) in Isopropanol präzipitiert und gewaschen. Das getrocknete Pellet wurde dann in 150 µl TE (10:1) aufgenommen und die DNA-Menge bestimmt (2.6.5). Die Lagerung der DNA erfolgte bei 4°C.

2.6.2 Isolierung von Phagen DNA

Die Anzucht der Phagen für eine Midi-Präparation erfolgte mittels Plattenlysats. Dafür wurde eine 50 ml Übernachtskultur des *E. coli*-Stammes XL1-Blue-MRA (P2) in LB-Medium (10 g Caseinhydrolysat, 5 g Hefeextrakt, 10 g NaCl, H₂O ad 1 l, pH 7,4; Sambrook *et al.*, 1989) + 0,2% (w/v) Maltose hergestellt. Nach einer fünfzehnminütigen Zentrifugation der Bakterienzellen bei 6000xg und 4°C wurde das Zellsediment in 10 mM MgSO₄ auf eine Zelldichte von ca. OD₆₀₀ = 1,0 eingestellt.

Ein Phagen-Plaques wurde mit einer sterilen Pasteurpipette ausgestochen, in ein Eppendorfgefäß mit 200 µl SM-Medium (100 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 7,5; Sambrook *et al.*, 1989) gegeben und 1 h eluiert. 100 µl der Bakteriensuspension wurden mit 10 µl des resuspendierten Phagen-Plaques gemischt und 20 min bei 37°C inkubiert. Die Phagen/Bakterien-Mischung wurde dann zu 4 ml verflüssigtem Top-Agar (10 g NZ-Amine (Caseinhydrolysat); 5 g Hefeextrakt; 5 g NaCl, 2 g MgSO₄ x 7 H₂O, 7,5 g Agarose, ad 1 l H₂O, pH 7,4; Sambrook *et al.*, 1989) gegeben, leicht gemischt und auf einer Agar-Platte (Ø 9-mm) verteilt. Die Platten wurden bei 37°C über Nacht inkubiert. Für eine Midi-Präparation wurden vier durchlysierte Platten mit jeweils 10 ml SM-Puffer überschichtet und über Nacht bei 4°C inkubiert. Die resultierende Phagenüberstände wurde in einem Gefäß vereinigt und die Platten mit 1-2 ml SM-Puffer nachgespült.

Die Isolierung von Phagen DNA erfolgte mit dem „Lambda Midi Kit“ der Firma Qiagen (Hilden) nach dem Protokoll des Herstellers. Zusätzlich zu dem Protokoll wurde eine Behandlung mit Proteinase K eingeführt, um die Proteinhüllen der Phagen aufzubrechen. Die Inkubation mit Proteinase K (0,2 mg/ml) erfolgte 30 min bei 55°C. Die isolierte Phagen DNA wurde bei 4°C gelagert.

2.6.3 Isolierung von Plasmid DNA

2.6.3.1 TELT-Mini-Plasmid-Präparation

Die Minipräparation von Plasmiden aus *E. coli* wurde nach der TELT-Methode von Holmes und Quigley (1981) durchgeführt. 1,5 ml einer Übernachtskultur wurden 30 sek bei 13000 rpm in einer Tisch-Zentrifuge pelletiert. Der Überstand wurde abpipettiert und das Pellet in 250 µl TELT-Lysis-Puffer (50 mM Tris/HCl pH 7,5, 62,6 mM EDTA, 2,5 M LiCl, 0,4% Triton X-100) resuspendiert. Es wurde 25 µl

frisch angesetzte Lysozym-Lösung (10 mg/ml) zugegeben, gut gemischt, 5 min auf Eis inkubiert, dann 2 min in einem siedenden Wasserbad erhitzt, weitere 5 min auf Eis inkubiert und anschließend zehn Minuten bei 4°C und 14000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde mit einem Zahnstocher entfernt, der Überstand zweimal mit Phenol/Chloroform (125 µl/125 µl) und einmal mit 250 µl Chloroform ausgeschüttelt. Der Überstand wurde mit 250 µl 2-Propanol (99,7%, RT) versetzt, gemischt und sofort bei 4°C und 14000 rpm 20 min zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 200 µl 70% Ethanol gewaschen und anschließend in 20 µl H₂O resuspendiert. Die Lagerung der DNA erfolgte bei -20°C.

2.6.3.2 Mini-Plasmid-Präparation für DNA-Sequenzierung

Für die erfolgreiche Sequenzierung ist eine besonders reine Plasmid DNA notwendig. Die Mini-Präparation der Plasmiden erfolgte ausgehend von 2 ml Übernachtskulturen entsprechend der Vorschrift des „Concert™ Rapid Plasmid Miniprep Kit“ von Life Technologies/Gibco BRL (Karlsruhe). Die Methode beruht auf einer alkalischen Lyse der Bakterien und anschließenden Aufreinigung der Plasmid-DNA über eine Kunstharzsäule. Die Menge der isolierten DNA wurden wie in 2.6.5 beschrieben bestimmt.

2.6.3.3 Maxi-Plasmid-Präparation

Zur Gewinnung größerer Plasmid-Mengen wurde entweder das „Concert™ Rapid Plasmid Maxiprep“ von Life Technologies/Gibco BRL (Karlsruhe) verwendet, oder eine Isolierung nach der Methode von Birnboim und Doly (1979) durchgeführt. Eine Maxi-Plasmid-Präparation erfolgte ausgehend von einer 500 ml Übernachtskultur. Die Mengenbestimmung der isolierten DNA erfolgte wie in 2.6.5 angegeben. Alle Plasmid-DNA-Proben wurden bei -20°C gelagert.

2.6.4 Isolierung von DNA-Fragmenten und PCR-Produkten aus Agarosegelen

Mittels entsprechender Enzyme aus Plasmiden herausgeschnittene DNA-Fragmente oder durch PCR erhaltene DNA-Fragmente wurden in einer Agarosegelelektrophorese (2.8) aufgetrennt. Die gewünschten DNA-Fragmente wurden auf einem UV-Tisch mit einem Skalpell aus dem Gel herausgeschnitten und mit dem „GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit“ nach den Empfehlungen des

Herstellers (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) extrahiert, gereinigt and anschließend zweimal mit jeweils 20 μl H_2O eluiert. Die DNA-Proben wurden bei -20°C gelagert.

2.6.5 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von DNA in wässrigen Lösungen erfolgte mit Hilfe eines Spektralphotometers. Eine OD von 1 bei 260 nm entspricht einer DNA-Konzentration von 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Sambrook *et al.*, 1989). Der Quotient OD 260/280 erlaubt eine Aussage über die Verunreinigung mit Proteinen.

Die DNA-Konzentration wurde auch alternativ gelelektrophoretisch (2.8) durch einen Vergleich der Bandenintensitäten der untersuchten DNA mit dem DNA Marker *Smart* (Eurogenetic) bestimmt. Die Konzentration der Markerfragmente wird von dem Hersteller angegeben.

2.7 Isolierung von Gesamt- und Poly(A)⁺-RNA

2.7.1 Isolierung von Gesamt-RNA

Die Gesamt-RNA wurde aus Maiskörnern nach dem Protokoll von Dunsmuir (1988) isoliert.

Zehn bis fünfzehn Maiskörner wurden in Stickstoff pulverisiert und noch gefroren mit 5 ml Lysepuffer (100 mM Tris-HCl, pH 9; 100 mM NaCl, 20 mM EGTA, 2% SDS) und 100 μl β -Mercaptoethanol aufgenommen und danach mit 2,5 ml Phenol versetzt. Die Probe wurde 5 min geschüttelt, mit 2,5 ml Chloroform vermischt und erneut 5 min gemischt. Der Überstand wurde nach einer Zentrifugation (3000 rpm, 10 min, RT) abgenommen, zweimal ohne β -Mercaptoethanol phenolisiert und anschließend einmal mit Chloroform extrahiert. Die nach der Zentrifugation erhaltene wässrige Phase wurde einer $\text{NaAC}_{\text{DEPC}}/\text{EtOH}$ -Fällung unterworfen (1 h bei -80°C , oder über Nacht bei -20°C). Das nach der dreissigminütigen Zentrifugation bei 4°C und 4500 rpm erhaltene Pellet wurde in 2,5 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{DEPC}}$ gelöst und mit 2,5 ml 5 M $\text{LiCl}_{\text{DEPC}}$ 3 h auf Eis oder über Nacht bei 4°C präzipitiert. Nach einer Zentrifugation (30 min bei 4°C und 4500 rpm) wurde das Pellet in 1 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{DEPC}}$ aufgenommen, einer $\text{NaAC}_{\text{DEPC}}/\text{EtOH}$ -Fällung (1:10) unterzogen und zweimal mit 70% $\text{EtOH}_{\text{DEPC}}$

gewaschen. Das getrocknete Pellet wurde dann in 200 µl H₂O_{DEPC} aufgenommen und die RNA-Konzentration photometrisch bestimmt (2.7.3). Die RNA-Proben wurden bei -70°C gelagert.

2.7.2 Isolierung von Poly(A)⁺-RNA aus Gesamt-RNA

Die Isolierung von Poly(A)⁺ RNA aus Gesamt-RNA erfolgte mit dem „PolyA Tract[®] mRNA Isolation System IV“ von Promega nach Angaben des Herstellers.

2.7.3 Konzentrationsbestimmung von RNA

Die Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von RNA in wässrigen Lösungen erfolgte mit Hilfe eines Spektralphotometers. Eine OD von 1 bei 260 nm entspricht einer RNA-Konzentration von 40 µg/ml (Sambrook *et al.*, 1989).

2.8 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten diente die Agarosegelelektrophorese. Die DNA wurde mit dem DNA-Proben-Puffer LB III (30% Glycerol, 5% (w/v) Bromphenolblau; Sambrook *et al.*, 1989) versetzt, in einem 0,6 bis 1,5%-igen Agarosegel, das 0,5 µg/ml Ethidiumbromid enthielt, in 1xTAE-Puffer (Sambrook *et al.*, 1989) bei 90 V in einer horizontalen Elektrophorese-Apparatur aufgetrennt. Die Auftrennung der genomischen DNA-Fragmenten erfolgte über Nacht in einem 0,6%-igen Agarosegel bei 20 V. Die DNA wurde auf einem Transilluminator durch UV-Licht (Wellenlänge 304 nm) sichtbar gemacht und mit Hilfe einer Videokamera mit angeschlossenem Videoprinter der Firma Herolab dokumentiert.

2.9 Southern-Blot-Transfer

Nach der Elektrophorese (2.8) wurde das Gel mit genomischen DNA-Fragmenten zweimal 30 min in Denaturierungslösung (500 mM NaOH, 1,5 M NaCl) inkubiert, dann zweimal kurz mit H₂O_{mp} gespült und anschließend zweimal 30 min in Neutralisierungslösung (500 mM Tris-HCl, pH 7,5; 1,5 M NaCl) inkubiert. Der Transfer von DNA-Fragmenten aus dem Gel auf eine Nylonmembran Hybond[™] NX (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) erfolgte über Nacht mit 10 x SSC (1,5 M NaCl; 150 mM Na-Citrat, pH 7,0) mit Hilfe der Kapillarblottechnik (Southern, 1975). Die transferierte DNA wurde durch UV-Bestrahlung mit 120 mJoules/cm² im UV-

Crosslinker (UVC 1000, Firma Hoefer, San Francisco, USA) fixiert und zwischen 3 MM-Whatmanpapier getrocknet.

2.10 Analyse von Bakterien-Kolonien durch „Colony Lifts“

Um positive Bakterienklone auf einer Platte mit einer großen Anzahl von Bakterienkolonien nachweisen zu können, wurde die „Colony Lift Methode“ verwendet. Nitrocellulosefilter HybondTMC-pure (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) wurden eine Minute auf die Bakterienplatten aufgelegt. Die Position der Filter auf den Platten wurde durch Ausschneiden dreier Ecken aus dem Filter und aus dem Agar markiert. Die Filter wurden vorsichtig abgezogen und mit der Bakterien-Seite nach oben fünf Minuten auf ein mit Denaturierungslösung (500 mM NaOH, 1,5 M NaCl) getränktes 3 MM Whatmanpapier gelegt. Nach der Denaturierung der DNA auf den Filtern erfolgten eine fünfminütige Neutralisierung (500 mM Tris-HCl, pH 7,5; 1,5 M NaCl) und eine anschließende fünfminütige Inkubierung auf einem mit 2 x SSC (0,3 M NaCl; 30 mM Na-Citrat, pH 7,0) getränktem 3 MM Whatmanpapier. Dann wurde die DNA durch UV-Bestrahlung mit 120 mJoules/cm² im UV-Crosslinker (UVC 1000, Firma Hoefer, San Francisco, USA) zusätzlich auf dem Filter fixiert. Vor der Hybridisierung wurden die Filter in einem Wasserbad bei 65°C 30 min in 2 x SSC, 0,1% SDS von möglichen bakteriellen Zelltrümmern befreit.

2.11 Hybridisierung

Die Prähybridisierung der Membranen erfolgte vier Stunden bei 65°C in 20 ml Prähybridisierungspuffer (6 x SSPE, 5 x Denhardt's (siehe 2.5), 0,5% SDS, 100 µg/ml denaturierte Heringssperma-DNA; Sambrook *et al.*, 1989), oder eine Stunde bei 45°C in 20 ml Easy Hyb-Puffer (Boehringer Mannheim). Es wurde entweder ein Hybridisierungssofen oder ein Wasserbad verwendet.

Die Hybridisierung wurde über Nacht nach Zugabe der markierten (2.15) und denaturierten Sonden durchgeführt.

2.12 Waschen der Membran und Detektion der Sonden

2.12.1 Waschen der Membran

Nach der Hybridisierung wurden die Membranen zunächst zweimal fünf Minuten bei RT mit 2 x SSC (0,3 M NaCl; 35 mM Na-Citrat, pH 7,0), 0,1% SDS und anschließend zweimal fünfzehn Minuten bei 65°C unter stringenten Bedingungen mit 0,1 x SSC (15 mM NaCl; 0,75 mM Na-Citrat, pH 7,0), 0,1% SDS gewaschen.

2.12.2 Nachweis radioaktiv markierter Sonden

Bei Anwendung von radioaktiv markierten Sonden (2.15.2) wurden die Membranen feucht in Frischhaltefolie eingeschlagen und in einer Filmkassette mit Verstärkerfolie gegen einen Röntgenfilm (Hyperfilm™-MP, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) bei RT exponiert. Die Expositionszeit betrug zwischen 5 min und 10 Tage bei RT oder -70°C.

2.12.3 Nachweis Digoxigenin-markierter Sonden

Die nicht radioaktiv markierten Sonden (2.15.1) wurden durch eine enzymgekoppelte Antikörperreaktion durch Chemilumineszenz nachgewiesen. Die Detektion der gebundenen Sonden erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers (Boehringer Mannheim). Die in eine Frischhaltefolie eingeschweißte Membran wurde 15 min bei 37°C präinkubiert und anschließend gegen einen Röntgenfilm (Hyperfilm™-MP, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) bei RT in einer Filmkassette exponiert. Die Expositionszeit betrug zwischen 5 min und mehreren Stunden.

Für eine nachfolgende Rehybridisierung derselben Membran mit einer weiteren Sonde wurde die zuvor gebundene Sonde durch einstündige Inkubation mit 1% SDS bei 80°C von der Membran entfernt. Die Membran wurde getrocknet und bis zur Rehybridisierung aufbewahrt.

2.13 PCR-Analyse

2.13.1 Standard-PCR

DNA Fragmente wurden mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR) amplifiziert. Die dabei verwendeten Komponenten *Taq*-Polymerase, Reaktionspuffer, $MgCl_2$ -Lösung und Nukleotide stammten von der Firma Life Technologies/Gibco BRL. Die Amplifikation erfolgte, wenn nicht anders angegeben, in 50 μ l Ansätzen mit nachfolgendem Standard-Programm:

Standard-PCR-Ansatz		Standard-PCR-Programm		
1 ng Plasmid oder 50 ng genomische DNA		1. Denaturierung	5 min	96°C
		2. Denaturierung	1 min	95°C
20 mM Tris-HCl(pH 8,4)		3. Primeranlagerung	1 min	x °C
1,5 mM $MgCl_2$		4. Kettenverlängerung	2 min	72°C
50 mM KCl		5. Kettenverlängerung	10 min	72°C
5% DMSO		6. Abkühlung		4°C
0,5 mM dNTPs		Zyklenzahl 2. bis 4. 30		
15 pM 5'-, 3'-Primer				
1 U <i>Taq</i> -Polymerase				

Tab.2.13.1-1: Standardbedingungen für PCR-Ansätze.

Die PCR-Ansätze wurden mit Mineralöl (Sigma, München) überschichtet. Die Reaktionen wurden in einem TRIO-Thermocycler von Biometra (Göttingen) durchgeführt.

2.13.2 Kolonie-PCR

Zur Überprüfung der Bakterienklone auf korrekte DNA-Insertion in die Plasmide wurden PCRs direkt mit Bakterienkolonien durchgeführt. Hierzu wurde ein PCR-Mix mit dem genspezifischen Primerpaar nach Standardbedingungen (2.13.1) eingesetzt. Die Amplifikation erfolgte in 25 μ l Ansätzen. Anschließend wurden die Amplifikate in einem Agarosegel elektrophoretisch (2.8) aufgetrennt.

2.13.3 Phagen-PCR

Um positive Phagen zu identifizieren oder diese danach zu charakterisieren, wurden PCRs mit 5 µl Phagen-Flüssiglysate nach Standardbedingungen (2.13.1) durchgeführt und die erhaltenen Amplifikate durch Gelelektrophorese überprüft (2.8).

2.14 RT-PCR Analyse

Die Quantifizierung der Expression von Anthocyaninen im Korn verschiedener Maislinien erfolgte durch RT-PCR-Analysen.

2.14.1 cDNA-Synthese

Für die cDNA-Synthese wurde die Gesamt-RNA aus den Maiskörnern isoliert (2.7.1) und die RNA-Menge photometrisch bestimmt (2.7.3). 10 µg wurden in einem Volumen von 10 µl 15 min bei RT mit DNase I behandelt (Life Technologies/Gibco BRL, Karlsruhe). Das Enzym wurde durch Zugabe von 2,5 mM EDTA_{DEPC} und eine fünfminütige Inkubation bei RT inaktiviert. Für die reverse Transkription wurden zu jedem Ansatz 0,5 µM Oligo-dT Primer zugegeben und bei 65°C 10 min im TRIO-Thermocycler von Biometra (Göttingen) inkubiert. Zu jedem Ansatz wurde anschließend ein RT-Reaktionsgemisch mit einer Endkonzentration von 100 mM DTT, 20 mM Tris-HCl, pH 7,5, 0,1 M EDTA, 10 mM dNTPs, 20 U RNaseOUT™ RNase-Inhibitor und 50 U Super Script™II Reverse Transcriptase (Life Technologies/Gibco BRL) zugegeben. Die Ansätze wurden dann eine Stunde bei 42°C im TRIO-Thermocycler (Biometra, Göttingen) inkubiert.

2.14.2 RT-PCR

Zur Quantifizierung der Expression einzelner Gene in den verschiedenen Linien wurden PCR-Reaktionen mit den jeweiligen genspezifischen Primern durchgeführt. Um das Vorhandensein von kontaminierender genomischer DNA in den synthetisierten cDNAs zu testen, wurden Test-PCRs mit jeweils 2 µl der cDNA und mit den Primern 5`*ZmRPL39a* und 3`*ZmRPL39e* (Tab. 2.3-1) durchgeführt. Die PCR erfolgte nach dem Standardprogramm (Tab. 2.13.1-1) in 25 µl Ansätzen mit einer Primer-Anlagerungstemperatur von 62°C. Anschließend wurden jeweils 10 µl der PCR-Amplifikate in einem 1% Agarosegel überprüft (2.8).

Für die quantitativen PCRs wurden jeweils 5 µl der Erststrang-DNA in 25 µl Ansätzen in folgendem Programm eingesetzt:

RT-PCR Programm:

1.	5 min	95°C	
2.	1 min	95°C	
3.	1 min	x °C	25 x Zyklus 2. bis 4.
4.	2 min	72°C	
5.	10 min	72°C	
6.	∞	4°C	

In dem Programm ist keine Anlagerungstemperatur für die genspezifischen Primer angegeben, weil diese für jedes Primerpaar je nach dessen GC und AT Gehalt spezifisch ist. Die Anlagerungstemperatur für jede in dem Versuch verwendete Primerkombination wurde nach folgender Formel berechnet und anschliessend in der Praxis optimiert:

$$\text{Schmelzpunkt (T}_M\text{)} = [(\text{GC}) \times 4^\circ\text{C} + (\text{AT}) \times 2^\circ\text{C}] \pm 5^\circ\text{C}$$

Die verwendeten Anlagerungstemperaturen sind der Tabelle 2.14.2-1 zu entnehmen.

Primer 5' / 3'	T _m (°C)
JK5' C2-04 / JK3' C2-17	50
JK5' Whp-18 / JK3' Whp-19	62
JK5' C1-12 / JK3' C1-14	55
JK5' R-03 / 3' Nat-OL-009	55
JK5' A1-10 / JK3' A1-11	59
5' ZmRPL39a / 3' ZmRPL39e	62

Tab. 2.14.2-1: Die bei der Quantifizierung der Genexpression mittels RT-PCR verwendeten genspezifischen Primerkombinationen und deren Anlagerungstemperaturen. Links sind die Bezeichnung der Primerpaare und rechts ihre optimale Temperatur für eine erfolgreiche Amplifikation angegeben.

Jeweils 10 µl der PCR-Reaktionen wurden im Agarosegel aufgetrennt (2.8), geblottet (2.9) und mit der jeweiligen genspezifischen radioaktiv markierten DNA-Sonde (2.15.2) hybridisiert (2.11; 2.12.2).

2.15 Markierung von Nucleinsäuren

2.15.1 Markierung von DNA mit DIG-dUTP durch PCR

Digoxigeninmarkierte Gensonden wurden ausgehend von 1 ng Plasmid mit DIG-11-dUTP (Gibco BRL) durch einen PCR-Standardansatz (2.13.1) hergestellt. 1/10 des Amplifikationsansatzes wurde in einem Agarosegel überprüft (2.8). Die PCR-Amplifikate wurden von den nicht eingebauten Nucleotiden mit dem „GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit“ (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) nach dem Protokoll des Herstellers abgetrennt (2.6.4).

Die detaillierten Angaben der in dieser Arbeit verwendeten DIG-Sonden sind in der Tab. 2.15.1-1 dargestellt.

DIG-Sonde	Plasmid	Primer 5`/3	Größe (bp)
C2 cDNA	p 37 (Wienand)	MB/BT	1400
C2-Promotor	p 38 (Wienand)	MB/BT	800
<i>Whp</i> -Promotor	<i>Whp</i> -Promotor- pCR [®] 2.1-TOPO [®]	31/32	400

Tab. 2.15.1-1: Die in der Arbeit verwendeten DIG-markierten Gensonden. Links ist die Bezeichnung der Sonden angegeben. In der zweiten Spalte ist die Bezeichnung des für die Amplifikation eingesetzten Ausgangsplasmids dargestellt. Die dazu verwendeten genspezifischen Primer und die Größe der Amplifikate sind den beiden rechten Spalten zu entnehmen.

Die Konzentration der synthetisierten Sonden wurde durch Vergleich von Verdünnungsreihen mit einer markierten Kontroll-DNA (DNA-labeling Kit, Boehringer Mannheim) bekannter Konzentration anhand der nach Digoxigenin-Detektion erhaltenen Signalintensitäten abgeschätzt. Alternativ wurde die Sondenkonzentration gelelektrophoretisch (2.8) durch einen Vergleich der Bandenintensitäten der Sonde mit dem DNA Marker *Smart* (Eurogenetic) bestimmt.

2.15.2 Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten

Die als „random priming“ bezeichnete Methode (Feinberg und Vogelstein, 1983) basiert auf der Anlagerung von Hexaoligonucleotiden, die sich an DNA-Fragmente anlagern und als Startpunkt für die DNA-Synthese durch das Klenow-

2. Material und Methoden

Enzym dienen. Bei der Markierung der DNA mit [α - 32 P] dCTP (3000 Ci/ μ mol) wurde der „Prime It[®] II Random Primer Labeling Kit“ (Stratagene, Heidelberg) verwendet.

Zur Herstellung von Sonden wurden sowohl aufgereinigte (2.8; 2.6.4) genspezifische DNA-Fragmente, die durch Restriktion aus Plasmiden erhalten wurden (2.6.3), als auch PCR-Fragmente nach Standardamplifikation (2.13.1) verwendet (Tab. 2.15.2-1).

32 P Sonde	Ausgangs-DNA	Primer 5'/3' oder Endonuklease	Größe (bp)
<i>C2-04/17</i>	p 108 (<i>C2</i> -Gen)	JK5' <i>C2-04</i> / JK3' <i>C2-17</i>	848
<i>Whp-18/19</i>	p 102 (<i>Whp</i> Gen)	JK5' <i>Whp-18</i> / JK3' <i>Whp-19</i>	1.027
<i>C1-12/14</i>	p 1 (<i>C1</i> cDNA)	JK5' <i>C1-12</i> / JK3' <i>C1-14</i>	589
<i>R-03/009</i>	p 39 (<i>R</i> cDNA)	JK5' <i>R-03</i> / 3' <i>Nat-OL-009</i>	1.065
<i>A1-10/11</i>	p 30 (<i>A1</i> cDNA)	JK5' <i>A1-10</i> / 3' JK3' <i>A1-11</i>	563
<i>ZmRPL39a/e</i>	cDNA	5' <i>ZmRPL39a</i> / 3' <i>ZmRPL39e</i>	450
<i>C2</i> cDNA	p 37 (<i>C2</i> cDNA)	<i>Eco</i> RI	1400
<i>C2</i> Promotor	p 38 (<i>C2</i> -Promotor-Fragment)	<i>Eco</i> RI / <i>Hind</i> III	800
<i>Whp</i> Promotor	<i>Whp</i> -Prom.-pCR [®] 2.1-TOPO [®]	JK5' <i>Whp-31</i> / JK3' <i>Whp-32</i>	400

Tab. 2.15.2-1: Bezeichnung der in der Arbeit verwendeten radioaktiv markierten Gensonden.

Die Konzentrationsbestimmung des DNA Fragmentes wurde gelelektrophoretisch durch einen Vergleich mit dem DNA Marker *Smart* (Eurogenetic) durchgeführt. Für einen Markierungsansatz wurden 50 ng DNA fünf Minuten im kochenden Wasserbad denaturiert und in einem Eisbad abgekühlt. Der Markierungsansatz wurde nach dem Protokoll des Herstellers fertiggestellt. Es wurden in der Regel 35 μ Ci [α - 32 P] dCTP verwendet. Die Inkubation des Ansatzes erfolgte bei 37°C für 30 min bis 4 h.

Der Ansatz wurde von den nicht eingebauten Nucleotiden über eine Sephadex S-25-Säule (Pharmacia Biotech) gereinigt (Sambrook *et al.*, 1989). Für die Herstellung der Säulen wurde 1/3 einer blauen Pipettenspitze mit Glaswolle ausgestopft und durch Vakuum mit G 25-Sephadex bis zur oberen Kante der Pipettenspitze gefüllt. Anschließend wurde die Säule in die ausgeschnittene Öffnung im Deckel eines 1,5 ml Reaktionsgefäßes gesteckt und in einem 50 ml Falcon-Tube 10 min bei RT und 2000 rpm zentrifugiert. Die Säule wurde in ein neues

Reaktionsgefäß überführt, der Markierungsansatz mit zusätzlichen 360 µl H₂O auf die Säule appliziert und diese 5 min bei 2000 rpm zentrifugiert. Die Einbaubestimmung der radioaktiv markierten Nukleotide erfolgte in einem Szintillationszähler.

2.16 Klonierung von DNA-Fragmenten

Zur Herstellung von Promotor-Reporter-Gen-Konstrukten, für die Analyse genomischer DNA-Fragmente und für Arbeiten mit cDNAs war die Herstellung von DNA-Fragmenten durch PCR mit spezifischen Primern notwendig. Die DNA-Fragmente wurden amplifiziert (2.13) und in den pCR[®] 2.1-TOPO[®] (Invitrogen) Vektor kloniert (2.16.1).

Die DNA-Fragmente im pCR[®] 2.1-TOPO[®] Vektor wurden mit genspezifischen Primern sowie mit den Vektorprimern MB, T3 und T7 sequenziert (2.19).

Um Promotor-Reporter-Gen-Konstrukte zu klonieren, wurden die amplifizierten DNA-Bereiche aus dem pCR[®] 2.1-TOPO[®] herausgeschnitten und in die Expressionskassette Luciferase-nos-pUC 119 subkloniert (2.16.2).

2.16.1 Klonierung von PCR-Fragmenten

Durch eine PCR mit dem Standard-Programm (Tab. 2.13.1-1) konnten mit den jeweiligen genspezifischen Primern (2.3) Fragmente der *C2*- und *Whp*-Promotoren, der *Whp*-cDNA sowie der genomischen Sequenz des *Whp*- und des *C2-Idf*-Gens amplifiziert werden. Die Amplifikate wurden in einer Agarosegelelektrophorese (2.8) aufgetrennt, auf eine Membran transferiert (2.9) und mit einer genspezifischen Sonde hybridisiert (2.11, 2.12, 2.15). Die Amplifikate wurden erneut in einem Agarosegel aufgetrennt und die DNA-Fragmente, welche sich bei der Hybridisierung als positiv erwiesen hatten, wurden aus dem Gel herausgeschnitten und mit Hilfe des „GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kits“ (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) aufgereinigt (2.6.4).

Die PCR-Amplifikate wurden mit Hilfe des „TOPO[®]TA Cloning-Kits“ (Invitrogen, Groningen, NL) in den pCR[®] 2.1-TOPO[®] Vektor nach Herstellerangaben

ligiert. Die Ligationsansätze wurden in kompetente *E.coli* One shot™ TOP 10`F (Invitrogen) transformiert, auf ampicillinhaltiges Selektionsmedium mit IPTG-X-Gal ausplattiert und bei 37°C über Nacht inkubiert. Die erhaltenen Bakterienkolonien wurden entweder durch „Colony Lifts“ mit einer genspezifischen Sonde (2.10) oder durch Kolonie-PCR mit gen- oder vektorspezifischen Primern (2.13.2) analysiert. Von den positiven Klonen wurden 5 ml-Flüssigkulturen angesetzt und anschließend wurde die Plasmid-DNA aus den Bakterien isoliert (2.6.3). Nach der Sequenzierung (2.19) der Klone wurden Gefrierkulturen angelegt (1/1-Glycerin/Bakteriensuspension) und bei –70°C aufbewahrt.

2.16.2 Klonierung von DNA-Fragmenten in Vektoren

Um DNA-Fragmente aus Plasmiden zu isolieren, wurden diese mit Restriktionsenzymen geschnitten (Sambrook *et al.*, 1989), die resultierenden Fragmente durch Gelelektrophorese aufgetrennt (2.8) und aus dem Gel eluiert und aufgereinigt (2.6.4). Nach der Ligation in kompatible Schnittstellen anderer Vektoren (2.16.4) wurden die Plasmide in kompetente *E. coli* Zellen des Stammes XL1-Blue transformiert (2.17) und diese auf Selektionsmedium angezogen. Aus den resultierenden Bakterienkolonien wurden die Plasmide isoliert (2.6.3.1) und diese durch Restriktionsanalyse und Sequenzierung (2.19) überprüft.

2.16.3 Auffüllen von überhängenden Enden

Bei Restriktionen eines DNA-Fragmentes oder eines Vektors können 3`-überhängende Enden entstehen, die von dem Klenow-Fragment der *E. coli*-DNA-Polymerase I aufgefüllt werden können. Das Auffüllen erfolgte 30 min bei RT in einem Standard-Reaktionsansatz (Sambrook *et al.*, 1989): 50 mM Tris-HCl, pH 7,4, 7 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 1-2 µg DNA, 0,1 mM dNTPs, 2 U Klenow-Fragment (Technologies/Gibco BRL, Karlsruhe). Die Reaktion wurde durch Inkubation bei 65°C abgebrochen, die DNA mit 1/10 Vol 3 M NaAc und 2 Vol Ethanol bei –20°C 1 h gefällt und mit 70% EtOH gewaschen. Das getrocknete Pellet wurde in 10 µl H₂O aufgenommen und bei –20°C gelagert.

2.16.4 Ligation eines DNA-Fragmentes in einen Vektor

Ligationen von DNA-Fragmenten in Vektoren wurden mit 1U T4-DNA-Ligase (Life Technologies/Gibco BRL, Karlsruhe) mit 1 x T4-DNA-Ligase Puffer (Gibco BRL, Karlsruhe) in einem Gesamtvolumen von 10 µl durchgeführt (Maniatis *et al.*, 1987). Die Ligation überhängender Enden erfolgte 1 bis 4 Stunden bei RT. Die Ligation glatter oder durch Klenow-Fragment aufgefüllter Enden wurde bei 16°C über Nacht durchgeführt. Die Ligationsansätze wurden dann in kompetente *E. coli* XL1-Blue Zellen transformiert (2.17).

2.17 Herstellung und Transformation kompetenter *E. coli*-Zellen

2.17.1 Transformation kompetenter Zellen mit der CaCl₂-Methode

Für die Herstellung kompetenter Zellen wurden 100 ml Flüssigmedium (LB +Tetracyclin, 50 µg/µl) in einem 2l Erlenmeyerkolben mit 5 ml einer Übernachtskultur *E.coli* XL-Blue angeimpft und bei 37°C bis zu einer Zelldichte OD600 = 0,4 kultiviert. Die Bakterienzellen wurden 10 min bei 3000 rpm und 4°C abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 10 ml TFBI-Puffer (100 mM CaCl₂, 70 mM MnCl, 40 mM NaAc, 200 mM RbCl, pH 5,5) aufgenommen und 10 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter zehninütiger Zentrifugation bei 3000 rpm und 4°C wurde das Pellet in 4 ml TFBII-Puffer (100 mM MOPS, pH 7,0, 75 mM CaCl₂, 100 mM NaCl, 15% Glycerin) vorsichtig auf Eis resuspendiert. Die Zellen konnten dann in 100 µl Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Verwendung bei -70°C aufbewahrt werden.

Zur Transformation von Plasmiden in Bakterien wurden die Bakterienzellen mit ein bis fünf ng eines Plasmids oder 10 µl eines Ligationsansatzes vermischt und 30 min auf Eis inkubiert. Nach einer 45 sekündigen Hitzebehandlung bei 42°C wurden die Zellen 2 min auf Eis stehen gelassen. Anschließend erfolgte nach Zugabe von 200 µl LB-Medium eine einstündige Inkubation bei 37°C, bevor die Bakterien auf Selektionsmedium ausgebracht wurden. Die nach Inkubation bei 37°C erhaltenen Kolonien konnten dann weiter analysiert werden (2.6.3, 2.10 oder 2.13.2).

2.17.2 Elektrotransformation

Die Elektrotransformation erwies sich als eine sehr effiziente Methode für die Transformation von Bakterien mit Plasmid-DNA. Bei diesem Verfahren wird die bakterielle Zellmembran durch einen elektrischen Impuls destabilisiert, wodurch die Aufnahme der Plasmid-DNA ermöglicht wird.

Die Ligationsansätze und die Bakterienzellen müssen vor der Transformation entsalzt werden. Das Entsalzen der Ligationsansätze wurde mit Hilfe des „GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kits“ (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Alternativ wurde die DNA einer einstündigen EtOH-Fällung bei -20°C unterworfen und mit 70% EtOH gewaschen. Das getrocknete Pellet wurde dann in 10 μl H_2O aufgenommen.

Eine 400 ml Übernachtskultur von *E. coli* XL-Blue Zellen mit einer Dichte von $\text{OD}_{600} = 0,5$ wurde pelletiert und das Zellpellet zweimal mit 4 ml eiskaltem Wasser gewaschen. Anschließend wurden die Bakterienzellen in 3 ml Wasser und 10% Glycerin resuspendiert und in 50 μl -Aliquots in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70°C aufbewahrt.

50 μl der Bakterienzellen wurden auf Eis aufgetaut, zusammen mit dem Ligationsansatz in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette pipettiert und 5 min auf Eis inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Küvette in das Elektrotransformationsgerät (Easyject Basic p21-12; Eurogentec) eingesetzt und ein Elektropuls gegeben. Nach der Elektroporation wurden die Bakterien in ein Eppendorfgefäß mit 200 μl LB-Medium überführt, 1 h bei 37°C inkubiert, auf Selektionsmedium ausplattiert und über Nacht bei 37°C angezogen.

2.18 Herstellung und Durchmusterung einer genomischen Bank

2.18.1 Herstellung einer genomischen Bank

Zur Isolierung der *C2-ldf*-Genkopien wurde eine genomische Bank mit Hilfe des „Lambda *DASH*[®]II/*EcoRI* Kits“ (Stratagene) hergestellt. Die genomische DNA wurde aus Blattmaterial der Maislinie *C2-ldf* (Ac Zm 559, GH-Nummer 1842) isoliert. 550 μg genomische DNA wurden mit *EcoRI* 5 h bei 37°C gespalten. 1/20 des Verdau wurde auf einem 0,6% Agarosegel getestet (2.8). Das Test-Gel wurde

geblottet (2.9) und die Membran mit einer radioaktiv markierten C2-Promotor-Sonde (2.15.2) hybridisiert (2.11; 2.12.2).

Nach diesem Test wurde die restliche genomische DNA einmal mit Phenol/Chloroform (1:1) und einmal mit Chloroform gereinigt, bevor diese mit 2,5 Vol. EtOH und 1/10 Vol. NaAc bei RT gefällt, anschließend mit 80% EtOH gewaschen und in 2 ml TE (TE: 5 mM Tris-HCl, pH 8,0, 0,5 mM EDTA) aufgenommen wurde. Die DNA wurde bei 4°C aufbewahrt.

Die Größenfraktionierung der mit *EcoRI* gespaltenen DNA erfolgte über einen Kaliumacetat-Gradienten, der mit Hilfe eines Gradientenmischers gebildet wurde (Abb.2.18.1-1).

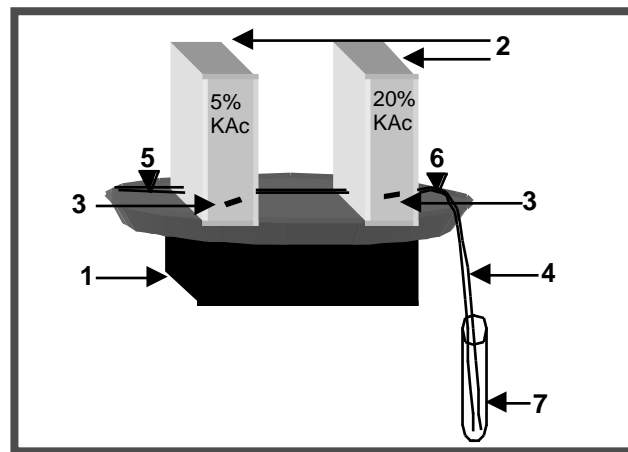


Abb.2.18.1-1: Schematische Darstellung des Gradientenmischers. (1) Magnetisch, auf dem sich die Apparatur befindet. Zwei Kammern (2) mit Rührfischen (3), wurden mit einer 5%-igen oder einer 20%-igen KAc-Lösung befüllt. (4) Eine Kapillare wurde bis auf den Boden eines Zentrifugationsröhrchen (7) geführt. Nach dem gleichzeitigen Öffnen der beiden Ventile (5 und 6) wurde der Gradient unter langsamer Rotation der Rührfische aus jeweils 5 ml Lösung im Zentrifugationsröhrchen aufgebaut.

Ein ml der genomischen DNA wurde auf den Gradienten aufgetragen und 20 h bei 20°C und 20000 rpm in einer Ultrazentrifuge (Centrikon T-1170, von Kontron Instruments, der Rotor TST 60.4) zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurden von dem Gradient 20 Fraktionen mit jeweils 600 µl entnommen. Jeweils 18 µl der Fraktionen 4-19 wurden auf einem 0,6% Agarosegel aufgetragen (2.8). Das Gel wurde geblottet (2.9) und die DNA mit einer radioaktiv markierten C2-Promotor-Sonde hybridisiert (2.15.2 und 2.11).

Fraktionen mit DNA-Fragmenten (8 bis 21 kb), welche mit der C2-Promotor-Sonde hybridisierten, wurden gefällt, die getrockneten Pellets in 50 µl TE

aufgenommen und je 10 µl DNA der einzelnen Fraktionen auf einem 0,6% Agarosegel überprüft (2.8). Mit jeweils 2 µl jeder Einzelfraktion wurde eine Testligation mit 1 U T4 Ligase über Nacht bei 16°C durchgeführt. Anschließend wurde die erfolgreiche Ligation durch Auftrennung in einem 0,6% Agarosegel nachgewiesen.

Die Ligation der DNA-Fragmente an die Phagenarme des Lambda DASH[®] II/EcoRI (Stratagene) erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers.

Die Verpackung der Lambda-DNA wurde mit dem „Gigapack[®] III Gold Packaging Extract“ (Stratagene, Heidelberg) nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

Der Bakterienstamm *E. coli* XL1-Blue-MRA-P2 wurde für die Infektion mit den rekombinanten Lambda-Phagen in 50 ml Medium (LB, 0,2% Maltose, 10 mM MgSO₄) ausgehend von einer 5 ml Übernachtskultur angeimpft, so dass die Zelldichte zu Beginn OD₆₀₀ = 0,2 betrug. Die Bakterienkultur wurde bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ = 0,7-1,0 kultiviert. Die Bakterienzellen wurden 5 min bei 2000 rpm und 4°C pelletiert. Das erhaltene Pellet wurde in 10 mM MgSO₄ resuspendiert und auf eine Zelldichte von OD₆₀₀ = 1,0 eingestellt.

Für die Bestimmung des Phagentiters wurde eine Verdünnungsreihe der erhaltenen Phagen hergestellt. 200 µl der Bakterienkultur wurden jeweils mit 50 µl aus verschiedenen Verdünnungsansätzen infiziert, 15 min bei 37°C inkubiert und mit 4 ml erwärmtem Top-Agar vermischt auf NZY-Platten (9 cm) ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert.

Zur Durchmusterung der genomischen Bank wurden je 600 µl der Bakteriensuspension mit 30000-50000 pfu des Phagenstocks infiziert, 15 min bei 37°C inkubiert und mit 7 ml erwärmtem Top-Agar vermischt auf 30 NZY-Platten (132 mm) ausplattiert. Die Platten wurden bei 37°C über Nacht inkubiert und bei 4°C gelagert.

Die genomische C2-*Idf*-Bank hatte einen Phagentiter von insgesamt ca. 1,05 x 10⁶ pfu.

2.18.2 Screening der genomischen Bank

Von der ausplattierten genomischen Bank wurden Nitrocellulose-Filter (Hybond™ C-pure, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) abgezogen. Die auf den Filtern adsorbierten Phagen wurden denaturiert, neutralisiert und fixiert (2.10). Die Filter wurden über Nacht bei 65°C, mit einer radioaktiv markierten C2-Promotor-Sonde hybridisiert, gewaschen und ausgewertet (2.11, 2.15.2, 2.12.2).

Plaques, die mit den positiven Signalen auf den Röntgenfilmen korrelierten, wurden von den Platten mit Hilfe einer Pasteurpipette ausgestochen, und in ein Eppendorfgefäß mit 1 ml SM-Puffer (100 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 7,5) und 20 µl Chloroform überführt. Die Elution der Phagen erfolgte 15 min bei 37°C und die Lagerung der Phageneluat bei 4°C.

Für die nächste Screening-Runde wurden 200 µl der Bakteriensuspension mit 1 µl eines Phagen-Eluates vermischt, 15 min bei 37°C inkubiert, mit 4 ml erwärmtem Top-Agar auf NZY-Platten (9 cm) ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Von der Platte wurde ein Filter abgezogen und mit diesem wie zuvor beschrieben verfahren. Die Durchmusterung der Bibliothek wurde entsprechend bis zur Identifizierung von Einzelplaques fortgesetzt.

2.18.3 Amplifikation der genomischen Bank

Zur Amplifikation der genomischen Bank wurden die Platten mit je 10 ml SM-Puffer über Nacht bei 4°C abgeschwemmt. Die Überstände wurden in einem Falcon-Tube vereinigt und mit 5% Chloroform 2-3 h bei RT geschüttelt. Der Phagenstock wurde nach einer fünfzehnminütigen Zentrifugation bei 2000 rpm und RT mit 0,2 % Chloroform versetzt und bei 4°C gelagert.

2.19 Sequenzierung von DNA und computergestützte Auswertung von DNA- und Proteinsequenzen

Die DNA-Sequenzierung erfolgte nach dem Kettenabbruchverfahren von Sanger *et al.* (1977) unter Verwendung des „ABI PRISM™ Dye Terminator Cycle Sequencing Kit“ (Applied Biosystems, Weiterstadt) nach Angaben des Herstellers. Anschließend wurden die amplifizierten DNA-Fragmente in einem Acrylamidgel aufgetrennt und die Fluoreszenzsignale mit einem Sequenzierer 377 (Perkin Elmer/Applied Biosystem) ausgewertet.

Für die Sequenzanalyse wurden folgenden Computerprogramme verwendet:

Macintosh Programme: Mac Vector™ 4.1.4 (Scientific Imaging Systems, USA)
Seqman (DNASTAR 3.5 Inc., USA)
PC: GeneDoc 2.6.01 (Nicholas und Nicholas, 1997)

Sequenzvergleiche mit den aktuellen Sequenzdatenbanken wurde mit dem BLAST Algorithmus (Altschul *et al.*, 1997) durchgeführt.

2.20 Biolistische transiente Transformation von Maisembryonen

Die transiente biolistische Transformation von Maisembryonen wurde nach Brettschneider *et al.* (1997) durchgeführt. Für diese Experimente wurde die Partikelkanone Modell PDS-1000/He (von Bio-Rad) an einer sterilen Arbeitsbank verwendet (Abb. 2.20-1).

In allen in dieser Arbeit durchgeführten Transformationsexperimenten wurden, wenn nicht anders erwähnt, Stoppnetze, Makrocarrier und Berstscheiben (1.350 psi) der Firma Bio-Rad verwendet. Die Transformationen erfolgten unter Vakuum (zwischen 28 und 29 inch Hg-Säule) mit einem Druck von 1350 psi. Bei der Transformation wurde die Halterung mit dem Makrocarrier und dem Stoppnetz in die zweite und die Halterung mit den zu transformierenden Embryonen in die vierte Führung eingesetzt. Dieser Abstand wurde für alle Experimente eingehalten.

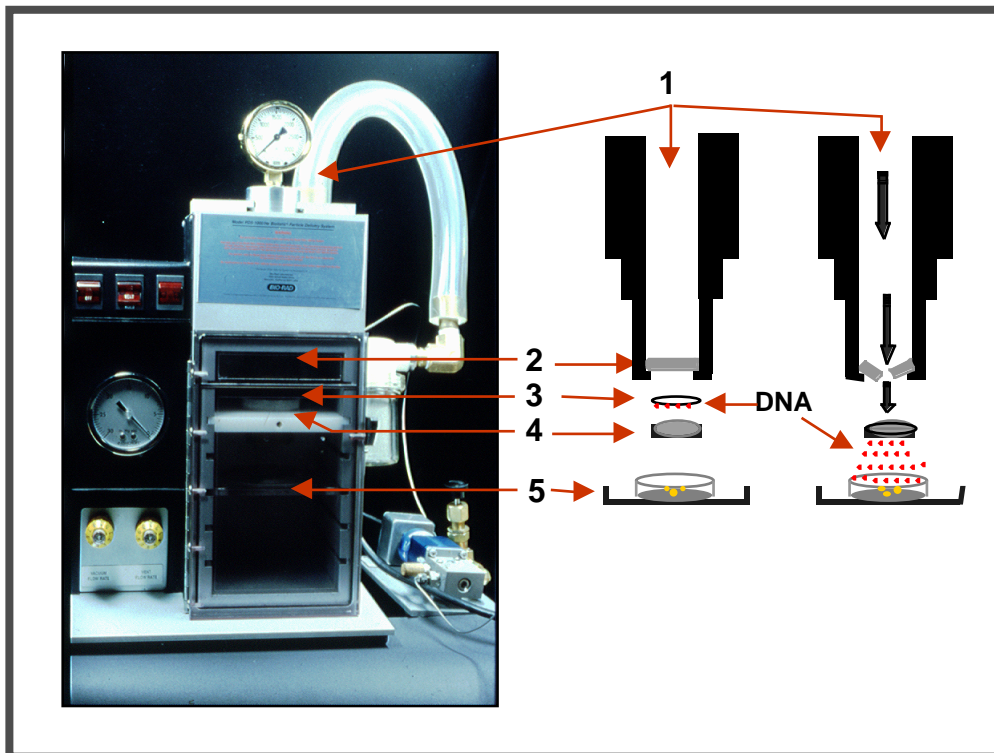


Abb. 2.20-1: Die Partikelkanone PDS-1000/He und eine schematische Darstellung des Transformationsvorganges. 1-Beschleunigungskammer, in der Helium-Druck aufgebaut wird. 2 - Berstscheibe, die durch den Druck zerbricht. 3 - Makrocarrier mit DNA-besetzten Goldpartikeln. 4 - Das Stoppnetz, bremst den Makrocarrier, wenn dieser durch den Druck beschleunigt wird und setzt die Goldpartikel frei. 5 - zu transformierendes Gewebe.

Für den Vergleich der Promotor-Aktivität des *Whp*-Gens aus verschiedenen Maislinien (*C1^S* und *LC*) und für die Analyse der Promotor-Aktivität der *C2-Idf*-Kopie 55 wurden Promotor-Reporter-gen-Konstrukte mit dem Luciferasegen hergestellt und transient zusammen mit den regulatorischen Genen *R* und *C1* in Maisembryonen transformiert. Um die Luciferase-Aktivitäten verschiedener Transformationen miteinander korrelieren zu können, wurde das Luciferase-Reporter-gen unter Kontrolle des *CaMV35S* Promotors und des *nos*-Terminators als Standard verwendet.

Zur Untersuchung der Wirkung des *InD1*-Proteins auf die Promotoren der Strukturgene *C2-Idf*-(55), *A1* und *Whp* wurden diese Konstrukte gemeinsam mit den Regulatorgenen *R* und *C1* in Maisembryonen transient cotransformiert.

Als interner Standard für die Kontrolle der Transformationseffizienz wurde in allen Experimenten das β -Glucuronidase-Reportergen unter Kontrolle des *CaMV35S*-Promotors und des *nos*-Terminators verwendet.

Die für die Transformation benötigten Plasmide wurden wie in 2.6.3.3 beschrieben isoliert und auf eine DNA-Konzentration von 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ eingestellt. Die Expression der Promotor-Reportergen-Konstrukte in den transformierten Zellen wurde enzymatisch nachgewiesen (2.21.1 und 2.21.2).

2.20.1 Vorbehandlung der Gewebe

Maiskolben aus Kreuzungen der Linien *in/in,C2/c2whp/whp* x *in/in,c2/c2,whp/whp* wurden oder der Linie LC 15 bis 20 Tage nach der Bestäubung wurden geerntet. Wenn diese nicht sofort verarbeitet werden konnten, erfolgte eine Lagerung bei 4°C für maximal eine Woche. Die unreifen Embryonen wurden aus den Körnern herauspräpariert, und etwa sechs bis neun Stück pro Platte mit der Skutellumseite nach oben auf osmotisches Medium (N6₇₀₀ Medium mit 0,7 M Saccharose (2.5); D'Halluin *et al.*, 1992) überführt. Vor dem Beschuß erfolgte eine Inkubation für 4 bis 5 Stunden bei RT.

2.20.2 Vorbereitung der Transformationsansätze

40 mg der Goldpartikel mit einem Durchmesser zwischen 0,3 und 3,0 μm (Heraeus), wurden zweimal in 1 ml EtOH und zweimal in 1 ml H₂O gewaschen und zwischen jedem Waschschrift 10 sek bei 10000 rpm und RT zentrifugiert. Nach dem letzten Waschschrift wurde das Pellet in 1 ml H₂O resuspendiert und in 50 μl -Aliquots bei -20°C gelagert.

10 μg Plasmid-DNA wurden mit einem Aliquot Goldpartikel 30 sek vermischt, bevor eine Lösung aus 20 μl Spermidin (0,1 M) und 50 μl CaCl₂ (2,5 M) zu dem Plasmid-Gold-Ansatz zugegeben und der Ansatz sofort 2 min gemischt wurde. Nach einer Zentrifugation (10 sek bei 10000 rpm und RT) wurde das Pellet mit 250 μl EtOH 15 min bei RT gewaschen, der Ansatz pelletiert und das DNA-Goldgemisch in 60 μl EtOH resuspendiert. Die fertige Probe wurde bis zur Verwendung auf Eis gelagert.

In der Tabelle 2.20.2-1 sind die bei den Transformationsexperimenten verwendeten Kombinationen von Reportergen- und Regulatorgen-Konstrukten sowie die

verwendete Plasmidmenge dargestellt. Alle Plasmide wurden in einer Konzentration von 1 µg/µl eingesetzt.

Plasmid-Kombination	Promor Reporter- gen	pAct R nos	pAct C1 nos	pAct InD1 nos	35S- Gus nos	pAct
Promotor-Reportergen	2 µl	-	-	-	2 µl	6 µl
Promotor-Reportergen / pAct-R	2 µl	2 µl	-	-	2 µl	4 µl
Promotor-Reportergen / pAct-C1	2 µl	-	2 µl	-	2 µl	4 µl
Promotor-Reportergen / pAct-InD1	2 µl	-	-	2 µl	2 µl	4 µl
Promotor-Reportergen / pAct-R/C1	2 µl	2 µl	2 µl	-	2 µl	2 µl
Promotor-Reportergen / pAct-R/InD1	2 µl	2 µl	-	2 µl	2 µl	2 µl
Promotor-Reportergen / pAct-C1/InD1	2 µl	-	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl
Promotor-Reportergen / pAct-R/pAct-C1/pAct-InD1	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	-
35S-Luciferase	2 µl	-	-	-	2 µl	6 µl
Kontrolle ohne DNA	-	-	-	-	-	-

Tab. 2.20.2-1: Die bei den Transformationen verwendeten Kombinationen der Reporter- und Regulatorgen-Konstrukte. Details zu den Konstruktakürzungen sind dem Ergebnisteil zu entnehmen.

2.20.3 Transformation mit der Partikelkanone

Zum Beschuß der Maisembryonen wurden 6 µl des mit DNA beschichteten Goldansatzes (2.20.2) gleichmäßig auf einen Makrocarrier aufgetragen. Der Makrocarrier wurde in die Apparatur eingesetzt und die Plasmid-DNA nach dem in der Abbildung 2.20-1 beschriebenen Prinzip in die vorbehandelten Skutellumzellen transformiert. Mit jeder Plasmidkombination wurden zwischen drei und fünf Parallelexperimente durchgeführt.

Nach der Transformation wurden die Embryonen bei 24°C und einem Licht/Dunkelrhythmus (16h/8h) für 24 bis 36 h in einer Klimakammer inkubiert.

2.20.4 Proteinextraktion

Zur Untersuchung der transformierten Embryonen auf die Reportergen-Aktivität wurden nach der Inkubation die Proteine aus den Embryonen extrahiert. Die Embryonen wurden dazu in ein Eppendorfgefäß mit zwei Stahlkugeln (mit einem Durchmesser von 3 mm) überführt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und in einer Schwingmühle bei einer Frequenz von 26 Schwingungen pro Minute pulverisiert. Zum gefrorenen Pulver wurden 200 µl EGL-Puffer (0,1 KPO₄, 1 mM EDTA, 10 mM DTT, 5% Glycerol) gegeben. Die Proben wurden sofort gemischt und 10 min bei 14000 rpm und 2°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein vorgekühltes Eppendorfgefäß überführt und nach erneuter Zentrifugation bis zur Bestimmung der Luciferase- und β-Glucuronidase-Aktivitäten auf Eis gehalten (2.21).

2.21 Nachweis der Aktivität von Reportergenen

Beim Aktivitätsnachweis des Luciferase- und des β-Glucuronidase-Reportergens werden die entsprechenden Enzyme durch Genaktivierung exprimiert, die Aktivität der Enzyme kann im Proteinextrakt des aufgearbeiteten Pflanzenmaterials mit spezifischen Enzymassays bestimmt werden.

2.21.1 Luciferase-Assay

Die Luciferase katalysiert bei Zugabe der Substrate „beetle-Luciferin“ und ATP eine Reaktion, bei der das „beetle-Luciferin“ zu einem Oxyluciferin oxidiert wird und gleichzeitig Kohlendioxid, AMP und Licht freigesetzt werden. Die Lichtemission kann mit einem Luminometer gemessen werden.

Zur Bestimmung der Luciferase-Aktivität wurde das „Luciferase Assay System“ (Promega) verwendet und die Messungen der bei der Reaktion entstehenden Lumineszens wurden mit dem Lumat LB 9501 (Berthold, Wildbad) entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt.

Für die Messung wurden folgende Gerätparameter eingestellt: Messzeit 60 sec; Delay 0; max Background 50 RLU/s.

20 µl eines Zellextraktes, der aus den transformierten Embryonen gewonnen wurde (2.20.4), wurden in ein Meßröhrchen überführt und 2 min bei RT inkubiert. Nach Inkubation der Probe wurde das Meßröhrchen in das Gerät eingesetzt und nach automatischer Injektion von 100 µl des Substrates die bei der Reaktion entstandene Lichtemission gemessen.

Die erhaltenen Messwerte wurden auf zwei verschiedenen Wegen ausgewertet: als Luc/Gus Verhältnisse und relativ prozentual zum 35S-Luc-Konstrukt (= Luc/Gus) sowie andererseits nur als relative Luciferase-Aktivität prozentual zum 35S-Luc-Konstrukt (= Luc). In beiden Ansätzen wurde dazu der Wert für das Referenzkonstrukt 35S-Luc gleich 100% gesetzt.

Luc/Gus: Bei der Auswertung der Experimente wurden die für jeden Transformationsansatz erhaltenen Luciferase-Aktivitäten durch die Gus-Aktivität des entsprechenden Transformationsansatzes geteilt (Luc/Gus). Aus den Parallelmessungen wurden Mittelwerte bestimmt. Die Mittelwerte wurden prozentual zu der Luc/Gus Aktivität der positiven Kontrolle (des 35S-Luciferase-*nos*-Plasmids) ausgewertet. Dazu wurde die bei diesem Konstrukt berechnete Luc/Gus-Aktivität in jedem Experiment gleich 100% gesetzt und alle anderen Ergebnisse eines Experimentes wurden relativ zu diesem Wert berechnet.

Luc: Aus den Parallelmessungen der Luciferase-Aktivitäten in einem Experiment wurden die Mittelwerte bestimmt und diese dann prozentual zu der Luciferase-Aktivität der positiven Kontrolle (35S-Luc-*nos*) ausgewertet. Die gemittelte Enzymaktivität des 35S-Luciferase-*nos*-Konstruktes wurde in jedem Experiment gleich 100% gesetzt.

Die Ergebnisse verschiedener unabhängiger Experimente wurden bei beiden Berechnungsverfahren gemittelt und es wurde die Standardabweichung der Mittelwerte mit einem Kalkulationsprogramm (Microsoft Excel) errechnet.

2.21.2 β -Glucuronidase-Assay

Der β -Glucuronidase-Assay beruht auf einer Lumineszenzreaktion, die entsteht, wenn ein Substrat durch die β -Glucuronidase-Aktivität umgesetzt wird. Für den Nachweis der β -Glucuronidase-Aktivität wurde das „Gus-lightTM“

chemiluminescent reporter gene assay Kit“ (Tropix, PE Biosystems, Bedford, USA) verwendet. Die Messungen der Lumineszenz wurden mit dem Lumat LB 9501 durchgeführt. Das Gerät wurde für die Messungen, wie in 2.21.1 beschrieben, vorbereitet. Bei den Geräteparametern wurde die Messzeit auf 10 sek geändert.

Für die Bestimmung der β -Glucuronidase-Aktivität wurden 20 μ l des 1:100 in Reaktionspuffer (Tropix, PE Biosystems) verdünnten Glucuron[®]-Chemiluminescent-Substrates zu 20 μ l des Zellextraktes zugegeben und 15 min bei RT inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Probe in das Gerät eingesetzt, und die Lumineszenzreaktion durch die automatische Injektion des inhibierenden „Accelerators“ (Tropix, PE Biosystems) ausgelöst. Die Auswertung der Daten erfolgte wie zuvor (2.21.1) beschrieben.

3. Ergebnisse

Der Anthocyanbiosyntheseweg von Mais ist aufgrund der deutlichen phänotypischen Ausprägung ein sehr gutes Modellsystem, um die Regulation von Genen zu untersuchen und zu verstehen. Durch die Nutzung von Mutanten der Anthocyanbiosynthese war es in der Vergangenheit möglich, viele regulatorische und strukturelle Komponenten der Anthocyanbiosynthese zu identifizieren (1.1). Die genetische Ursache für zahlreiche weitere phänotypisch sichtbare Mutationen dieses Stoffwechselweges ist jedoch noch weitgehend ungeklärt.

Zwei Mutanten, *C2-Idf* (*Inhibitor diffuse*) und *C1^S* („S“ – strong) weisen sehr auffällige und entgegengesetzte Farbveränderungen des Korns auf: während die *C2-Idf*-Mutante farblose Körner besitzt, ist die *C1^S*-Mutante durch schwarze Körner gekennzeichnet.

Die Analyse des Anthocyangehaltes im Aleuron der *C2-Idf*-Linie durch Dünnschichtchromatographie zeigte, dass in dieser Linie keine Pigmente dieser Stoffklasse produziert werden (Ceska und Styles, 1976). In dieser Linie ist das *C2*-Gen mutiert und wird durch drei *C2*-homologe Kopien repräsentiert (Borchert, 1998). Interessanterweise führen Kreuzungen der *C2-Idf*-Linie mit dem Wildtyp zu einer verminderten Pigmentierung in den Körnern (Abb. 1.1.2-1). Offensichtlich handelt es sich hierbei um eine dominante, inhibitorische Mutation.

Die *C1^S*-Mutante weist die intensive Färbung nicht nur im Maiskorn, sondern auch in den anderen Pflanzengewebe auf. In dieser Linie wird eines der Regulatorgene, *C1*, verstärkt exprimiert (Scheffler *et al.*, 1993). Das *C1^S*-Allel ist dominant über dem *C1*-Allel des Wildtyps.

Um Fragen zur Genregulation des Anthocyanbiosyntheseweges, in dem Struktur- und Regulator-Gene miteinander in Wechselwirkung stehen, nachzugehen, war ein Ziel der vorliegenden Arbeit, die *C2-Idf*- und die *C1^S*-Mutante hinsichtlich der Expression von Anthocyanogenen im Aleuron mittels RT-PCR zu untersuchen. Auf diese Weise sollten weitere molekulare Anhaltspunkte und Ansätze für die Untersuchung der Ursachen der phänotypischen Ausprägung gefunden werden.

3.1 Expressionsanalyse von regulierenden und strukturellen Anthocyanbiosynthesegenen mittels RT-PCR

Um ein Bild über die Expression von Regulator- und Strukturgenen im Aleuron der Linien *C2-Idf* und *C1^S* zu erhalten, wurden RT-PCR Analysen durchgeführt.

Wie bereits erwähnt wurde (Abb. 1.1.2-1), wird bei der Kreuzung der *C2-Idf*-Linie mit einer Wildtyplinie mit Zunahme der *C2-Idf*-Allele eine Abnahme der Anthocyanbiosynthese in den Körnern beobachtet. Um zu untersuchen, ob dieser Gen-Dosis-Effekt auch auf der Expressionsebene beobachtet werden kann, wurde das entsprechende Pflanzenmaterial durch reziproke Kreuzung des Wildtyps mit der *C2-Idf*-Mutante hergestellt:

Für die RT-PCR-Untersuchungen wurden folgende Mais-Linien verwendet:

- die Wildtyplinie *LC (wt)*, in der alle untersuchten Gene homozygot dominant vorliegen;
- die Maislinie *C1^S*;
- die Linie *C2-Idf*, in der das *C2-Idf*-Allel homozygot dominant vorliegt;
- die Kreuzung *wt/C2-Idf*, in der zwei Allele des Wildtyps und ein Allel der *C2-Idf*-Mutante vorliegen;
- die Kreuzung *C2-Idf/wt*, in der zwei Allele der *C2-Idf*-Mutante und ein Allel des Wildtyps vorliegen.

Da die Regulatorgene nicht nur gewebespezifisch, sondern möglicherweise auch entwicklungspezifisch exprimiert werden, wurden für die RT-PCR-Analysen der Wildtyp-Linie *LC* und der *C2-Idf*-Linie RNAs aus Körnern unterschiedlicher Zeitpunkte nach Pollinierung (DAP) eingesetzt. Zunächst wurde die Gesamt-RNA aus 17 bis 30 DAP Körnern der oben erwähnten Maislinien isoliert (2.7.1). Von der Gesamt-RNA wurden durch reverse Transkription mit Oligo-dT Primern cDNAs hergestellt (2.14.1). Um Kontaminationen mit genomischer DNA zu identifizieren und um gleiche cDNA-Mengen als Ausgangsmaterial zu gewährleisten, wurden PCRs mit den Primern 5`*L39a* und 3`*L39b* durchgeführt (2.14.2). Diese Primer ermöglichen die Amplifikation des konstitutiv exprimierten Gens *ZmRPL39*. Dieses Gen kodiert für ein ribosomales Protein (Dresselhaus *et al.*, 1999). Anschließend wurden PCR-Reaktionen mit genspezifischen Primern (Tab. 2.14.2-1) durchgeführt (2.14.2).

Zusätzlich wurden parallel mit jedem Primerpaar Wasserkontrollen angesetzt. Die Amplifikate wurden in einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt (2.8), auf eine Membran transferiert und mit den genspezifischen radioaktiv markierten Sonden (2.15.2) hybridisiert. (2.9; 2.11; 2.12).

Um die Genexpression mittels RT-PCR quantifizieren zu können, ist es erforderlich, die optimale Zyklenzahl der PCR-Reaktion für jedes Gen zu bestimmen, damit die Amplifikatmenge einerseits detektierbar ist und sich noch in der exponentiellen Phase der Amplifikation befindet. Zu diesem Zweck wurde ein repräsentativer Vorversuch mit drei Genen (*A1*, *R* und *ZmRPL39*) vorgenommen. Dafür wurden von derselben Wildtyp-cDNA (27 DAP) PCRs mit jeweils zwei Primerpaaren (Tab. 2.14.2-1) gleichzeitig durchgeführt (für die Gene *A1* und *ZmRPL39*; bzw. für die Gene *R* und *ZmRPL39*). Dabei wurde die Zyklenzahl variiert (27, 23, 20, 17 und 15 Zyklen).

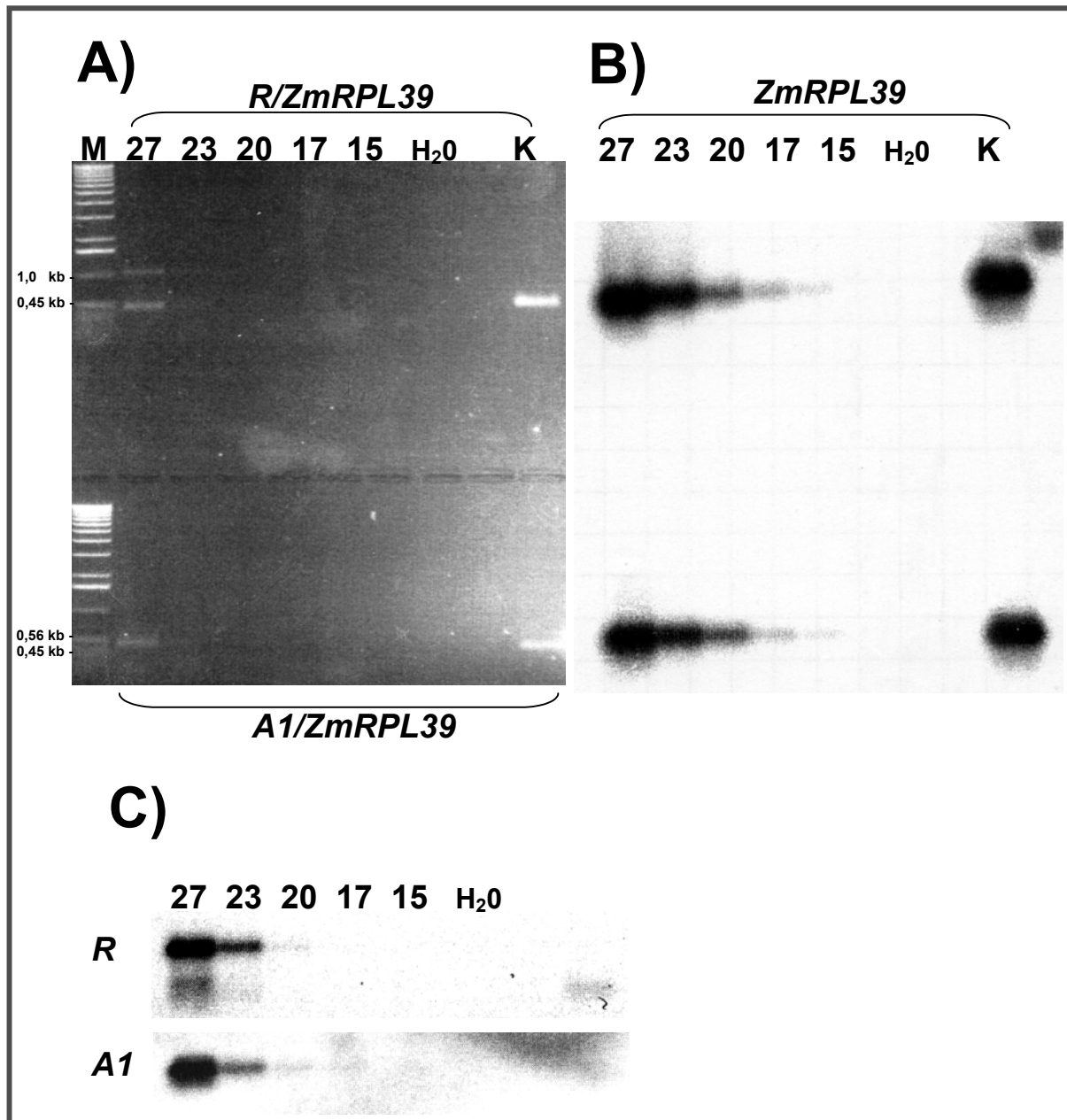


Abb. 3.1-1: Bestimmung der optimalen Anzahl der PCR-Zyklen für semiquantitative RT-PCR. **A)** 1%iges Agarosegel mit genspezifischen PCR-Amplifikaten ausgehend von derselben Wildtyp-cDNA: oben – Amplifikate mit den Primern für das *R*- und das *ZmRPL39*-Gen, unten – Amplifikate mit den Primern für das *A1*- und *ZmRPL39*-Gen. **M** = 1 kb Ladder (Boehringer Mannheim). Die Zahlen geben die Anzahl der durchgeführten PCR-Zyklen an. **H₂O** – Wasserkontrolle. **K** = PCR mit den *ZmRPL39*-Primern ausgehend von Plasmid-DNA als positive Kontrolle. **B)** Hybridisierung der auf eine Membran übertragenen Amplifikate mit einer radioaktiv markierten *ZmRPL39*-Sonde. **C)** Hybridisierung derselben Membran mit einer radioaktiv markierten *R1*- und einer radioaktiven *A1*-Sonde.

Die Amplifikate wurden in einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt (Abb. 3.1-1, A), auf eine Membran übertragen und zuerst mit einer spezifischen Sonde für das *ZmRPL39*-Gen hybridisiert (Abb. 3.1-1, B). Anschließend wurde dieselbe Membran mit einer *R*- bzw. einer *A1*-spezifischen Sonde hybridisiert (Abb. 3.1-1, C). Das

Ergebnis dieses Vorversuches ergab, dass die für die semiquantitative Untersuchung der Genexpressionen geeignete Anzahl der PCR-Zyklen 25 ist. Dementsprechend wurden die weiteren PCR-Experimente mit 25 Zyklen durchgeführt.

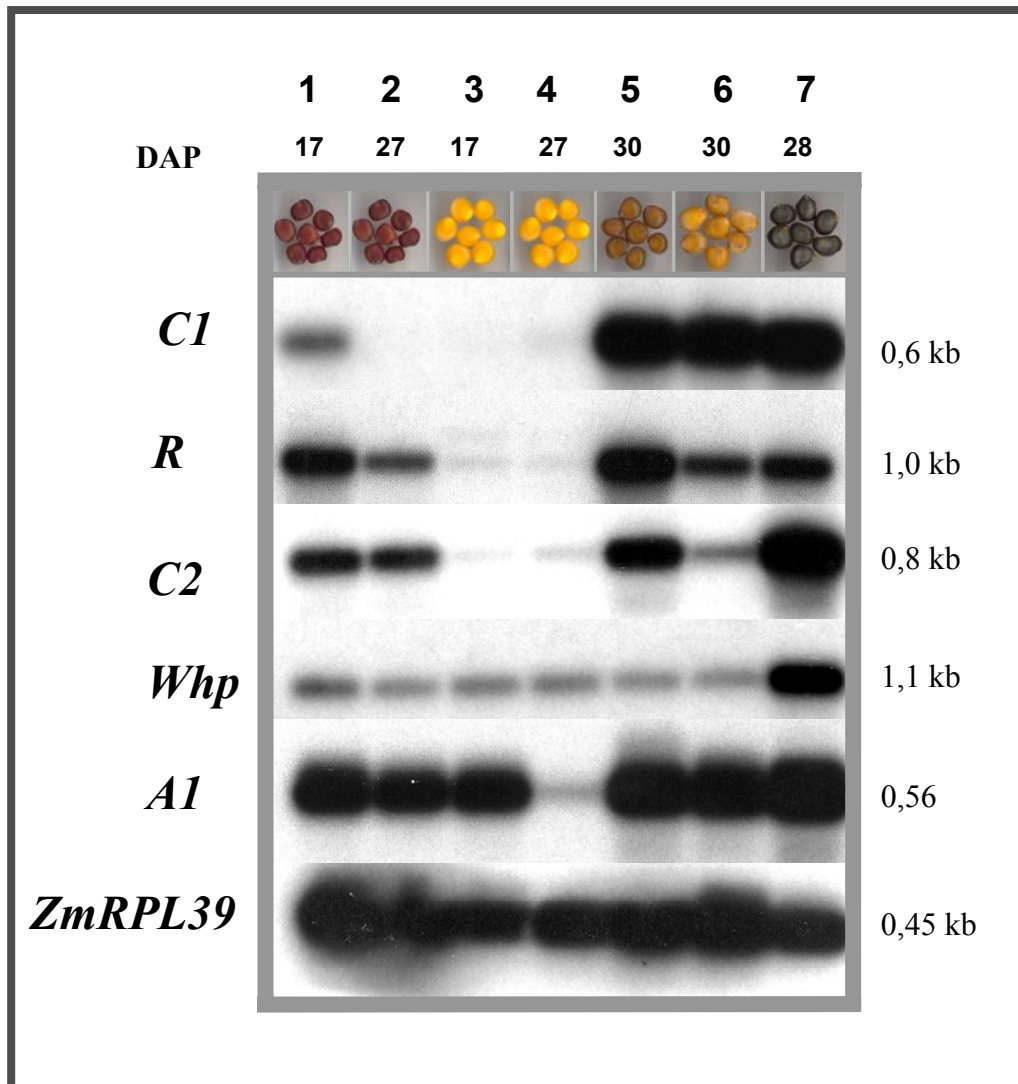


Abb. 3.1-2: Expressionsanalyse von regulierenden (*R*, *C1*) und strukturellen (*C2*, *Whp*, *A1*) Anthocyanbiosynthesegenen im Maiskorn mittels RT-PCR. Für die semiquantitative Analyse der Genexpression wurde Gesamt-RNA aus Maiskörnern verschiedener Genotypen und Entwicklungsstadien (1 und 2 Wildtyp, 3 und 4 *C2-ldf*-Mutante, 5 Kreuzung *wt/C2-ldf*, 6 Kreuzung *C2-ldf/wt*, 7 *C1^S*) mit Oligo-dT Primern in cDNA umgeschrieben und anschließend mit genspezifischen Primern (Tab. 2.14.2-1) in 25 PCR-Zyklen amplifiziert. Die Amplifikate wurden jeweils in einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt, auf eine Membran transferiert und mit den radioaktiv markierten genspezifischen Sonden hybridisiert. Die Größen der Amplifikate sind rechts angegeben. DAP = Tage nach der Pollinierung.

Die Ergebnisse der semiquantitativen RT-PCR Expressionsanalysen der regulativen *R*- und *C1*-Gene sowie der strukturellen Anthocyanbiosynthesegene *C2*, *Whp* und *A1* im Maiskorn sind in der Abbildung 3.1-2 gezeigt. Außerdem wurden die

Autoradiogramme densitometrisch ausgewertet. Die relativen Genexpressionen sind in Form von Diagrammen in der Abbildung 3.1.-3 dargestellt.

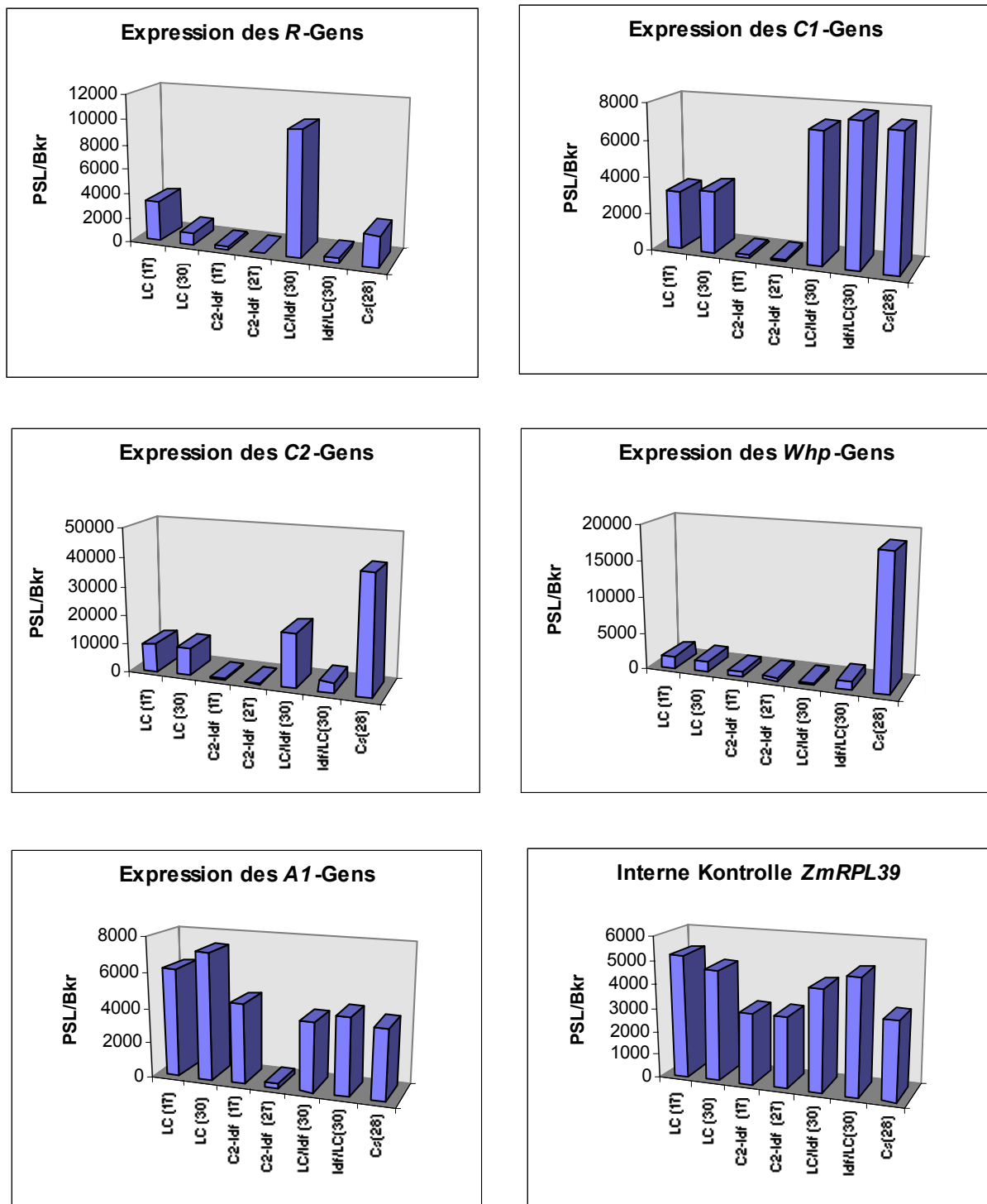


Abb. 3.1-3: Quantifizierung der Transkriptmengen regulativer und struktureller Gene der Anthocyanbiosynthese im Maiskorn verschiedener Genotypen. Die durch RT-PCR mit genspezifischen Primern erhaltene Amplifikate wurden in Southern-Blot-Analysen mit genspezifischen Sonden detektiert (Abb. 3.1.-2). Die Transkriptmengen wurden durch densitometrische Auswertung mit dem pcBAS-Programm bestimmt und sind als relative Einheiten abgeglichen gegen das Hintergrundsignal (PSL/Bkr) dargestellt.

Die Ergebnisse der Expressionsanalysen von regulatorischen und strukturellen Anthocyanbiosynthesegenen im Aleuron zeigen, dass beim Wildtyp, in dem alle Gene homozygot dominant vorliegen, die Transkripte aller untersuchten Gene vorhanden sind (Abb. 3.1-2, Spuren: 1 und 2). Nur 27 Tage nach der Pollinierung konnte keine Expression des *C1*-Gens im Wildtyp nachgewiesen werden. Dies könnte möglicherweise auf eine entwicklungspezifisch regulierte Genaktivität zurückzuführen sein.

In der Linie *C2-ldf* ist die Transkriptmenge der beiden Regulatorgene *R* und *C1* sowie des *C2*-Gens gegenüber dem Wildtyp stark reduziert (Abb. 3.1-2, Spuren: 3 und 4). Die Expression der Strukturgene *Whp* und *A1* ist im Vergleich zum Wildtyp dagegen nicht verändert. Die Expression des Strukturgens *A1* ist 17 Tage nach der Pollinierung mit der des Wildtyps vergleichbar, jedoch 27 Tage nach der Pollinierung ebenfalls deutlich reduziert.

Es ist nicht auszuschließen, dass die mit der *C2*-Sonde in geringer Menge bei der Linie *C2-ldf* nachzuweisenden Amplifikate von *Whp*-Transkripten stammen. Da die Gene *C2* und *Whp* eine Homologie von 95% in der kodierenden Region aufweisen (Franken *et al.*, 1991), ist es möglich, dass mit den in diesen Experimenten verwendeten *C2*-Primern auch PCR-Amplifikate des *Whp*-Gens erhalten wurden. Dagegen ist es nicht möglich, mit den in diesen Untersuchungen verwendeten *Whp*-Primern *C2*-spezifische Amplifikate zu bekommen, weil sich die Position des JK3`*Whp*-Primers im *Whp*-spezifischen 3`-UTR-Bereich befindet.

In der Kreuzung *wt/C2-ldf* (30 Tage nach Bestäubung), bei der zwei *C2*-Allele des Wildtyps und ein *C2-ldf*-Allel vorliegen (Abb. 3.1-2, Spur 5), ist die Expressionsstärke aller untersuchten Gene 30 Tage nach Pollinierung vergleichbar mit der Genexpression im Wildtyp 17 Tage nach Pollinierung (Abb. 3.1-2, Spur 1).

In der Kreuzung *C2-ldf/wt* (30 Tage nach Bestäubung), in der zwei *C2-ldf*-Allele und ein *C2*-Allel des Wildtyps vorliegen (Abb. 3.1-2, Spur 6), ist die Menge der *C2*- und *R*-Transkripte reduziert. Alle übrigen Genexpressionen entsprechen der Wildtypsituation.

In dem Genotyp *C1^S* wurde eine gegenüber dem Wildtyp verstärkte Expression aller untersuchten Gene beobachtet (Abb. 3.1-2, Spur 7). Erstaunlicherweise ist die Transkriptmenge des *Whp*-Gens in diesem Genotyp im

Vergleich mit den anderen Linien ebenfalls deutlich erhöht, während im Vergleich der anderen Linien untereinander die Expressionsstärke dieses Gens verhältnismäßig konstant ist.

Bei den Expressionsanalysen der zwei Mutanten-Linien *C1^S* und *C2-Idf* wurden folgende Veränderungen festgestellt:

Bei der Expressionsanalyse der *C2-Idf*-Linie konnten sehr geringe *C1*- und *R*- und wenig bzw. keine *C2*-Gentranskripte nachgewiesen werden (Abb. 3.1-2). Jedoch sind die Transkripte der Strukturgene *Whp* und *A1* vorhanden, was darauf hindeutet, dass die Regulatorgene *C1* und *R* in der *C2-Idf*-Linie zumindest bezüglich dieser Strukturgene funktionsfähig sind. Diese und andere Daten (Borchert, 1998) deuten darauf hin, dass die Ursache für den *C2-Idf*-Phänotyp möglicherweise in der Struktur des *C2-Idf*-Allels liegt. Deshalb sollten im weiteren Verlauf der vorliegenden Arbeit vertiefende Untersuchungen zur Struktur der *C2*-Genkopien dieses Allels durchgeführt werden (3.2).

In der *C1^S*-Linie wurde im Vergleich mit den anderen Linien eine außergewöhnlich starke Expression des *Whp*-Gens festgestellt (Abb. 3.1-2). Die möglichen Ursachen dafür könnten sowohl Veränderungen in dem kodierenden Bereich des *Whp*-Gens, als auch Sequenzunterschiede in den für die Genregulation essentiellen Bereichen der Promotor-, 5'-UTR- und 3'-UTR-Region sein. Um diese Frage detaillierter zu untersuchen, sollten zunächst die *Whp*-cDNAs aus der Wildtyp und der *C1^S*-Linie kloniert und miteinander verglichen werden und danach die Untersuchungen auf die regulatorischen Bereiche des Gens ausgedehnt werden (3.3).

3.2 Analyse der *C2-Idf*-Mutante

In der *C2-Idf*-Linie (*Inhibitor diffuse*) ist das Gen für die *Chalkonsynthase C2* mutiert. Dieses Enzym katalysiert den ersten Schritt der Anthocyanbiosynthese. Deshalb werden im Aleuron dieser Mutante keine Pigmente produziert, die Körner sind farblos. Bei der reziproken Kreuzungen des Wildtyps mit der *C2-Idf*-Linie ist eine Reduktion des Pigmentgehaltes in den Maiskörnern (1.1.2) und in anderen anthocyanhaltigen Pflanzengewebe mit der Zunahme der *C2-Idf*-Allele zu erkennen (Ceska und Styles, 1976). Das *C2-Idf*-Allel scheint einen dominanten, inhibitorischen Einfluß auf das *C2*-Allel des Wildtyps zu haben.

Die Expressionsanalysen von Anthocyanogenen im Aleuron der *C2-Idf*-Mutante im Vergleich mit dem Wildtyp zeigen (Abb. 3.1-2), dass in der Linie *C2-Idf* vermutlich keine oder nur sehr wenige *C2*-Transkripte vorliegen und die Transkriptmengen der beiden Regulatorgene *R* und *C1* stark reduziert sind. Die Expression der anderen Strukturgene *Whp* und *A1* bleibt jedoch unverändert (Abb.3.1-2). Demzufolge könnte die geringe Menge bzw. Abwesenheit von *C2*-Transkripten in der *C2-Idf*-Linie auf die Struktur der *C2-Idf*-Genkopien zurückzuführen sein. Deshalb könnte die Aufklärung der Struktur der drei *C2-Idf*-Genkopien helfen, die Funktion der Mutation zu verstehen.

Aus früheren Untersuchungen ist bekannt, dass das mutierte *C2*-Gen in der *C2-Idf*-Linie vermutlich durch drei defekte *C2*-homologe Kopien repräsentiert wird (Borchert, 1998). Zwei Teilsequenzen dieser *C2-Idf*-Genkopien wurden bereits kloniert und durch Sequenzanalyse charakterisiert (Wienand, unveröffentlicht; Borchert, 1998).

Dementsprechend sollte in diesem Teil der Arbeit die Struktur des *C2-Idf*-Allels weiter untersucht werden.

3.2.1 Molekulare Charakterisierung der *C2-Idf*-Mutante

Die bislang klonierten Teilsequenzen von zwei der vermutlich drei *C2-Idf*-Kopien wurden als Klon 55 (8 kb) und Klon *Qb* (5 kb) bezeichnet (Wienand, unveröffentlicht; Borchert, 1998). Die Sequenzanalyse ergab, dass die Veränderungen in der Struktur dieser gefundenen genomischen *C2-Idf*-Klone gegenüber dem *C2*-Wildtypgen sehr groß sind. Die Struktur der *C2-Idf*-Klone und des *C2*-Gens aus dem Wildtyp (Wienand *et al.*, 1986) ist schematisch in der Abbildung 3.2.1-1 dargestellt.

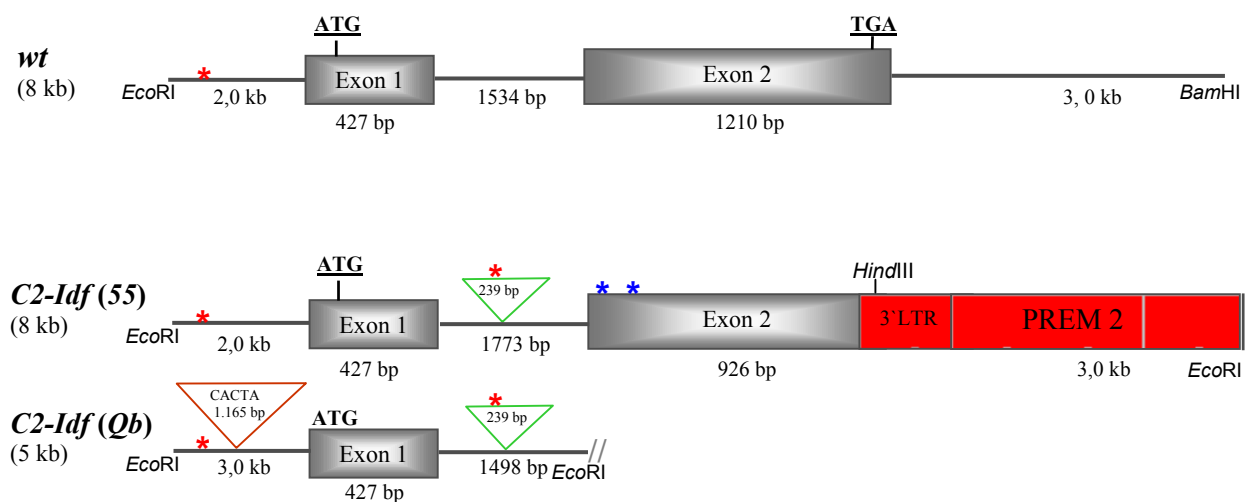


Abb. 3.2.1-1: Schematische Darstellung der *C2-Idf*-Klone im Vergleich mit dem *C2*-Wildtypgen. Strukturvergleich der *C2-Idf*-Klone 55 und *Qb* mit dem *C2*-Wildtyp (*wt*) (nach Daten von Borchert, 1998). Die roten Sternchen bezeichnen *EcoRV* Schnittstellen, die im Promotor des Wildtyps und im Promotor der beiden *C2-Idf*-Klone vorkommen. Eine zweite *EcoRV* Schnittstelle ist nur in den *C2-Idf*-Klonen (innerhalb einer Insertion im Intron) vorhanden. Die blauen Sternchen im zweiten Exon des Klons 55 bezeichnen zwei Nukleotidunterschiede gegenüber dem Wildtyp.

Die Sequenz der beiden Klone enthält eine *EcoRI* Schnittstelle, die auch im Wildtypallel (*C2-wt*) vorhanden ist. Im Promotor-Bereich des Klons *Qb* kommt ein 1,165 kb langes transponierbares *CACTA*-Element vor. Die Sequenzen des ersten Exons der beiden *C2-Idf*-Klone 55 und *Qb* sind zu der Sequenz des *C2-wt* Allels homolog.

Ein weiterer grosser Unterschied bei beiden *C2-Idf*-Genkopien ist eine Insertion von 239 bp im Intron. Diese Insertion enthält eine *EcoRV* Schnittstelle, die für das *C2-Idf*-Allel spezifisch ist. Bei einer genomischen Southern-Analyse mit einer Promotor-Sonde können zwei der drei *C2-Idf*-Genkopien wegen der

unterschiedlichen Struktur des vorderen Genbereiches voneinander unterschieden werden (Abb. 3.2.1-2). Das Bandenmuster dieser Hybridisierung deutet darauf hin, dass zwei *C2-ldf*-Kopien (Klon 55 und eine dritte bislang nicht identifizierte Genkopie) im Promotor-Bereich identisch sind und kein *CACTA*-Element enthalten. Diese Genkopien werden durch eine stark hybridisierende 3 kb Bande repräsentiert. Das genomische *EcoRV* DNA-Fragment des Klons *Qb* ist, bedingt durch das *CACTA*-Element im Promotor-Bereich, um 1 kb länger und entspricht der 4 kb Bande in der Southern-Analyse (Abb. 3.2.1-2).

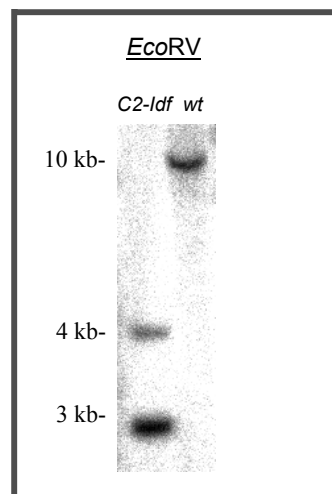


Abb. 3.2.1-2: Southern-Blot-Analyse von genomischer *C2-ldf*- und Wildtyp-DNA mit einer Sonde aus dem *C2*-Promotor-Bereich. Jeweils 10 µg der mit dem Restriktionsenzym *EcoRV* gespaltenen genomischen *C2-ldf*- und *LC*-DNA wurden in einem 0,6%igen Agarosegel aufgetrennt und nach Kapillartransfer auf eine Membran mit dem radioaktiv markierten *C2*-spezifischen Promotor-Fragment (0,8 kb *Hinfl*) hybridisiert.

Das zweite Exon des Klons 55 ist durch eine Insertion unterbrochen, die das 3'-LTR (Long Terminal Repeat) und einen Teil der internen Sequenz eines Retrotransposons enthält. Der klonierte Teil der Insertion ist 3 kb lang und ist teilweise zu dem Mais Retrotransposon *PREM-2* (Pollen retro element maize-2, Turcich *et al.*, 1996) homolog (75%). Als weiterer Unterschied zwischen dem Klon 55 und dem *C2*-Wildtyp-Gen sind zwei Basenaustausche am Anfang des zweiten Exons vorhanden, die jedoch zu keiner Veränderung in der Aminosäuresequenz führen (Abb. 3.2.1-1).

3.2.2 Herstellung und Screening einer *C2-Idf* genomischen Bank

Basierend auf den vorliegenden Sequenzinformationen wurden Experimente durchgeführt, um die Struktur des *C2-Idf*-Allels durch Klonierung weiter zu vervollständigen.

Aufgrund von genomischen Southern-Blot-Analysen mit einem *C2*-spezifischen Promotor-Fragment (Abb. 3.2.2-1) erwies sich *EcoRI* als geeignetes Enzym für die Herstellung einer genomischen Bank in Lambda-Phagen. Das Hybridisierungsmuster der mit *EcoRI* gespaltenen *C2-Idf*-DNA zeigt drei Banden mit Längen von 12, 11 und 8 kb. Fragmente dieser Länge sind für die Klonierung in den Lambda-Vektor gut geeignet (Abb. 3.2.2-1). Aufgrund früherer Untersuchungen ist bekannt, dass das 8 kb-Fragment dem Klon 55 entspricht (Abb. 3.2.1-1).

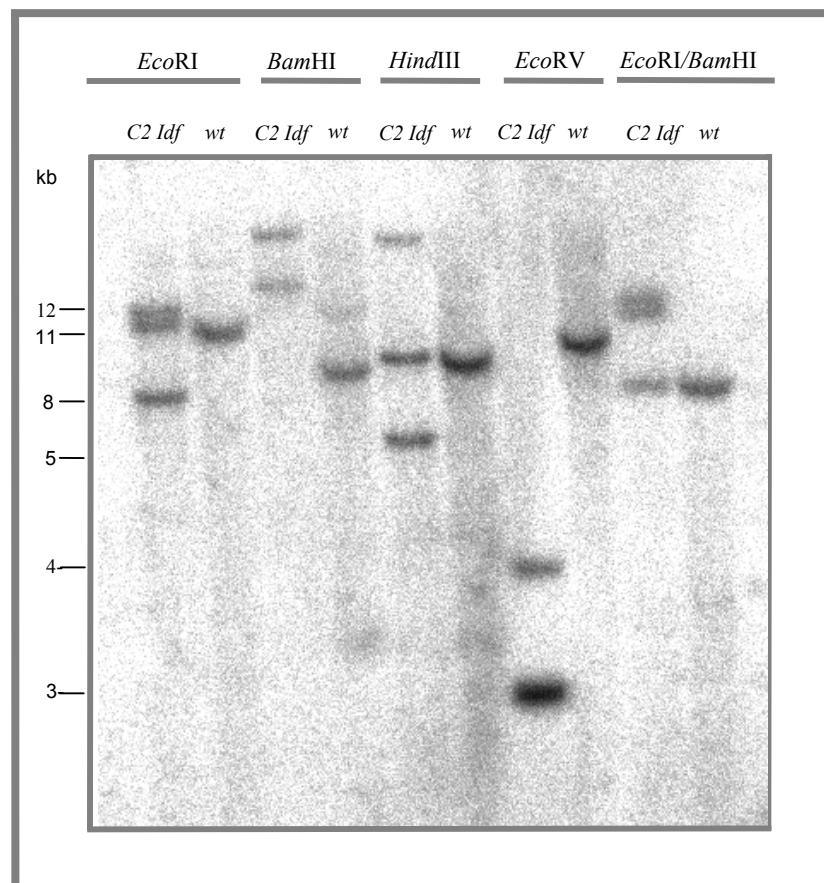


Abb. 3.2.2-1: Southern-Blot-Analyse von genomischer *C2-Idf*- und Wildtyp-DNA mit einer Sonde aus dem *C2*-Promotor-Bereich. Jeweils 10 µg der mit verschiedenen Restriktionsendonukleasen gespaltenen genomischen DNA wurden in einem 0,6%igen Agarosegel aufgetrennt und nach Kapillartransfer auf eine Membran mit dem radioaktiv markierten *C2*-spezifischen Promotor-Fragment hybridisiert. Das Hybridisierungsmuster der mit *EcoRI* gespaltenen *C2-Idf*-DNA zeigt Banden bei 12, 11 und 8 kb.

Für die Herstellung einer genomischen Bank wurde aus Blattmaterial einer *C2-ldf*-Pflanze (Ac Zm 559, GHN 1842) die genomische DNA präpariert (2.6.1), diese vollständig mit *Eco*RI gespalten und über einen Kaliumacetat-Gradienten (2.18.1) größenfraktioniert (Abb. 3.2.2-2, A).

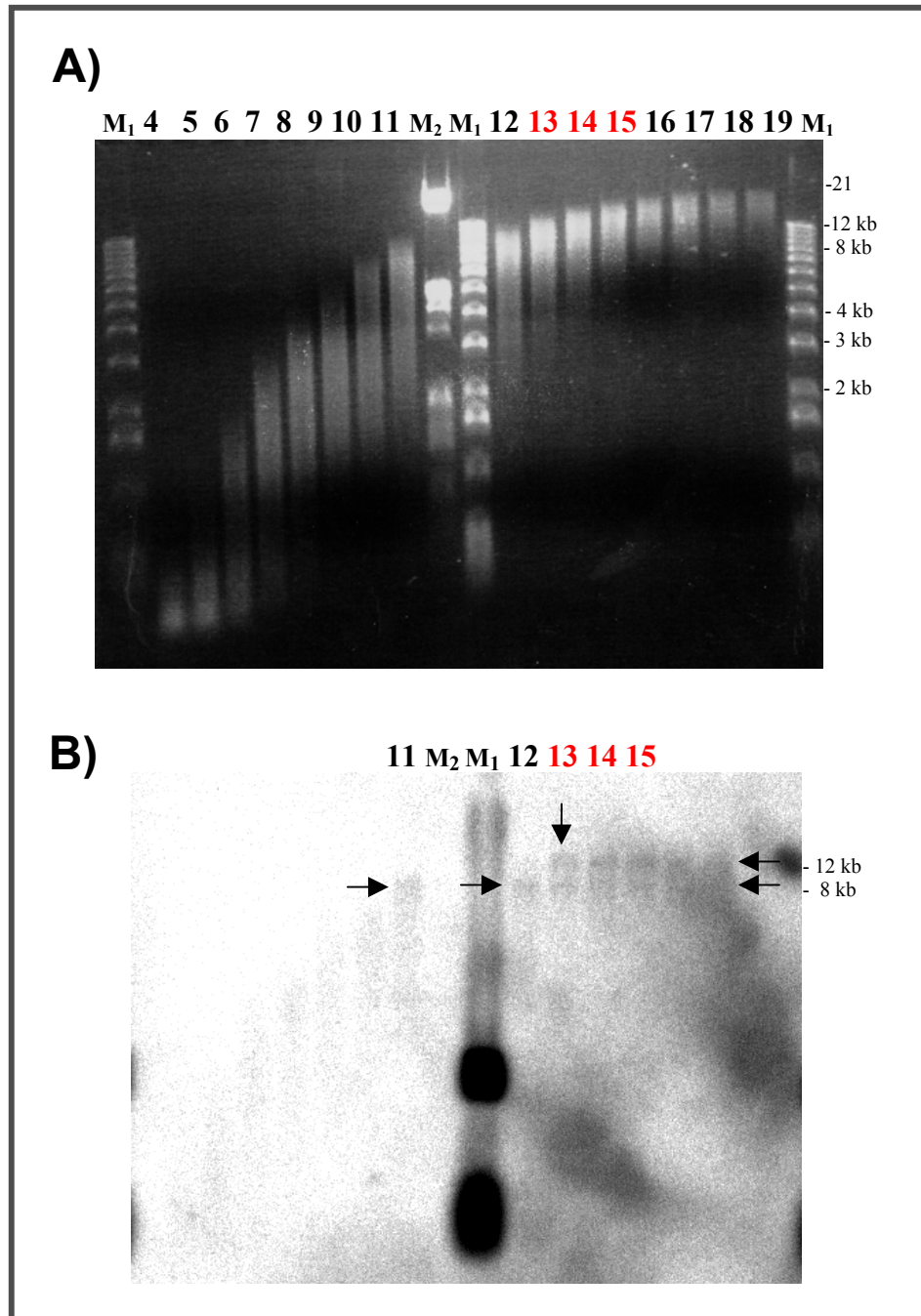


Abb. 3.2.2-2: Southern-Blot-Analyse der mit *Eco*RI gespaltenen und über einen Kaliumacetat-Gradienten aufgetrennten genomischen *C2-ldf*-DNA. A) 500 µg der genomischen *C2-ldf*-DNA wurden mit *Eco*RI vollständig gespalten und durch Zentrifugation über einen Kaliumacetat-Gradienten größenfraktioniert. Jeweils 18 µl der Fraktionen wurden in einem 0,6%igen Agarosegel aufgetrennt. Die Zahlen entsprechen den Fraktionen. M₁ = 1 kb Ladder (Boehringer Mannheim); M₂ = DNA molekular weight marker III (Boehringer Mannheim). Die DNA wurde auf eine Membran übertragen und mit der radioaktiv markierten *C2*-Promotor-Sonde hybridisiert. Pfeile markieren die

hybridisierenden Banden. **B)** Für die Herstellung der genomischen Bank wurden die Fraktionen 13, 14 und 15 verwendet, die in der Abbildung rot gekennzeichnet sind.

Die DNA-Fraktionen wurden in einer Southern-Blot-Analyse mit dem *C2*-spezifischen Promotor-Fragment hybridisiert, um die für die Klonierung von *C2-Idf*-Fragmenten geeigneten DNA-Fraktionen für die Herstellung der Bank auszuwählen.

In den Fraktionen 11 und 12 wurde nur die den Klon 55 repräsentierende 8 kb Bande detektiert (Abb. 3.2.2-2, B). In den Fraktionen 13 bis 17 wurden alle drei Banden der drei *C2-Idf*-Genkopien detektiert. Da es nicht möglich war, bei der Herstellung der Bank die Klonierung des 8 kb großen Fragmentes zu vermeiden, wurden die Fraktionen 13, 14 und 15 ausgewählt und in Lambda *DASH*[®]II/*EcoRI* kloniert (2.18.1).

Die erhaltene genomische Bibliothek mit einem Titer von $1,05 \times 10^6$ pfu wurde mit dem auch zuvor genutzten radioaktiv markierten *C2*-spezifischen Promotor-Fragment (2.15.2) hybridisiert (2.18.2). Bei der ersten Runde wurden 10 positive Signale erhalten. Im Verlauf des Screenings konnten über mehrere Runden der Vereinzelung letztendlich 5 positive Klone isoliert werden. Diese Klone mit den Nummern 2, 11, 17, 20 und 26 wurden über Restriktionsanalysen mit verschiedenen Enzymen hinsichtlich der Größe und der Struktur der enthaltenen genomischen Fragmente untersucht.

Für die Identifizierung der Größe der klonierten genomischen DNA-Fragmente wurden die Phagen-DNAs isoliert (2.6.2) und die Inserts durch die Spaltung mit *EcoRI* von den Phagenarmen getrennt. Die gespaltene Phagen-DNA wurde in einem Gel aufgetrennt (2.8), auf eine Membran transferiert (2.9) und mit der radioaktiv markierten *C2*-spezifischen Promotor-Sonde (2.15.2) hybridisiert (2.11). Die Hybridisierungsergebnisse zeigten, dass alle fünf gefundenen Phagenklone ein 8 kb großes Fragment enthielten (Daten nicht gezeigt).

Um zu untersuchen, ob die neu gefundenen genomischen Phagen-Klone dem Klon 55 entsprechen, oder ob andere unbekannte Bereiche des *C2-Idf*-Allels enthalten sind wurden weitere Restriktionsanalyse durchgeführt.

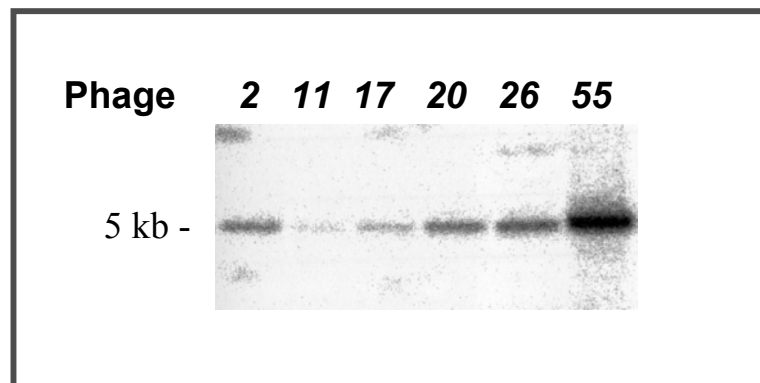


Abb. 3.2.2-3: Southern-Blot-Analyse der *C2-Idf*-Phagen-DNAs und der DNA des Klons 55 mit dem radioaktiv markierten *C2*-Promotor-Fragment. Die Restriktion der Phagen-DNA und der DNA des *C2-Idf*-Klons 55 erfolgte mit den Restriktionsendonukleasen *EcoRI* und *HindIII*. Die gespaltene DNA wurde in einem 0,6%igen Agarosegel aufgetrennt und nach dem Kapillartransfer auf eine Membran mit dem *C2*-spezifischen Promotor-Fragment hybridisiert.

Eine *HindIII* Restriktionsschnittstelle ist sowohl im *C2*-Gen des Wildtyps als auch in der bekannten Sequenz des Klons *Qb* nicht vorhanden. Nur im Retroelement des Klons 55 befindet sich eine *HindIII* Erkennungssequenz (Abb. 3.2.1-1). Bei der Restriktion dieses Klons mit *HindIII* und *EcoRI* und Hybridisierung mit der *C2*-spezifischen Promotor-Sonde wird deshalb ein 5 kb Fragment detektiert. Das Hybridisierungsmuster der mit *HindIII* und *EcoRI* gespaltenen Phagen-DNA der Klone 2, 11, 17, 20 und 26 zeigt ebenfalls eine 5 kb Bande mit der *C2*-Promotor-Sonde. Daraus kann geschlossen werden, dass die neu isolierten *C2-Idf*-Klone vermutlich identisch mit dem Klon 55 sind (Abb. 3.2.2-3). Um dies weiter zu überprüfen, wurden diese Klone außerdem mit dem Restriktionsenzym *EcoRV* geschnitten, da sich die Promotor-Bereiche bei zwei Genkopien mit dieser Restriktionsendonuklease unterscheiden lassen (Abb. 3.2.1-1, 3.2.1-2). Bei der Southern-Blot-Analyse der mit *EcoRV* gespaltenen Phagen-DNA mit dem radioaktiv markierten *C2*-Promotor-Fragment wurde eine 3 kb Bande bei allen Phagen-Klonen und bei dem Klon 55 detektiert (Abb. 3.2.2-4). Die Hybridisierungsanalysen zeigen, dass alle fünf neu gefundenen Klone dem bereits bekannten Klon 55 entsprechen.

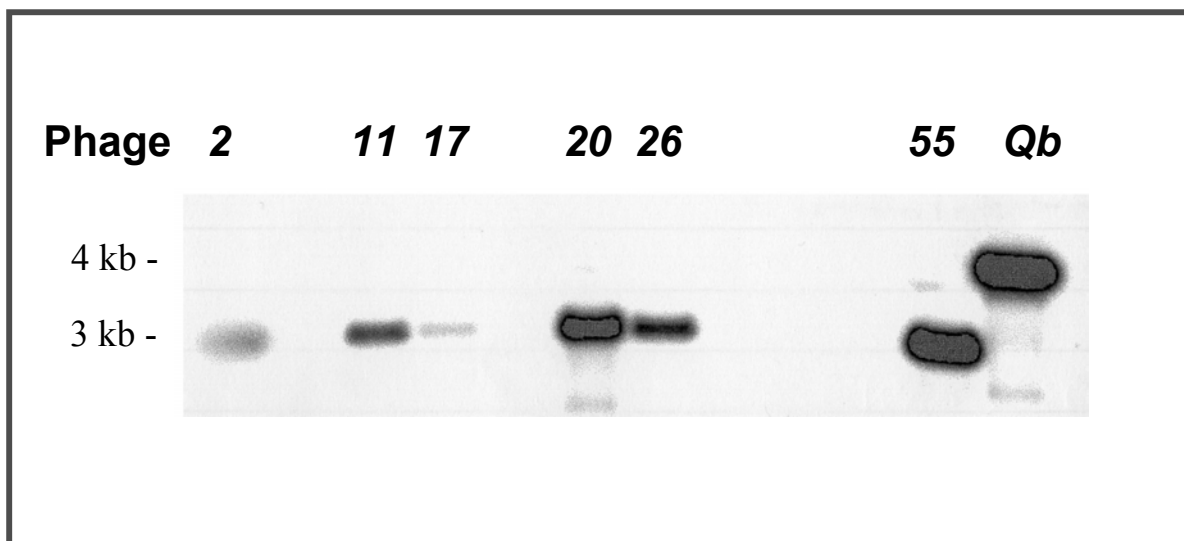


Abb. 3.2.2-4: Southern-Blot-Analyse der *C2-Idf*-Phagen-DNAs und der DNA der *C2-Idf*-Klone 55 und *Qb* mit dem *C2*-Promotor-Fragment. Die Spaltung der *C2-Idf*-Phagen-DNA und der DNA der *C2-Idf*-Klone 55 und *Qb* erfolgte mit der Restriktionsendonuklease *EcoRV*. Die gespaltene DNA wurde in einem 0,6%igen Agarosegel aufgetrennt und die auf eine Membran übertragene DNA mit dem radioaktiv markierten *C2*-spezifischen Promotor-Fragment hybridisiert.

3.2.3 Analyse der *C2-Idf*-Mutante auf genomischer Ebene mittels PCR

Da es nicht möglich war, neue Genbereiche des *C2-Idf*-Allels mit Hilfe einer genomischen Phagenbibliothek zu isolieren (3.2.2), wurden PCR-Experimente zur Charakterisierung der *C2-Idf*-Mutation durchgeführt. Für diese Untersuchungen wurden die *C2*- und *C2-Idf*-spezifischen Primer entsprechend der folgenden Fragestellungen gewählt (Abb. 3.2.3-1):

- sind hinter der Insertion des *PREM-2* Retrotransposons im Klon 55 die übrigen 77 Basenpaare des kodierenden Bereiches und der 3'-UTR des zweiten Exons vorhanden?
- enthält die *C2-Idf*-Kopie *Qb* das zweite Exon und welche Sequenz hat der bislang unbekannt Bereich des Introns?
- wie ist die Struktur der noch unbekannt dritten *C2-Idf*-Kopie?

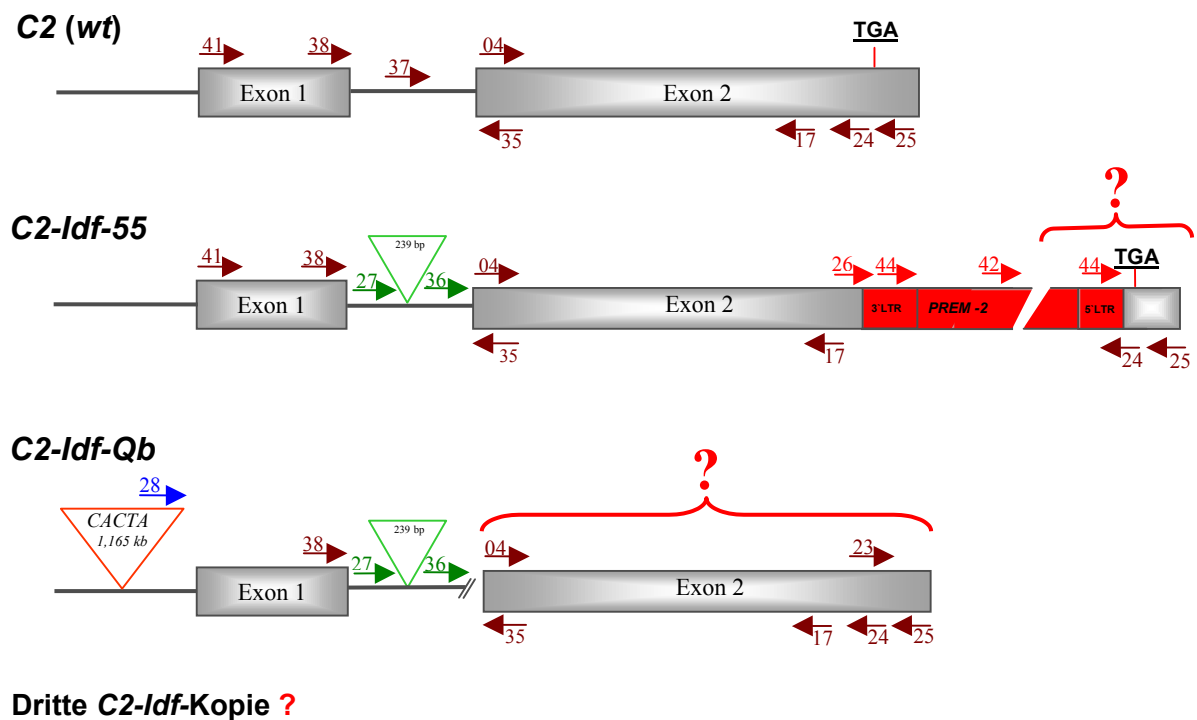


Abb. 3.2.3-1: Schematische Darstellung der Positionen der bei den PCR-Analysen mit genomischer *C2-Idf*-DNA verwendeten *C2*-, *C2-Idf*- und *PREM*-spezifischen Primer. Braun: *C2*-spezifische Primer; grün: *C2-Idf*-Primer, die für beide *C2-Idf*-Klone spezifisch sind; rot: spezifische Primer für *C2-Idf*-Klon 55 und das Retrotransposon; blau: spezifische Primer für *C2-Idf*-Klon Qb.

Zur Aufklärung der bislang unbekanntem Sequenzbereiche des Klons 55 des *C2-Idf*-Allels wurden PCR-Experimente mit *C2-Idf*-, *C2*- und *PREM*-spezifischen Primern mit der genomischen DNA der *C2-Idf*-Linie durchgeführt (2.13.1). Es wurden verschiedene Primer-Kombinationen bei diesen PCR-Analysen eingesetzt (Abb. 3.2.3.-1).

Als 5'-Primer dienten: JK5`C2-41 und JK5`C2-38, mit Positionen am Beginn und am Ende des ersten Exons; die für das Intron der beiden bekannten *C2-Idf*-Kopien spezifischen Primer JK5`C2-Idf-27 (am Anfang der Insertion) und JK5`C2-Idf-36 (am Ende der Insertion); der *C2-Idf*-(Klon 55)-spezifische Primer JK5`C2-Idf-26, und die *PREM*-spezifischen Primer JK5`PREM-44 und JK5`PREM-42 aus der 3'-LTR und der *Pol*-Region des Retroelementes.

Als 3'-Primer dienten die *C2*-spezifischen Primer aus dem Exon 2 JK3`C2-24 und JK3`C2-25.

Die PCR-Proben der verschiedenen Primerkombinationen wurden in einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt (2.8), auf eine Membran übertragen (2.9) und mit der radioaktiv markierten *C2*-cDNA-Sonde (2.15.2) hybridisiert (2.11; 2.12). Leider konnten aus diesen PCR-Experimenten keine *C2-Idf*-spezifischen Produkte kloniert werden, da keine der zunächst im Gel sichtbaren DNA-Fragmente mit der verwendeten Sonde hybridisierte. Die Ursachen für Probleme bei der PCR-Amplifikation könnten sowohl repetitive Sequenzen in der zu amplifizierenden DNA als auch die Länge der *PREM*-Insertion sein, da die Länge pflanzlicher Retroelemente zwischen einigen hundert Basenpaaren und bis zu 10 kb variieren kann.

Um die zweite Frage klären zu können, ob der Klon *Qb* des *C2-Idf*-Allels ein zweites Exon enthält und wie lang die Intron-Sequenz ist, wurde die PCR-Analyse mit den *C2*-, *C2-Idf*- und *C2-Idf-Qb*-spezifischen Primern durchgeführt (Abb. 3.2.3-1). Als 5'-Primer wurden die am Beginn und Ende des Introns liegenden *C2-Idf*-spezifischen Primer JK5`*C2-Idf*-27 und JK5`*C2-Idf*-36 und der *C2-Idf-Qb*-spezifische Primer JK5`*C2-Idf*-28 eingesetzt. Diese wurden mit den *C2*-3'-Primern JK3`*C2*-17, JK3`*C2*-24, JK3`*C2*-25 und JK3`*C2*-35 kombiniert (2.13.1).

Die erhaltenen PCR-Amplifikate wurden in einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt (2.8) und die auf eine Membran übertragene DNA (2.9) mit der radioaktiv markierten *C2*-cDNA und der *C2*-Intron Sonde hybridisiert (2.11; 2.12).

Nur bei einem PCR-Ansatz mit den Primern JK5`*C2-Idf*-27 und JK3`*C2*-35 hybridisierte ein 1,5 kb Fragment mit der *C2*-spezifischen Intron-Sonde (Daten nicht gezeigt). Da die Primer JK5`*C2-Idf*-27 und JK3`*C2*-35 auch an der Sequenz des Klons 55 binden, könnte ein Amplifikat der gleichen Länge von jeder der drei *C2-Idf*-Genkopien stammen (Abb. 3.2.3-1).

Der bislang bekannte Klon *Qb* endet im Intron, 275 Basen vor Beginn des möglichen zweiten Exons und somit ist es nicht bekannt, ob noch weitere Veränderungen im Intron vorliegen. Aufgrund der PCR-Ergebnisse mit den Primern JK5`*C2-Idf*-27 und JK3`*C2*-35 war zu vermuten, dass in der *C2-Idf*-Genkopie *Qb* ein komplettes, 1,7 kb langes Intron vorliegen könnte. Um diese Vermutung zu bestätigen, wurde mit den *C2*-spezifischen Primern (JK5`*C2*-38/JK3`*C2*-35), das vollständige Intron aus dem *C2-Idf*-Allel amplifiziert (Abb. 3.2.3-2, A).

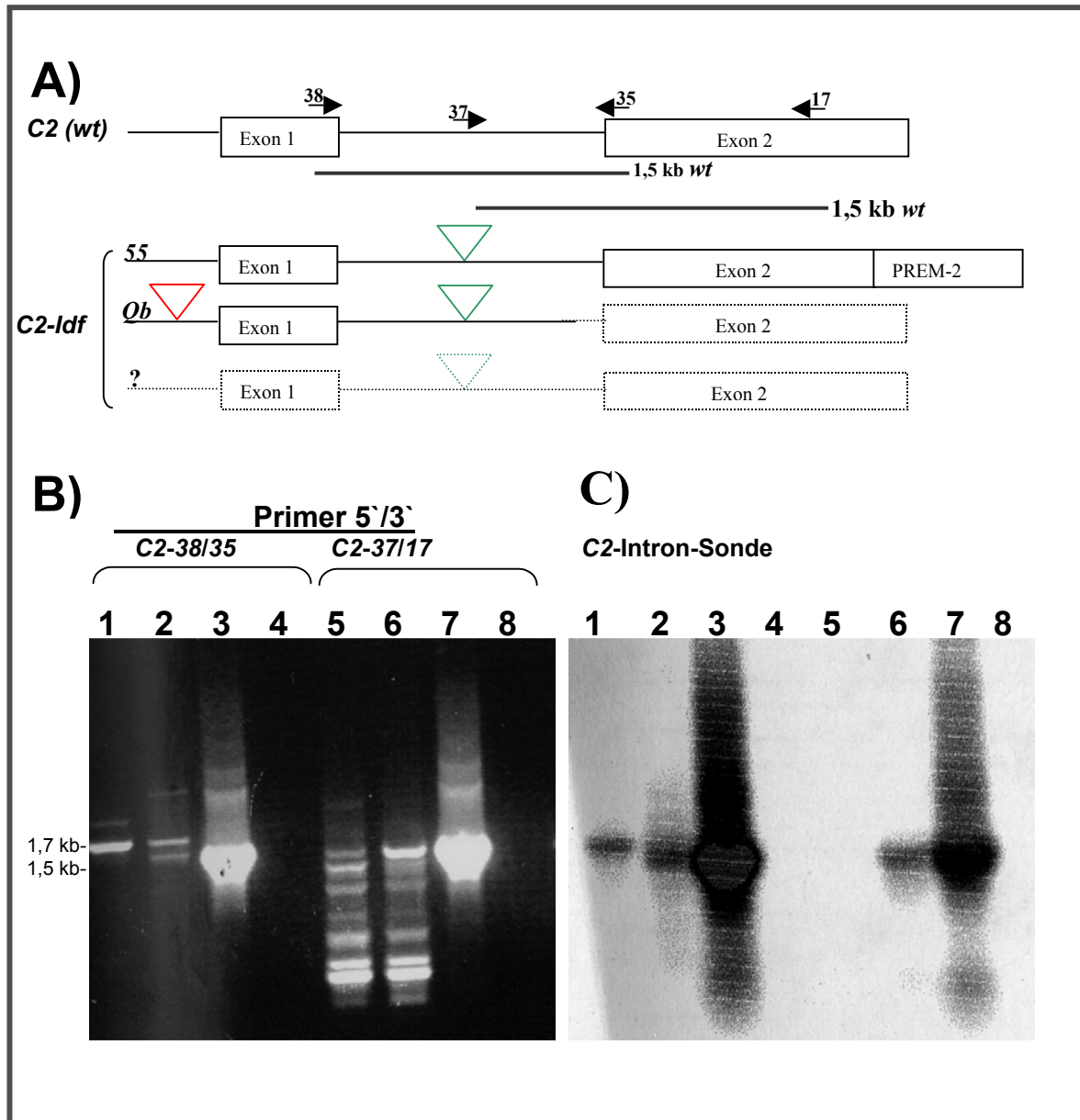


Abb. 3.2.3-2: Amplifikation von der genomischen *C2-Idf*- und Wildtyp-DNA mit *C2*-Intron- und Exon-2-spezifischen Primern. A) Schematische Darstellung des *C2*-Gens und der *C2-Idf*-Genkopien (als Balken sind die klonierten Genbereiche und punktiert die vermuteten Strukturen gezeigt). Pfeile bezeichnen die Position der *C2*-spezifischen Primer, die bei den PCRs verwendet wurden. B) 1%iges Agarosegel mit den erhaltenen PCR-Amplifikaten: in den Spuren 1-4 sind PCR-Proben aufgetragen, die mit den Primern 38/35 erhalten wurden. Als Ausgangsmaterial für die PCR dienten: 1: *C2-Idf*-gDNA; 2: *wt*-gDNA; 3: Plasmid (p 108, *C2*-Gen, Wildtyp); 4: Wasserkontrolle. In den Spuren 5-8 sind PCR-Proben aufgetragen, die mit den Primern 37/17 erhalten wurden. Als Ausgangsmaterial für die PCR dienten: 5: *C2-Idf*-gDNA; 6: *wt*-gDNA; 7: Plasmid (p 108, *C2*-Gen, Wildtyp); 8: Wasserkontrolle. C) zeigt die Hybridisierung der auf eine Membran übertragenden Amplifikate mit der radioaktiv markierten *C2*-Intron-Sonde.

Abbildung 3.2.3-2, B zeigt die in einem Agarosegel aufgetrennten Amplifikate. Die Hybridisierung mit einer Sonde aus dem C2-Intron-Fragment ist in der Abbildung 3.2.3-2, C dargestellt. Mit genomischer *C2-Idf*-DNA wird nach der PCR nur eine 1,7 kb Bande detektiert (Spur 1). Das Intron des C2-Gens aus dem Wildtyp (*LC*) ist aufgrund der fehlenden Insertion nur 1,5 kb groß (Spur 2). In der Spur 3, in der als positive Kontrolle Plasmid DNA mit dem C2-Wildtypgen (p 108-C2-Gen, Wildtyp) verwendet wurde, hybridisiert ebenfalls eine Bande bei 1,5 kb.

Eine einzige 1,7 kb Bande bei der *C2-Idf*-Linie konnte darauf hindeuten, dass alle drei *C2-Idf*-Genkopien eine Insertion im Intron besitzen. Diese Hypothese wurde mit dem Primerpaar JK5`C2-37/JK3`C2-17 überprüft: Der Primer JK5`C2-37 ist spezifisch für das Wildtypgen und ist nicht in der Lage an die *C2-Idf*-Genkopien zu binden, weil genau an dieser Stelle die Insertion im Intron dieser Gene vorliegt (Abb. 3.2.3-2, A). Die Primersequenz JK3`C2-17 befindet sich im zweiten Exon. Mit dieser Primerkombination konnte nur aus der Wildtyplinie und nicht aus der *C2-Idf*-Linie ein hybridisierendes Amplifikat erhalten werden (Abb. 3.2.3-2, C, Spur 5). Damit wird das vorherige Ergebnis unterstützt, dass in dem *C2-Idf*-Allel kein Wildtyp-ähnliches Intron vorhanden ist und deshalb in allen *C2*-Genkopien des *C2-Idf*-Allels eine Insertion im Intron vorhanden ist. Die erhaltenen Amplifikate sind im Vergleich mit der Länge der entsprechenden Sequenzen des *C2-wt*-Gens in Tabelle 3.2.3-1 zusammengefasst.

Die Primersequenz JK3`C2-17 befindet sich im zweiten Exon der *C2-Idf* Kopie 55 vor der Insertion des Retroelementes. Die Fragen zur Struktur und zum Vorhandensein des zweiten Exons in der *Qb*-Genkopie und in der dritten *C2*-Genkopie des *C2-Idf*-Allels konnten deshalb durch die bisherigen PCR-Experimente mit den Primerkombinationen *C2-Idf*-35/17 und *C2-Idf*-04/17 nicht endgültig geklärt werden, da mit diesen Primern auch von der *C2-Idf*-Kopie des Klons 55 Amplifikate erhalten werden können (Abb. 3.2.3-2, A).

Aus diesem Grund wurde versucht, mit unterschiedlichen Primern aus dem hinteren Bereich des Exons 2 Amplifikate aus der genomischen DNA der *C2-Idf*-Linie zu erhalten. Aufgrund der langen *PREM-2*-Insertion können mit diesen Primern keine Amplifikate von der Genkopie 55 erhalten werden.

Dabei konnten insgesamt drei PCR-Fragmente aus bislang unbekanntem Bereichen des Exons 2 amplifiziert werden (siehe Tabelle 3.2.3-1, rote Sternchen).

Primer JK5`/3`	C2-DNA (wt)	C2-Idf-gDNA
41 / 25	3,0	-
38 / 35	1,5	1,7
37 / 17	1,5	-
38 / 24	2,6	-
38 / 25	2,7	-
27 / 35	-	1,5
04 / 17	0,85	0,85
04 / 24	1,0	1,0*
04 / 25	1,177	1,156*
23 / 25	0,177	0,156*

Tabelle 3.2.3-1: Ergebnisse der PCR-Analysen mit genomischer C2-Idf- und Lc-DNA. In der ersten Spalte dieser Tabelle sind die für die Amplifikation von der genomischen *wt*- und *C2-Idf*-DNA verwendeten Primerpaare dargestellt. Die Position der bei diesen Analysen verwendeten Primer ist in der Abb. 3.2.3-1 dargestellt. Die zweite Spalte zeigt die Länge eines PCR-Produktes, das mit Wildtyp (*Lc*) DNA amplifiziert wurde. In der dritten Spalte sind die Längen der PCR-Amplifikate dargestellt, die mit genomischer *C2-Idf*-DNA erhalten wurden. Klonierte und sequenzierte Amplifikate sind mit (*) gekennzeichnet.

Das mit den Primern JK5`C2-04 und JK3`C2-25 erhaltene Amplifikat repräsentiert die vollständige Sequenz des Exons 2.

Die in der Tabelle 3.2.3-1 mit den roten Sternchen bezeichneten Amplifikate wurden in Agarosegelen aufgetrennt, aus dem Gel isoliert (2.6.4) und in den pCR[®] 2.1 TOPO[®] Klonierungsvektor (Invitrogen) ligiert (2.16.1). Positive Klone, die ein Insert der erwarteten Größe besaßen, wurden von beiden Seiten sequenziert (2.19).

Die Ergebnisse der Sequenzierung der *C2-Idf*-Klone sind schematisch in der Abbildung 3.2.3-3 dargestellt. Die Bezeichnung der *C2-Idf*-Klone bezieht sich auf die für die Amplifikation verwendeten Primer (Abb. 3.2.3-3, A): Klon *C2-Idf* 23/25 (156 Basen); Klon *C2-Idf* 04/24 (998 Basen) und Klon *C2-Idf* 04/25 (1,156 kb).

Die Sequenzanalyse der *C2-Idf*-Amplifikate ergab, dass die aus unabhängigen PCR-Ansätzen hervorgegangenen *C2-Idf*-Klone identisch sind und einige Sequenzänderungen gegenüber dem Wildtyp aufweisen:

- am Beginn des zweiten Exons befinden sich, wie in der Sequenz der *C2-Idf*-Kopie 55, zwei Basenaustausche (Abbildung 3.2.3-3, B; blaue Sternchen);
- die übrige Sequenz des zweiten Exons ist bis zum Stoppkodon zu 100% mit der Wildtypsequenz identisch;
- im 3'-untranslatierten Bereich sind verglichen mit der Wildtypsequenz zwei Deletionen von 21 bzw. 3 Basenpaaren und eine Sequenzduplikation (AAT) vorhanden (Abb.3.2.3-3, C).

Da mit den Primern JK5`*C2-04* und JK3`*C2-25* ein vollständiges Exon 2 aus genomischer DNA des *C2-Idf*-Allels amplifiziert werden konnte (Abb. 3.2.3-3), muss im *C2-Idf*-Allel zumindest eine der Genkopien ein vollständiges Exon 2 besitzen. Da dies nicht die 55-Kopie sein kann, wurden im weiteren Verlauf Untersuchungen durchgeführt, um herauszufinden, welche der zwei übrigen *C2-Idf*-Genkopien das komplette Exon 2 enthält, oder ob dieser Sequenzbereich in beiden Kopien enthalten ist.

Die Southern-Hybridisierung der mit *SpeI* gespaltenen genomischen *C2-Idf*-DNA mit einem *C2*-Intron-Fragment als Sonde (Abb. 3.2.3-3, A) zeigt drei Banden, die den drei *C2-Idf*-Genkopien entsprechen. Die 5,1 kb Bande ist Teil der *C2-Idf*-Genkopie, die durch den Klon 55 repräsentiert wird. Im Klon 55 sind aufgrund der *PREM*-Insertion zwei *SpeI*-Schnittstellen enthalten (Abb. 3.2.3-3, A, unten).

Die DNA-Fragmente mit den zwei anderen *C2-Idf*-Genkopien, der *Qb*-Kopie und der bislang unbekanntem *C2-Idf*-Sequenz, sind bei der Restriktion mit diesem Enzym weit voneinander getrennt. Somit ist es möglich, anhand einer PCR-Analyse mit diesen Fragmenten und *C2*-Primern für das Exon 2 nachzuweisen, ob dieses Exon in beiden Kopien vollständig enthalten ist.

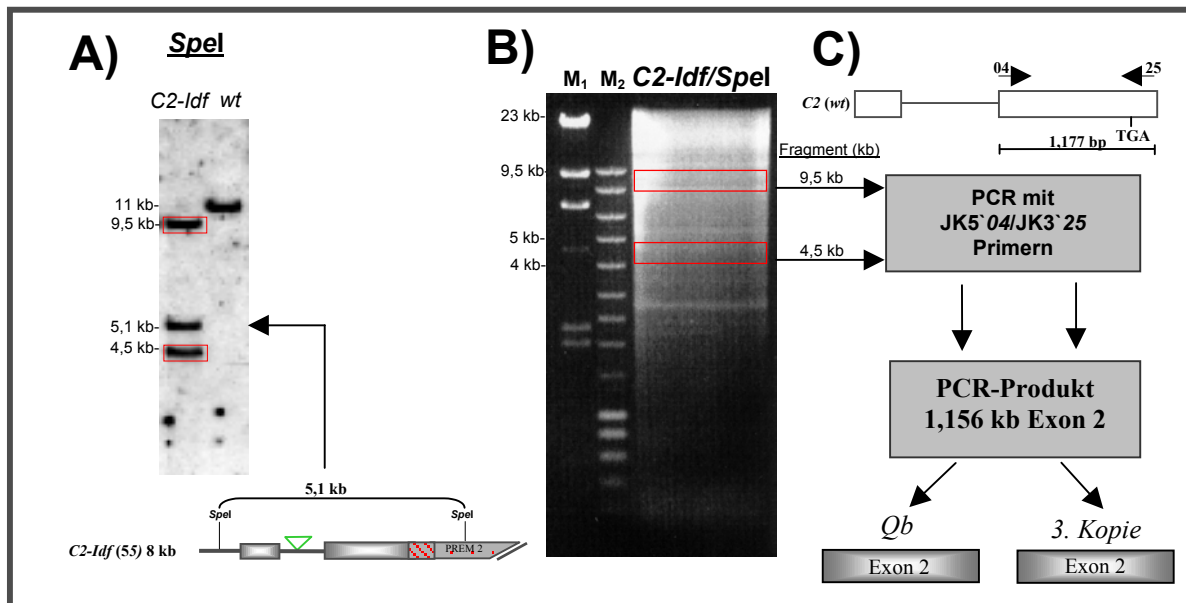


Abb. 3.2.3-4: Nachweis der Exon-2-Sequenz in *C2-Idf*-Genkopien. **A)** Southern-Blot-Analyse der genomischen *C2-Idf*- und Wildtyp-DNA mit dem *C2*-Intron-Fragment als Sonde (Autoradiogramm übernommen von Borchert, 1998). **B)** Die genomische *C2-Idf*-DNA wurde mit *SpeI* vollständig gespalten und in einem 0,6%igen Agarosegel aufgetrennt. **C)** Die durch rote Kästchen in B) gekennzeichneten DNA Bereiche wurden aus dem Gel ausgeschnitten und die darin enthaltene gDNA für die PCR mit den Exon 2-spezifischen Primern JK5`*C2-04* und JK3`*C2-25* verwendet. **M₁** = DNA molekular weight marker II, (Roche); **M₂** = Smartladder (Eurogentec).

Die genomische *C2-Idf*-DNA wurde mit der Restriktionsendonuklease *SpeI* gespalten und in einem 0,6%igen Agarosegel aufgetrennt (Abb. 3.2.3-4, B). Die Gelbereiche der DNA-Fragmente mit Längen von 9,5 und 4,5 kb wurden ausgeschnitten und die aus dem Gel eluierten gDNA-Fragmente wurden für PCR-Amplifikationen mit den *C2*-Primern JK5`*C2-04* und JK3`*C2-25* (Abb. 3.2.3-4, C) verwendet (2.13.1). Von beiden Fragmenten konnte das vollständige Exon 2 amplifiziert werden (Daten nicht gezeigt). Damit wurden Hinweise auf eine vollständige Exon 2 Sequenz sowohl in der *C2*-Genkopie *Qb* als auch in der dritten unbekanntem *C2*-Genkopie gefunden. Eine direkte Klonierung des 4,5 kb Fragmentes war nicht erfolgreich.

Die Ergebnisse von PCR-Analysen der *C2-Idf*-Mutante auf genomischer Ebene lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- Mit den Primern JK5`C2-38 und JK3`C2-35 wird das vollständige 1,5 kb Intron des Wildtyps amplifiziert (Abb. 3.2.3-2, A, B und C, Spur 2 und 3). Mit dem selben Primerpaar wird von der *C2-Idf* genomischen DNA ein PCR-Produkt amplifiziert, das eine Länge von 1,7 kb besitzt. Die zusätzlichen 239 bp sind auf die Insertion im Intron zurückzuführen (Abb. 3.2.3-2, B und C, Spur 1). Demzufolge scheint keine der drei Kopien des *C2*-Gens im *C2-Idf*-Allel ein Intron ohne diese Insertion zu besitzen.
- Aus den PCR-Experimenten mit den Primern für das zweite Exon (JK5`C2-04/JK3`C2-25) kann geschlossen werden (Abb. 3.2.3-4, B, C), dass in zwei *C2-Idf* Kopien, d.h. in der Kopie *Qb* und in der dritten *C2*-Kopie ein vollständiges Exon 2 enthalten ist. Die im Vergleich mit der Wildtypsequenz gefundenen Sequenzunterschiede führen zu keiner Änderung der Aminosäuresequenz. Kleine Deletionen im 3`-UTR-Bereich liegen bei allen gefundenen *C2-Idf*-Klonen vor und sind offensichtlich linienspezifisch (Abb. 3.2.3-3, B, C).

Anhand der neuen Ergebnisse aus den molekularen Untersuchungen der *C2-Idf*-Mutante kann keine endgültige Aussage über die Struktur und Organisation der drei *C2-Idf*-Genkopien getroffen werden. Allerdings ist zu vermuten, dass das *C2-Idf*-Allel wie in der Abbildung 3.2.3-5 schematisch gezeigt, strukturiert ist.

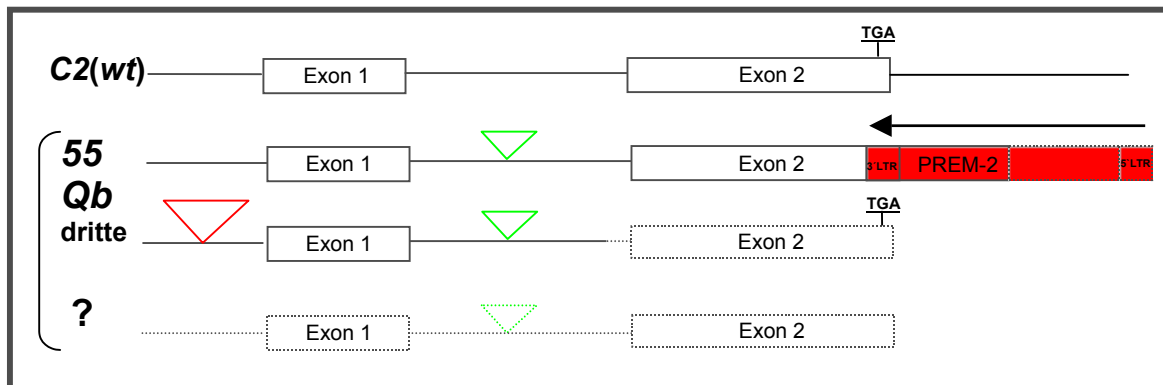


Abb. 3.2.3-5: Schematische Darstellung der vermuteten Struktur der drei genomischen *C2*-Kopien im *C2-Idf*-Allel. Als Balken sind die bekannten Genbereiche dargestellt. Gepunktet ist die aufgrund der in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Analysen vermutete Genstruktur dargestellt. Der Pfeil zeigt die Orientierung des Retroelementes im Klon 55.

Aufgrund der postulierten Struktur der drei genomischen *C2-Idf*-Kopien im *C2-Idf*-Allel ist es denkbar, dass aufgrund Promotorsequenzen von der dritten *C2-Idf*-Kopie und auch von der *C2-Idf*-Kopie 55 *C2*-spezifische Transkripte gemacht werden könnten. Diese waren bei der Kopie 55 aufgrund der *PREM*-Insertion vermutlich nicht funktionell. Da im Promotor der *C2-Idf*-Kopie *Qb* eine *CACTA*-Insertion vorliegt, konnte diese die Expression dieser Kopie negativ beeinflussen. Jedoch ist es nicht auszuschließen, dass auch von dieser *C2-Idf*-Kopie *C2*-spezifische Transkripte gemacht werden könnten. Wie bereits erwähnt (1.1.2), liegen außerdem im Promotor- und 5'UTR-Bereich der beiden *C2-Idf*-Kopien (55 und *Qb*) gegenüber der *C2*-Wildtypsequenz Sequenzänderungen vor, welche für die geringe *C2*-Transkriptmenge in dieser Linie verantwortlich sein könnten.

Um zu untersuchen, ob die Promotoren der beiden *C2-Idf*-Kopien funktionell sind und ob die Sequenzunterschiede im Promotor und 5'UTR-Bereich der *C2-Idf*-Kopien zu einer veränderten Expression führen, sollten die vergleichende Promotor-Reporter-Gen-Analysen durchgeführt werden. Diese werden zu einem späteren Zeitpunkt besprochen (3.5.2).

3.3 Molekulare Analyse des *Whp*-Gens aus den Mais-Genotypen *C1^S* und *inc2Whp*

Die *C1^S*-Mutante weist die intensivste Anthocyanfärbung sowohl des Maiskorns, als auch der anderen Pflanzengewebe auf. In dieser Linie wird ein Regulatorgen, *C1*, verstärkt exprimiert. Das *C1^S*-Allel ist dominant über das *C1*-Allel des Wildtyps (Scheffler *et al.*, 1993). Bei der Expressionsanalyse der Anthocyanogene im Aleuron mittels RT-PCR wurde eine außergewöhnlich starke Transkriptionsaktivität des *Whp*-Gens in diesem Genotyp beobachtet, während die *Whp*-Genexpression in den anderen Linien relativ gleich ist (3.1).

Um die Ursache dieser gesteigerten Transkriptionsaktivität zu untersuchen, sollte zunächst die *Whp*-cDNA aus der *C1^S*-Linie mit einer *Whp*-cDNA-Sequenz aus einer Linie mit normaler *Whp*-Expression verglichen werden. Da im Mais zwei Chalkonsynthasegene vorliegen, *C2* (*colored 2*, Wienand *et al.*, 1986) und *Whp* (*white pollen*, Franken *et al.*, 1991) und im Wildtyp die Transkriptionsaktivität des *Whp*-Gens wesentlich geringer als die Expression des *C2*-Gens ist (Abb. 3.1-2), waren bisherige Versuche zur Klonierung einer *Whp*-Wildtyp-cDNA erfolglos (Franken, Rojek, unveröffentlicht). Aus diesem Grund waren zu Beginn der vorliegenden Arbeit auch keine Informationen über eine funktionelle *Whp*-cDNA des Wildtyps vorhanden.

In der *C1^S*-Mutante ist die Expression der beiden Chalkonsynthasegene verhältnismäßig gleich. Die Klonierung einer *Whp*-cDNA ist, auch unter Berücksichtigung der bei vorherigen Klonierungsexperimenten entstandenen Schwierigkeiten, daher aus dieser Linie nur schwer möglich. Deshalb wurde zunächst eine *Whp*-cDNA aus einem Genotyp kloniert, in dem nur das *Whp*-Gen funktionell ist. In dem Genotyp *c2inWhp* wird die Funktion eines defekten *C2*-Gens durch das *Whp*-Gen komplementiert und die Anthocyanfärbung des Aleurons ist allein auf die Aktivität des *Whp*-Gens zurückzuführen (Coe und Neuffer, 1977). Dementsprechend ist dieser Genotyp als Ausgangsmaterial zur Klonierung einer funktionellen Wildtyp-*Whp*-cDNA gut geeignet.

3.3.1 Isolierung und Charakterisierung von cDNAs des *Whp*-Gens

Zur Isolierung einer *Whp*-cDNA aus der Linie *c2inWhp* (Ac 92-18, GHN 198) wurde zunächst die Gesamt-RNA aus Maiskörnern (28 DAP) präpariert (2.7.1). Die aus der Gesamt-RNA isolierte mRNA (2.7.2) wurde mit Oligo-dT Primern mittels reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Die cDNA wurde dann für eine Amplifikation mit den *Whp*-spezifischen Primern JK5'-*Whp*-22 und JK3'-*Whp*-19 (Abb. 3.3.1-1, C) eingesetzt. Mit diesen Primern konnte ein Amplifikat der erwarteten Länge (Abb. 3.3.1-1, A) erhalten werden, das mit einer radioaktiv markierten C2-cDNA Sonde (3.15.2) aufgrund der hohen Homologie der beiden Gene zueinander hybridisierte (Abb. 3.3.1-1, B).

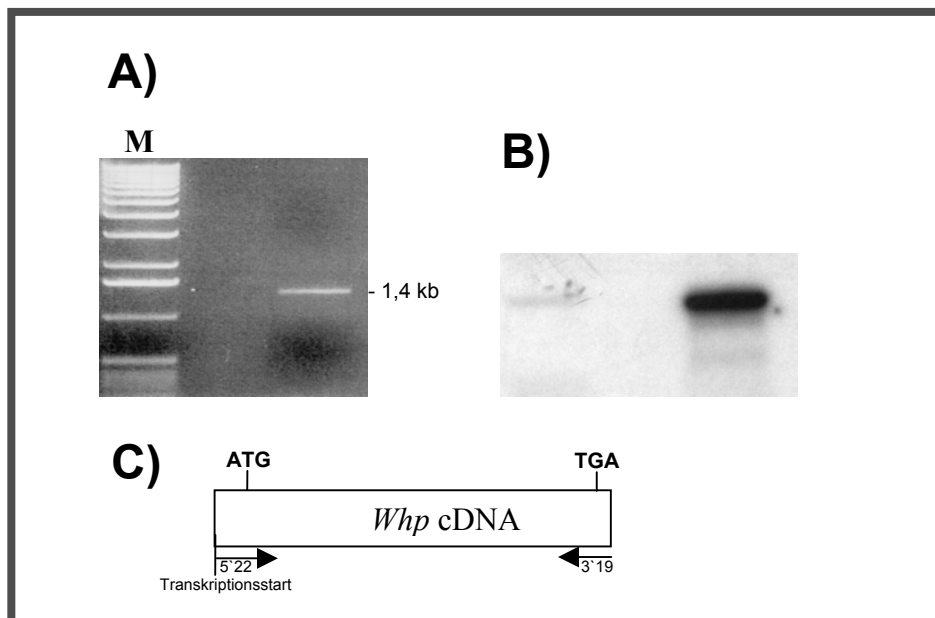


Abb. 3.3.1-1: Amplifikation der *Whp*-cDNA mittels RT-PCR mit *Whp*-spezifischen Primern aus dem *c2inWhp*-Genotyp. A) In einem mit Ethidiumbromid versetzten 1%igen Agarosegel wurde das mit den Primern JK5'-*Whp*-22 und JK3'-*Whp*-19 synthetisierte PCR-Produkt aufgetrennt. Ein Amplifikat in der erwarteten Länge von 1,4 kb ist sichtbar. M = 1 kb Ladder (Boehringer Mannheim). B) Autoradiogramm nach der Hybridisierung des Amplifikates mit der radioaktiv markierten C2-cDNA-Sonde. C) Schematische Darstellung der Position und Bezeichnungen der für die Amplifikation verwendeten Primer.

Das Amplifikat wurde aus dem Gel isoliert (2.6.4) und in das pCR[®] 2.1 TOPO[®] Plasmid (Invitrogen) kloniert (2.16.1). Die Transformanten wurden ausplattiert und

positive Klone durch Koloniehybridisierung (2.10) mit einer radioaktiv markierten C2-cDNA Sonde identifiziert (Abb. 3.3.1-2, A).

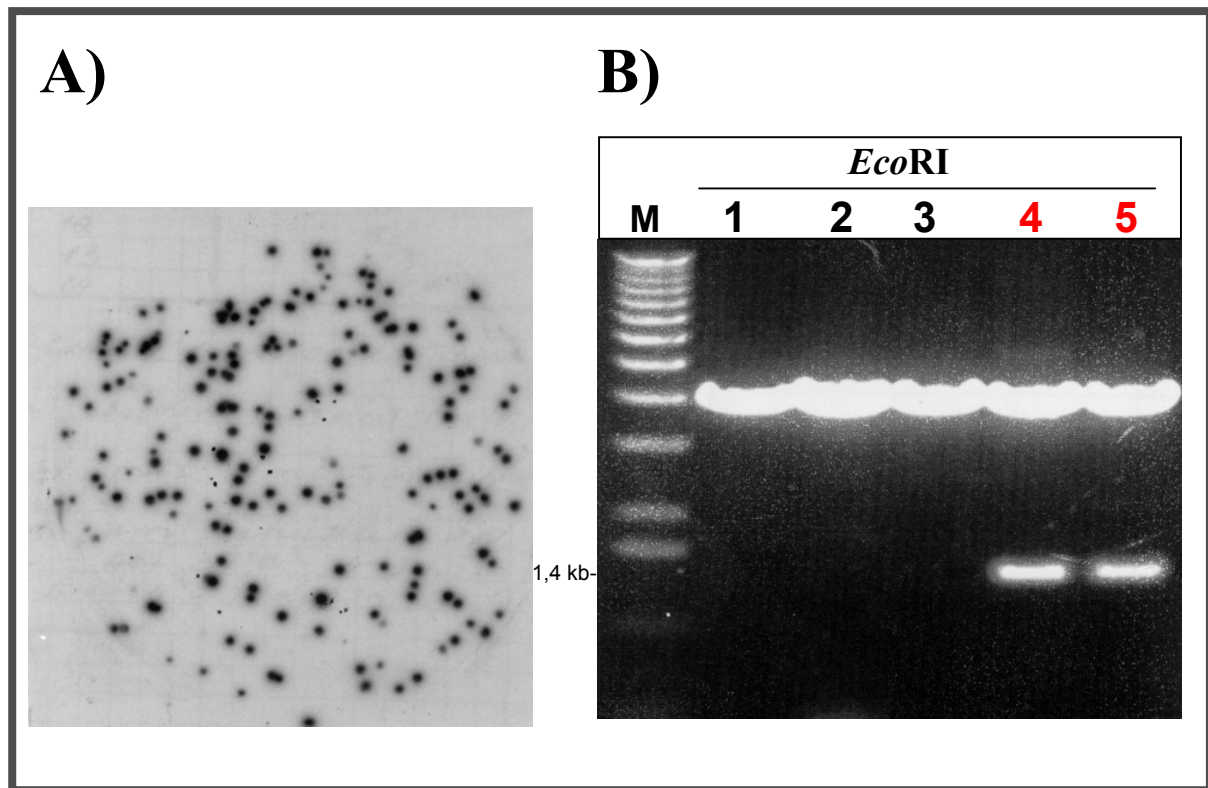


Abb. 3.3.1-2: Analyse der erhaltenen Klone nach Ligation des *Whp*-cDNA-Fragments aus der Mais-Linie *inc2Whp* (Ac 92-18) in das Plasmid pCR[®] 2.1 TOPO[®]. A) Autoradiogramm nach der Hybridisierung eines Filterabzuges der erhaltenen Klone mit einer radioaktiv markierten C2-cDNA-Sonde. B) Von fünf ausgewählten Kolonien wurde die Plasmid-DNA isoliert, mit *EcoRI* gespalten und in einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt. Zwei der fünf Klone besitzen ein Insert der erwarteten Länge (1,4 kb). M = 1 kb Ladder (Boehringer Mannheim).

Aus fünf Klonen, die mit der C2-cDNA Sonde hybridisierten, wurde die Plasmid-DNA isoliert (2.6.3.2) und mit Hilfe der Restriktionsendonuklease *EcoRI* geschnitten. Zwei der analysierten Klone enthielten ein Insert der erwarteten Länge von 1,4 kb (Abb. 3.3.1-2, B).

Die beiden positiven *Whp*-cDNA Klone wurden im Detail durch Restriktion mit den Endonukleasen *SstI* und *Apal*, die in der Sequenz des *Whp*-Gens enthalten sind (Franken *et al.*, 1991), und mit der im Plasmid schneidenden Endonuklease *XbaI* analysiert (Abb. 3.3.1-3, A-B).

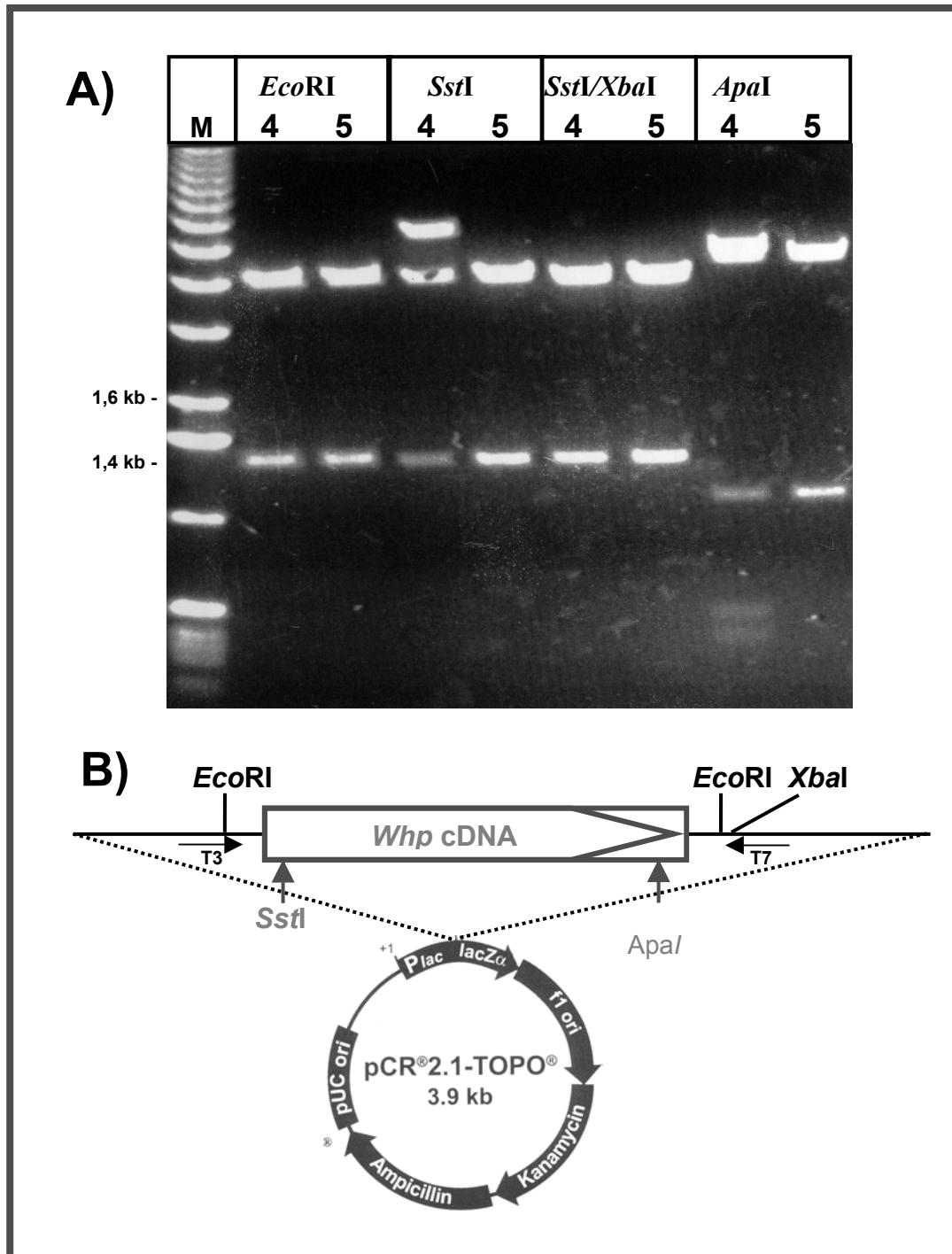


Abb. 3.3.1-3: Restriktionsanalyse der *Whp*-cDNA Klone aus der Mais-Linie *inc2Whp*. **A)** Aus den *Whp*-cDNA Klone 4 und 5 wurde die Plasmid-DNA isoliert, mit *EcoRI*, *SstI*, *SstI/XbaI* und *ApaI* gespalten und in einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt. **M** = 1 kb Ladder (Boehringer Mannheim). **B)** Schematische Darstellung der *Whp*-cDNA in dem pCR[®] 2.1-TOPO[®] Klonierungsvektor. Die Positionen der verwendeten Restriktionsendonukleasen sind angegeben.

Da bei der Restriktionsanalyse des Klons 4 mit *Apal* zusätzlich zu dem Insert mit der richtigen Größe noch zwei weitere Banden (0,45 und 0,5 kb) auftraten, wurde dieser Klon nicht weiter analysiert. Um durch die Amplifikation entstandene Sequenzveränderungen auszuschließen, wurden im weiteren Verlauf der Untersuchungen drei weitere positive Klone in die Analyse mit einbezogen (Daten nicht gezeigt). Alle vier *Whp*-cDNA Klone wurden anschließend aus beiden Richtungen mit Hilfe der Primer T3, T7, JK5`*Whp*-22, JK5`*Whp*-18 und JK3`*Whp*-19 sequenziert (3.19). Damit wurde die Grundlage für einen Vergleich mit der *Whp*-cDNA aus der Linie *C1^S* geschaffen.

Nach der erfolgreichen Isolierung der *Whp*-cDNA aus der Linie *inc2Whp*, wurde mit der Isolierung einer *Whp*-cDNA aus dem Genotyp *C1^S* begonnen. Aus Maiskörnern (30 DAP) der Linie *C1^S* (AC 578, GHN 1621) wurde die Gesamt-RNA isoliert (2.7.1) und mit Oligo-dT Primern mittels reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben (2.14.1). Die cDNA wurde für eine Amplifikation mit den *Whp*-spezifischen Primern JK5`*Whp*-22 und JK3`-*Whp*-19 (Abb. 3.3.1-1, C) wie zuvor eingesetzt. Die aus der PCR erhaltenen Amplifikate in der erwarteten Länge wurden nach Auftrennung in einem Gel aus diesem isoliert (2.6.4) und in den pCR[®] 2.1 TOPO[®] Vektor kloniert (2.16.1). Die Transformanden wurden angezogen und einige Bakterien-Kolonien mittels Kolonie-PCR (2.13.2) mit den Primern JK5`*Whp*-22/JK3`-*Whp*-19 analysiert. Aus drei positiven Klonen wurde Plasmid-DNA isoliert (2.6.3.2), mit Hilfe der Restriktionsendonuklease *EcoRI* geschnitten in einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt (2.8). Alle analysierten Klone enthielten ein Insert in der erwarteten Länge von 1,4 kb (Abb. 3.3.1-4). Diese drei *Whp*-cDNA Klone wurden anschließend aus beiden Richtungen mit Hilfe der Primer T3, T7, JK5`*Whp*-22, JK5`*Whp*-18 und JK3`*Whp*-19 sequenziert (3.19).

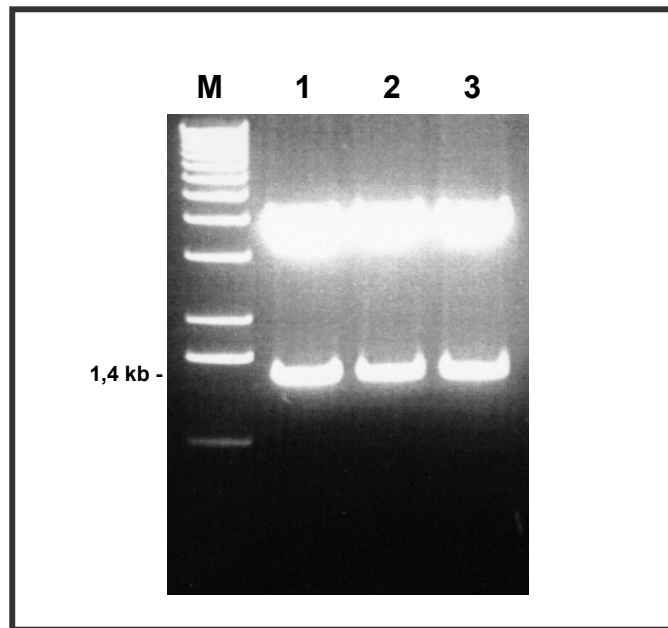


Abb. 3.3.1-4: Restriktionsanalyse der *Whp*-cDNA Klone aus dem Genotyp $C1^S$. Das von der cDNA des Genotypes $C1^S$ mit den Primern JK5'-*Whp*-22 und JK3'-*Whp*-19 erhaltene Amplifikat (1,4 kb) wurde in den pCR® 2.1-TOPO® Vektor ligiert. Die erhaltenen Transformanten wurden mittels Kolonie-PCR mit den Primern JK5'-*Whp*-22/JK3'-*Whp*-19 auf Inserts überprüft. Von drei positiven Klonen wurde die Plasmid-DNA isoliert, mit *Eco*RI gespalten und in einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt (Klone 1, 2 und 3). M = 1 kb Ladder (Boehringer Mannheim).

Ein Sequenzvergleich zwischen den in dieser Arbeit isolierten *Whp*-cDNAs aus den Linien *inc2Whp* und $C1^S$ mit der Sequenz des von Franken *et al.* (1991) aus der Linie *InC2Whp* klonierten *Whp*-Gens (nachfolgend als *Whp* Wildtyp-Gen bezeichnet) zeigt deutliche Unterschiede.

Im 5'-UTR-Bereich der *Whp*-cDNA der Linie $C1^S$ wurden folgende Sequenzunterschiede gefunden (Abbildung 3.3.1-5): zwei Insertionen in der Länge von 32 bzw. 7 Basen; ein Nukleotid Austausch (G); eine Basendeletion (C) und eine Baseninsertion (C).

Erstaunlicherweise wurden weitere, vermutlich linienspezifische, Sequenzabweichungen in den kodierenden Regionen der beiden *Whp*-cDNA-Klone gegenüber der genomischen *Whp*-Sequenz des Wildtyps festgestellt. Diese Unterschiede treten jedoch nicht über die gesamte kodierende Region, sondern besonders im mittleren Bereich des zweiten Exons auf. In anderen Abschnitten, d.h. über 45 Basenpaare hinter dem Startkodon und über 120 Basenpaare am Ende des

zweiten Exons bis zum Stoppkodon ist die Sequenz der beiden *Whp*-cDNAs mit dem *Whp*-Gen identisch (Abbildung 3.3.1-5).

Bei dem Sequenzvergleich der beiden *Whp*-cDNAs mit der C2-cDNA des Wildtyps wurde festgestellt, dass einige der gefundenen Sequenzabweichungen im kodierenden Bereich der *Whp*-cDNAs mit der Sequenz der C2-cDNA übereinstimmen (Abbildung 3.3.1-5). Der mittlere Bereich des zweiten Exons der *Whp*-cDNAs aus den Linien *C1^S* und *inc2Whp* sieht deshalb wie eine chimere Sequenz zwischen den zwei bislang bekannten Chalkonsynthasegenen *Whp* und C2 aus.

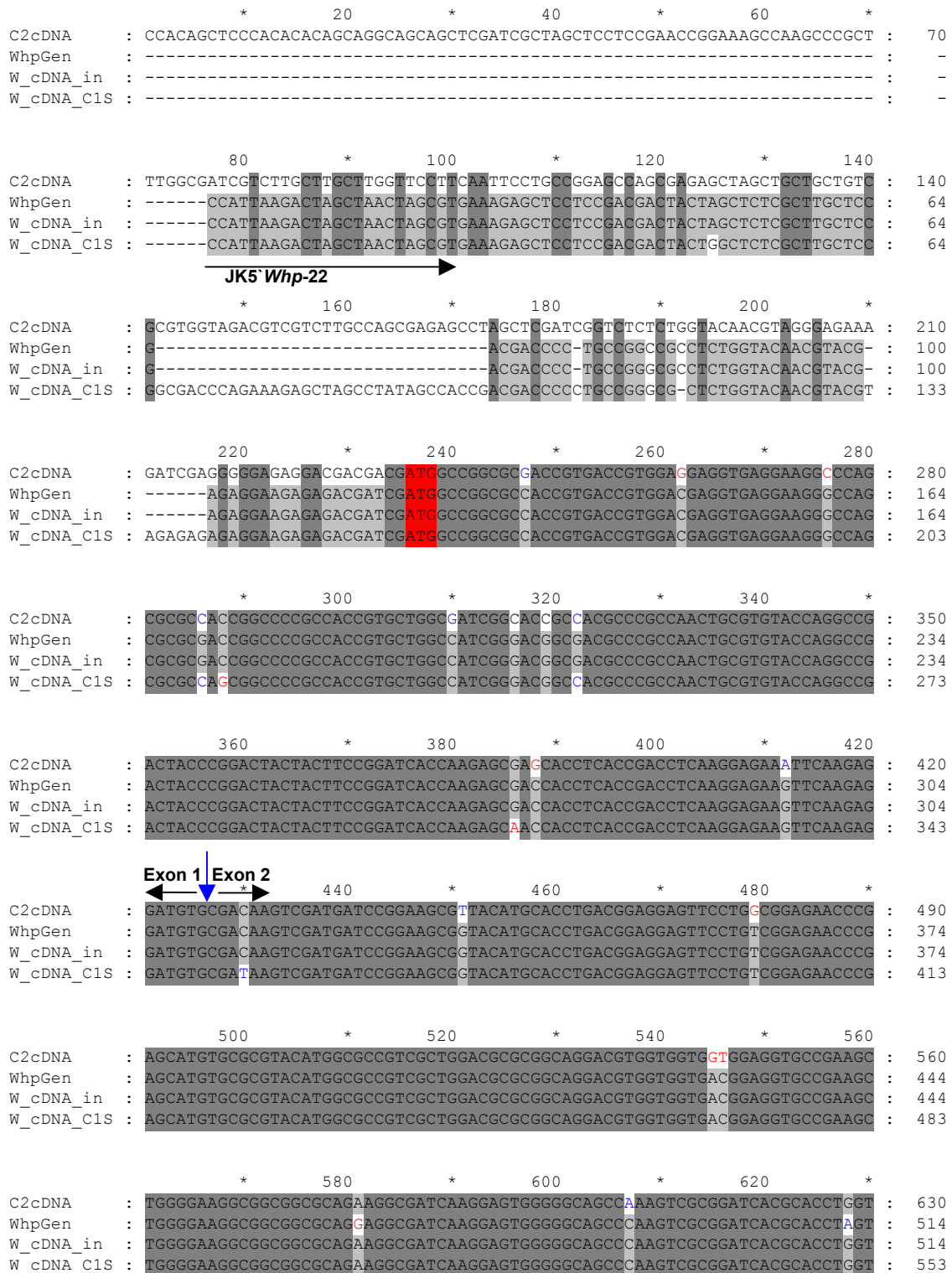
Eine größere Abweichung der beiden *Whp*-cDNA-Sequenzen zu dem *Whp*-Wildtyp-Gen befindet sich an der Position 700-708: dort ist eine Deletion von drei Nukleotiden, die außerdem von insgesamt drei veränderten Nukleotiden auf beiden Seiten benachbart ist. Diese Veränderung ist, bis auf ein Nukleotid, in der C2-cDNA vorhanden. Die Veränderung von acht Basen an der Position 912-920 im *Whp*-Wildtyp-Gen, die verglichen mit den zwei cDNAs zur Änderung von drei Aminosäuren führt, ist in den *Whp*-cDNA-Sequenzen nicht vorhanden. Auch an dieser Stelle weist die Sequenz der beiden *Whp*-cDNAs eine höhere Homologie mit der C2-cDNA als mit dem *Whp*-Wildtyp-Gen auf.

Die *Whp*-cDNA aus der Linie *C1^S* weist des weiteren in der kodierenden Region des Exon 1 die folgenden Sequenzunterschiede auf:

- zwei synonyme Nukleotidaustausche, die auch in der C2-cDNA vorhanden sind (286, 323).
- zwei nicht synonyme Nukleotidaustausche, die in keiner der im Vergleich dargestellten Sequenzen auftreten und jeweils zu einer veränderten Aminosäure führen (288, 386).

Die *Whp*-cDNA aus der Linie *inc2Whp* ist im Gegensatz dazu im 5'-UTR-Bereich und im ersten Exon mit dem genomischen *Whp*-Klon des Wildtyps identisch. Allerdings wurden im 3'-UTR-Bereich der *Whp*-cDNA dieser Linie

Sequenzabweichungen zu dem *Whp*-Gen des Wildtyps und zu der *Whp*-cDNA aus der Linie *C1^S* gefunden (Abbildung 3.3.1-5), die vermutlich linienspezifisch sind.



3. Ergebnisse

```

          640          *          660          *          680          *          700
C2cDNA      : GTTCTGCACCACGTCGGGGTGGACATGCCGGGCGCCGACTACCAGCTGACCAAGGCGCTGGGCCTGCGC : 700
WhpGen      : GTTCTGCACCACGTCGGGGTGGACATGCCGGGCGCCGACTACCAGCTGACCAAGGCGCTGGGCCTGCGC : 584
W_cDNA_in   : GTTCTGCACCACGTCGGGGTGGACATGCCGGGCGCCGACTACCAGCTGACCAAGGCGCTGGGCCTGCGC : 584
W_cDNA_C1S  : GTTCTGCACCACGTCGGGGTGGACATGCCGGGCGCCGACTACCAGCTGACCAAGGCGCTGGGCCTGCGC : 623

          *          720          *          740          *          760          *
C2cDNA      : CCCTCCGTGAACCGCTCATGATGTACCAGCAGGGGTGCTTCGCGGGCGGCACGGTGCTGCGCGTGGCCA : 770
WhpGen      : ---GTTCGTGAACCGCTCATGATGTACCAGCAGGGGTGCTTCGCGGGCGGCACGGTGCTGCGCGTGGCCA : 651
W_cDNA_in   : CCCTCCGTGAACCGCTCATGATGTACCAGCAGGGGTGCTTCGCGGGCGGCACGGTGCTGCGCGTGGCCA : 654
W_cDNA_C1S  : CCCTCCGTGAACCGCTCATGATGTACCAGCAGGGGTGCTTCGCGGGCGGCACGGTGCTGCGCGTGGCCA : 693

          780          *          800          *          820          *          840
C2cDNA      : AGGACCTGGCGGAGAACAACCGCGCGCGCGGGTCTGGTGGTGTGCTCCGAGATCACGGCCGTGACGTT : 840
WhpGen      : AGGACCTGGCGGAGAACAACCGCGCGCGCGGGTCTGGTGGTGTGCTCCGAGATCACGGCCGTGACGTT : 721
W_cDNA_in   : AGGACCTGGCGGAGAACAACCGCGCGCGCGGGTCTGGTGGTGTGCTCCGAGATCACGGCCGTGACGTT : 724
W_cDNA_C1S  : AGGACCTGGCGGAGAACAACCGCGCGCGCGGGTCTGGTGGTGTGCTCCGAGATCACGGCCGTGACGTT : 763

          *          860          *          880          *          900          *
C2cDNA      : CCGCGGCCTCCGAGTCGCACCTCGACTCGCTCGTGGGCAGGCGCTGTTCGGCGACGGCGCGGGCGGCC : 910
WhpGen      : CCGCGGCCTCCGAGTCGCACCTCGACTCGCTCGTGGGCAGGCGCTGTTCGGCGACGGCGCGGGCGGCC : 791
W_cDNA_in   : CCGCGGCCTCCGAGTCGCACCTCGACTCGCTCGTGGGCAGGCGCTGTTCGGCGACGGCGCGGGCGGCC : 794
W_cDNA_C1S  : CCGCGGCCTCCGAGTCGCACCTCGACTCGCTCGTGGGCAGGCGCTGTTCGGCGACGGCGCGGGCGGCC : 833

          920          *          940          *          960          *          980
C2cDNA      : GTGGTCTGGGGCCGACCCGGACGACCGCGTCGAGCGCCCGCTCTCCAGCTAGTCTCCGCGCCGACAG : 980
WhpGen      : GTGGTCTGGGGCCGACCCGGACGACCGCGTCGAGCGCCCGCTCTCCAGCTAGTCTCCGCGCCGACAG : 861
W_cDNA_in   : GTGGTCTGGGGCCGACCCGGACGACCGCGTCGAGCGCCCGCTCTCCAGCTAGTCTCCGCGCCGACAG : 864
W_cDNA_C1S  : GTGGTCTGGGGCCGACCCGGACGACCGCGTCGAGCGCCCGCTCTCCAGCTAGTCTCCGCGCCGACAG : 903

          *          1000          *          1020          *          1040          *
C2cDNA      : CCATCCTGCCGACTCGGAGGGCGCCATCGACGGCCACCTCCGCGAGGTGGGGCTGACCTTCCACCTGCT : 1050
WhpGen      : CCATCCTGCCGACTCGGAGGGCGCCATCGACGGCCACCTCCGCGAGGTGGGGCTGACCTTCCACCTGCT : 931
W_cDNA_in   : CCATCCTGCCGACTCGGAGGGCGCCATCGACGGCCACCTCCGCGAGGTGGGGCTGACCTTCCACCTGCT : 934
W_cDNA_C1S  : CCATCCTGCCGACTCGGAGGGCGCCATCGACGGCCACCTCCGCGAGGTGGGGCTGACCTTCCACCTGCT : 973

          1060          *          1080          *          1100          *          1120
C2cDNA      : CAAGGACGTGCCCTGGCTCATCTCCAAGAATCGGCGCGCGCTGGAGGACGCGTTGACAGCCGCTCGGC : 1120
WhpGen      : CAAGGACGTGCCCTGGCTCATCTCCAAGAATCGGCGCGCGCTGGAGGACGCGTTGACAGCCGCTCGGC : 1001
W_cDNA_in   : CAAGGACGTGCCCTGGCTCATCTCCAAGAATCGGCGCGCGCTGGAGGACGCGTTGACAGCCGCTCGGC : 1004
W_cDNA_C1S  : CAAGGACGTGCCCTGGCTCATCTCCAAGAATCGGCGCGCGCTGGAGGACGCGTTGACAGCCGCTCGGC : 1043

          *          1140          *          1160          *          1180          *
C2cDNA      : ATCTCCGACTGGAACCTCCATCTTCTGGGTGGCGCACCCCGCGGGCCCGCCATCTCGACACAGGTGGAGG : 1190
WhpGen      : ATCTCCGACTGGAACCTCCATCTTCTGGGTGGCGCACCCCGCGGGCCCGCCATCTCGACACAGGTGGAGG : 1071
W_cDNA_in   : ATCTCCGACTGGAACCTCCATCTTCTGGGTGGCGCACCCCGCGGGCCCGCCATCTCGACACAGGTGGAGG : 1074
W_cDNA_C1S  : ATCTCCGACTGGAACCTCCATCTTCTGGGTGGCGCACCCCGCGGGCCCGCCATCTCGACACAGGTGGAGG : 1113

          1200          *          1220          *          1240          *          1260
C2cDNA      : CCAAGGTCGGGCTGGACAAGGCCAGGATGCGCGCCACCCGCCACGTCCTCTCCGAGTACGGCAACATGTC : 1260
WhpGen      : CCAAGGTCGGGCTGGACAAGGCCAGGATGCGCGCCACCCGCCACGTCCTCTCCGAGTACGGCAACATGTC : 1141
W_cDNA_in   : CCAAGGTCGGGCTGGACAAGGCCAGGATGCGCGCCACCCGCCACGTCCTCTCCGAGTACGGCAACATGTC : 1144
W_cDNA_C1S  : CCAAGGTCGGGCTGGACAAGGCCAGGATGCGCGCCACCCGCCACGTCCTCTCCGAGTACGGCAACATGTC : 1183

```

```

          *      1280      *      1300      *      1320      *
C2cDNA      : CAGCGCCTGCGTCTCTTCATCCTCGACGAGATGCGCAAGCGCTCCGCCGAGGACGGACAGGCCACCACG : 1330
WhpGen      : CAGCGCCTGCGTGTCTTCATCCTCGACGAGATGCGCAAGCGTCCGCCGAGGACGGCCAGTCCACCACC : 1211
W_cDNA_in   : CAGCGCCTGCGTGTCTTCATCCTCGACGAGATGCGCAAGCGCTCCGCCGAGGACGGCCAGGCCACCACC : 1214
W_cDNA_C1S  : CAGCGCCTGCGTGTCTTCATCCTCGACGAGATGCGCAAGCGCTCCGCCGAGGACGGCCAGGCCACCACC : 1253

          1340      *      1360      *      1380      *      1400
C2cDNA      : GGCGAGGGGCTCGACTGGGGCGTCTCTTCGGCTTCGGCCCGGGACTCACCGTCGAGACCGTCGTGCTCC : 1400
WhpGen      : GGCGAGGGGCTCGACTGGGGCGTGTCTCTTCGGCTTCGGCCCGGGCTCACCGTCGAGACCGTCGTGCTCC : 1281
W_cDNA_in   : GGCGAGGGGCTCGACTGGGGCGTCTCTTCGGCTTCGGCCCGGGCTCACCGTCGAGACCGTCGTGCTCC : 1284
W_cDNA_C1S  : GGCGAGGGGCTCGACTGGGGCGTCTCTTCGGCTTCGGCCCGGGCTCACCGTCGAGACCGTCGTGCTCC : 1323

          *      1420      *      1440      *      1460      *
C2cDNA      : ACAGCGTCCCCATCACCACCGGAGCGGCCACCGCC---TGAATTCATCGATTTCATCAACGATCAAATTCCT : 1467
WhpGen      : ACAGCGTCCCCATCACCACCGGAGCGGCCACCGCCGCCGTGAGTCGTC-ATCTATCCTCGCGA-CGCTCCA : 1349
W_cDNA_in   : ACAGCGTCCCCATCACCACCGGAGCGGCCACCGCCGCCGTGAGTCGTCATCATCGCCCGTC-CACTCCA : 1353
W_cDNA_C1S  : ACAGCGTCCCCATCACCACCGGAGCGGCCACCGCCGCCGTGAGTCGTCATCATCGGATTCGCTCCA : 1393
          ←

          1480      *      1500      *      1520      *      1540
C2cDNA      : CCCCTCTCCGATCCAAATTCGTGCGTCTCGTTTCGTATTATTTTACGTCGTCGTCGCCGAAATAATGTG : 1537
WhpGen      : GACATGAACGACCCGACTACGAATAAT----- : 1376
W_cDNA_in   : GACATGAACGACCCGACTACG----- : 1374
W_cDNA_C1S  : GACATGAACGACCCGACTACG----- : 1414
          ←
JK3Whp-19

```

Abb. 3.3.1-5: Vergleich der Nukleotidsequenzen der C2-cDNA (*wt*), des *Whp*-Gens (*wt*), der *Whp*-cDNA (*inc2Whp*) und der *Whp*-cDNA (*C1^S*). Start- und Stoppkodon sind rot und vermutete Deletionen mit orange hinterlegt. Die Basenaustausche, die zu keinem Wechsel der Aminosäuresequenz führen sind blau gekennzeichnet und diejenigen, die zu einer Veränderung der Aminosäuresequenz führen sind rot markiert. Die Veränderungen sind nur im kodierenden Bereich der Sequenzen hervorgehoben. Mit blauen Pfeilen ist die Grenze zwischen Exon 1 und Exon 2 gekennzeichnet. Das Intron in der Sequenz des genomischen *Whp*-Wildtyp-Gens ist aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht abgebildet. Mit Pfeilen sind die Positionen und Bezeichnungen der bei den Klonierungen verwendeten *Whp*-spezifischen Primer angegeben.

3.3.2 Analyse der abgeleiteten Proteine der *Whp*-Sequenzen

Aus den Sequenzen der *Whp*-cDNAs der Linien *inc2Whp* und *C1^S*, der *C2*-cDNA (*wt*) und des *Whp*-Wildtyp-Gens (*wt*) wurden die Aminosäuresequenzen abgeleitet und miteinander verglichen (Abb. 3.3.2-1).

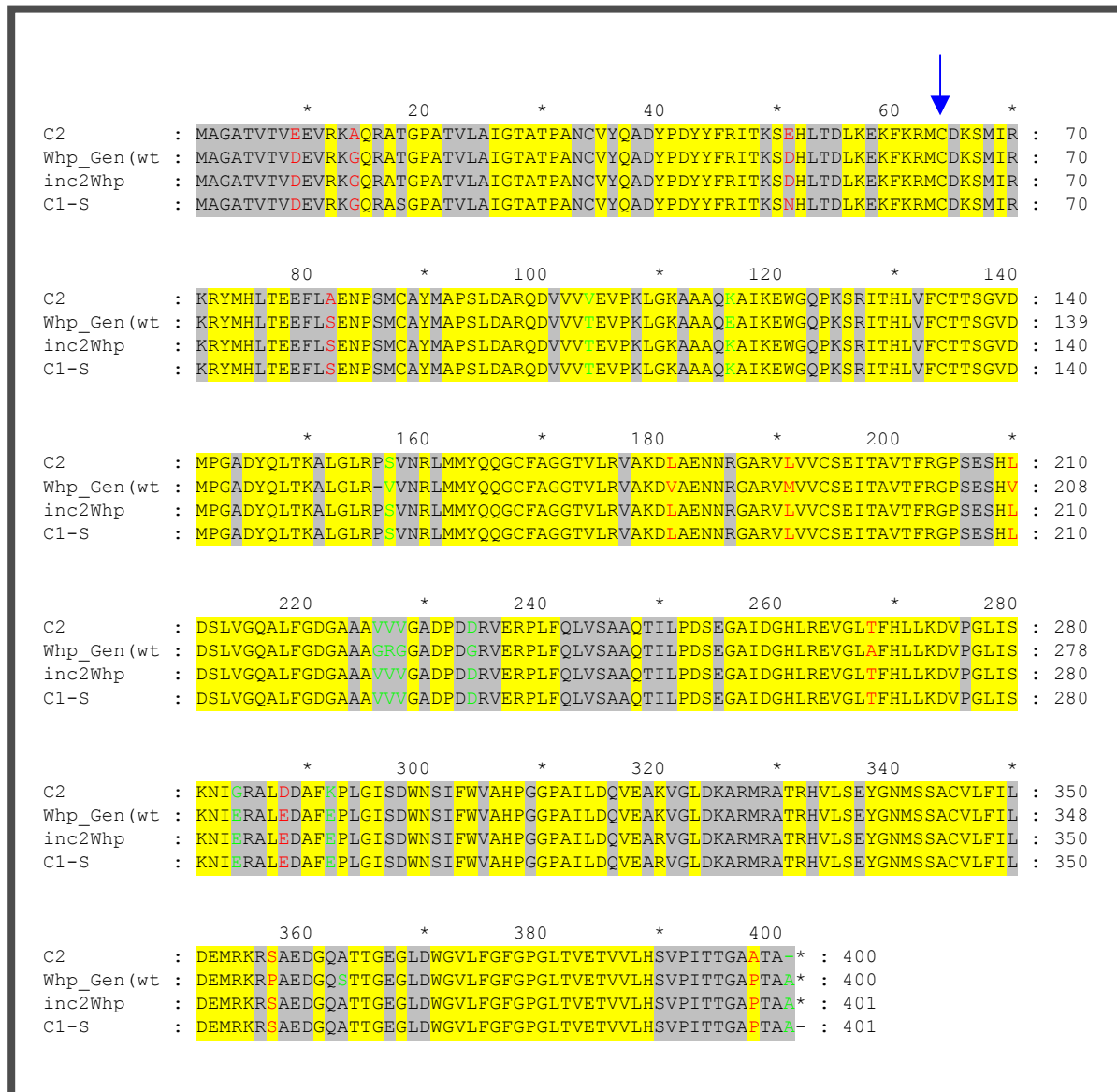


Abb. 3.3.2-1: Vergleich der aus den Sequenzen der *Whp*-cDNAs der Linien *inc2Whp*, und *C1^S*, der *C2*-cDNA (*wt*), und des *Whp*-Gens (*wt*) abgeleiteten Aminosäuresequenzen. Homologe Aminosäure-Bereiche der Chalkonsynthasegene aus Mais sind grau hinterlegt. Konservierte Aminosäure-Sequenzen der bisher untersuchten *Chalkonsynthasen* aus sechs verschiedenen Pflanzenspezies sind gelb hinterlegt (nach Niesbach-Klösgen, 1987). Die Grenze zwischen Exon 1 und Exon 2 ist durch einen blauen Pfeil gekennzeichnet. Konservative Änderungen von Aminosäuren sind durch rote Schriftzüge und nicht-konservative Aminosäure-Änderungen durch grüne Schriftzüge markiert.

Die aus den *Whp*-cDNAs der Linien *inc2Whp* und *C1^S* abgeleiteten Proteinsequenzen ergeben ein *CHS*-Protein mit einer Länge von 401 Aminosäuren (AS). Das von der codogenen Sequenz des *Whp*-Gens (*wt*) abgeleitete Protein weist eine Größe von 400 AS auf. Dieses Protein ist aufgrund einer Deletion von 3 Basen im Vergleich zur Sequenz der in dieser Arbeit klonierten cDNAs um 1 AS verkürzt. Die Länge des aus der *C2*-cDNA abgeleiteten Proteins beträgt auch 400 AS.

Die homologen Aminosäurebereiche zwischen den beiden Chalkonsynthasegenen aus Mais sind in der Abbildung grau hinterlegt. Zusätzlich sind die im Vergleich zu *Chalkonsynthasen* aus sechs verschiedenen Pflanzenspezies konservierten Aminosäure-Sequenzen gelb hinterlegt (nach Niesbach-Klöggen, 1987). Dieser Vergleich wurde von Niesbach-Klöggen (1987) mit den AS-Sequenzen der *CHS* Gene aus *Antirrhinum majus*, *Petunia hybrida*, *Petroselinum hortense*, *Ranunculus acer*, *Magnolia liliiflora*, *Hordeum vulgare* und *Zea mays* durchgeführt.

Insgesamt können zwischen den *Chalkonsynthase*-Sequenzen aus Mais 21 Unterschiede in der Aminosäureabfolge festgestellt werden. Davon sind 11 funktionell konservative Veränderungen und 10 Austausch nicht-konservative Veränderungen. Zwölf dieser Veränderungen befinden sich in Sequenzbereichen, die im Vergleich zu anderen *Chalkonsynthasen* weniger konserviert sind. Der bereits in 3.3.1 erwähnte chimäre Charakter der cDNA-Sequenzen aus den Linien *c2inWhp* und *C1^S* wird, insbesondere beim Vergleich der mittleren Proteinregionen mit der *C2*-Sequenz, deutlich. Die genomische Sequenz des *Whp*-Wildtypgens (Franken *et al.*, 1991) unterscheidet sich auch auf Proteinebene signifikant von den aus den cDNAs abgeleiteten Sequenzen der vorliegenden Arbeit. Eine veränderte Funktion der Proteine ist jedoch aufgrund des hohen Grades der Homologie nicht zu vermuten.

3.3.3 Isolierung und Analyse einer genomischen *Whp*-Sequenz aus dem Genotyp *inc2Whp*

Da die Sequenzen der aus den Genotypen *C1^S* und *inc2Whp* isolierten *Whp*-cDNAs Sequenzabweichungen zu dem aus dem Wildtyp (*InC2Whp*) klonierten *Whp*-Gen (Franken *et al.*, 1991) aufweisen (Abb. 3.3.1-5), war es notwendig, diese Ergebnisse durch Klonierung einer genomischen Sequenz aus der Linie *inc2Whp* zu bestätigen.

Zunächst wurde mehrmals mit Hilfe eines *Whp*-Promotor-Fragmentes des Wildtyps bzw. einer *C2*-cDNA versucht, *Whp*-spezifische Klone aus einer vorhandenen *inc2Whp* gDNA-Bibliothek zu isolieren. Leider konnten dabei keine entsprechenden λ -Phagenklone vereinzelt werden. Deshalb wurden PCR Experimente mit genomischer DNA aus der Linie *inc2Whp* und mit *C2*- und *Whp*-spezifischen Primern konzipiert.

In der Abbildung 3.3.3-1, A sind die für Amplifikationen verwendeten Primer mit der Position ihrer Bindestellen bezüglich des *Whp*-Wildtypgens dargestellt. Für die PCR-Ansätze (Abb. 3.3.3-1, B) mit den entsprechenden Primerpaaren wurden als Ausgangsmaterial jeweils 100 ng genomische *inc2Whp*-DNA (Ac 1805, GHN 1808) eingesetzt. Für die positiven Kontrollansätze wurden alle PCR-Reaktionen mit 10 ng Plasmid-DNA (p 102 mit dem *Whp*-Gen des Wildtyps, Franken, 1991) durchgeführt (2.13.1).

Von der Plasmid-DNA (p 102) konnten mit allen eingesetzten Primerpaaren Amplifikate der erwarteten Längen erhalten werden. Mit den Primerpaaren JK5`*Whp*-32/JK3`*Whp*-19 und JK5`*Whp*-22/JK3`*Whp*-19, die theoretisch Amplifikate des nahezu vollständigen transkribierten Bereiches ermöglichen, konnten im Gegensatz dazu aus der genomischen *inc2Whp*-DNA keine Fragmente amplifiziert werden (Abb. 3.3.3-1, B).

Wie der Sequenzvergleich der Nukleotidsequenzen zeigt (Abb. 3.3.1-5), liegen die Unterschiede der klonierten *Whp*-cDNAs zu dem *Whp*-Wildtypgen vorwiegend im Bereich des zweiten Exons. Deshalb wurden weitere Versuche zur Klonierung auf diesen Sequenzbereich konzentriert.

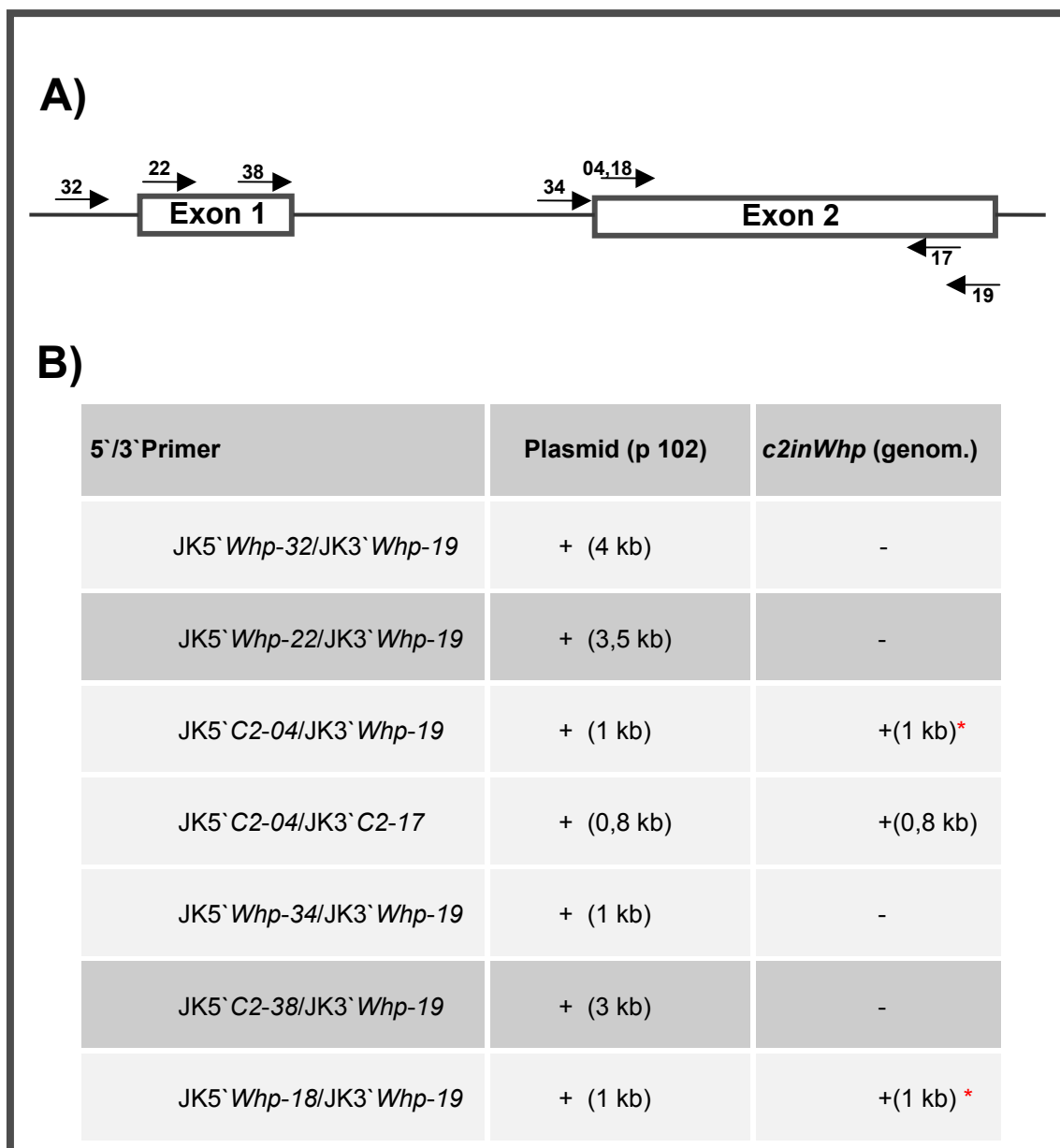


Abb. 3.3.3-1: Amplifikation von Bereichen des *Whp*-Gens aus der Linie *inc2Whp*. **A)** zeigt die schematische Darstellung des *Whp*-Gens aus der Linie *Inc2Whp* (*wt*) und die Bindestellen der bei der Amplifikation verwendeten Primer. **B)** Zusammenfassung der PCR-Ergebnisse: Als positive Kontrolle wurde Plasmid-DNA (p102) mit dem *Whp*-Gen des Wildtyps (*Whp*, *wt*) verwendet. + steht für erhaltene Amplifikate, deren Längen in Klammern angegeben sind; - steht, wenn keine Amplifikate erhalten wurden. Mit * sind Amplifikate gekennzeichnet, die kloniert und sequenziert wurden.

Mit drei Primerpaaren JK5`C2-04/JK3`Whp-19, JK5`C2-04/JK3`C2-17 und JK5`Whp-18/Jk3`Whp-19 wurden PCR-Produkte der erwarteten Längen erhalten. Diese PCR-Produkte wurden zusammen mit den Kontrollansätzen in einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt (2.8), auf eine Membran übertragen (2.9) und mit einer Digoxigenin-markierten C2-cDNA-Sonde (2.15.1) hybridisiert (2.11, 2.12).

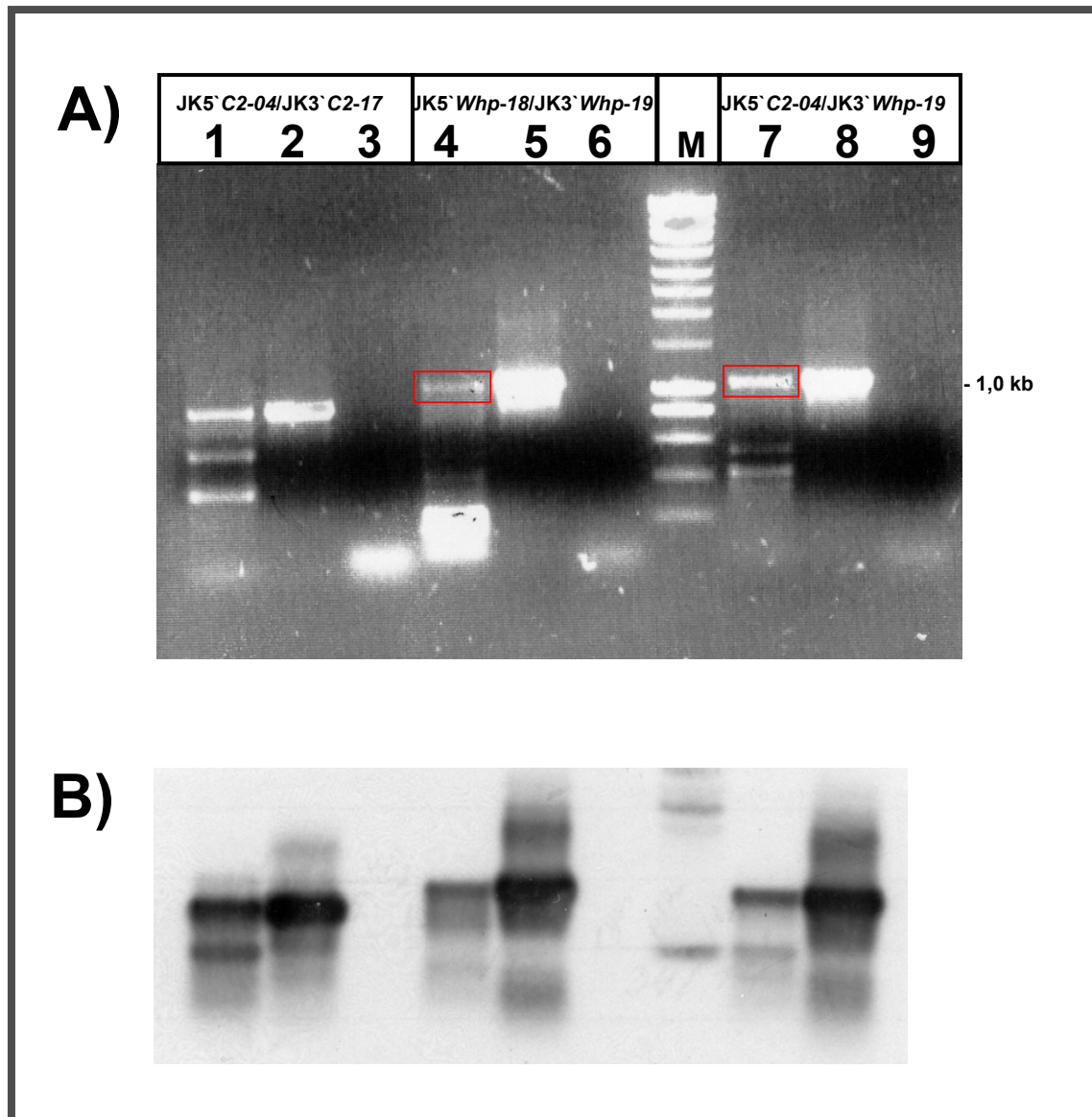


Abb. 3.3.3-2: Amplifikation von Fragmenten des *Whp*-Gens aus genomischer *inc2Whp*-DNA (Ac 1805). A) Mit Ethidiumbromid gefärbtes 1%iges Agarosegel mit den erhaltenen Amplifikaten nach PCR mit genomischer DNA der Linie *inc2Whp*: die verwendeten Primerkombinationen sind über den Spuren angegeben. Spuren 1, 4 und 7: Amplifikate von genomischer DNA der Linie *inc2Whp*; Spuren 2, 5 und 8: Amplifikate von dem Plasmid p 102 (*Whp*-Gen, Wildtyp); Spuren 3, 6 und 9: Wasserkontrollen. **M** = Smartladder (Eurogentec). **B)** Luminogramm nach Hybridisierung der auf eine Membran transferierten Amplifikate aus A) mit einer Digoxigenin-markierten C2-cDNA-Sonde.

Das Ergebnis der Hybridisierung zeigt (Abb. 3.3.3-2, B), dass alle PCR-Amplifikate mit der C2-cDNA Sonde detektiert werden. Da mit dem Primerpaar JK5`C2-04/JK3`C2-17 die Amplifikation des zweiten Exons sowohl vom C2-Gen als auch vom *Whp*-Gen möglich ist, wurde das mit diesen Primern erhaltene PCR-Produkt nicht weiter analysiert.

Der JK3`*Whp*-19 Primer ist spezifisch für das *Whp*-Gen, da sich die Sequenz im 3`-UTR-Bereich des *Whp*-Gens befindet. Dementsprechend sind mit den Primerpaaren JK5`C2-04/JK3`*Whp*-19 und JK5`*Whp*-18/JK3`*Whp*-19 nur *Whp*-spezifische Amplifikate zu erwarten. Deshalb wurden die mit diesen Primern erhaltenen PCR-Produkte kloniert (2.16.1). Jeweils zwei Klone, die ein Insert der erwarteten Größe enthielten, wurden aus beiden Richtungen sequenziert (2.19). Ein Vergleich der Nukleotidsequenzen der zuvor (3.3.1) klonierten *Whp*-cDNA mit dem Amplifikat des *Whp*-Gens zeigte eine vollständige Übereinstimmung der Sequenzen (ohne Abb.), so daß die zuvor postulierte cDNA-Sequenz des *Whp*-Gens (*c2inWhp*, Abb. 3.3.1-5) zumindest für diesen Genbereich bestätigt ist.

Die in diesem Abschnitt der Arbeit dargestellten Ergebnisse zur Sequenz von *Whp*-cDNAs der beiden Linien *inc2Whp* und *C1^S* lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- Der Sequenzvergleich dieser beiden *Whp*-cDNAs mit dem *Whp*-Wildtypgen (Franken *et al.*, 1991) und mit der C2-cDNA zeigt, dass die *Whp*-cDNAs Sequenzmerkmale beider *CHS*-Gene, *Whp*-(*wt*) und C2, besitzen. Im mittleren Bereich der kodierenden Regionen ist eine größere Ähnlichkeit mit dem C2-Gen vorhanden. Allerdings ist die Sequenz beider cDNAs am Anfang und am Ende der kodierenden Bereiche identisch mit dem *Whp*-Gen aus dem Wildtyp (Abb. 3.3.1-5).

- Obwohl die Sequenzunterschiede durch nicht-synonyme Nukleotidaustausche zu Abweichungen auf der Aminosäureebene führen, ist es unwahrscheinlich, dass dadurch das Gen-Produkt (*CHS*) oder seine Funktion verändert werden. Da der überwiegende Teil der für die Funktion relevanten Aminosäuren unverändert bleibt, wie ein Vergleich mit den bisher gefundenen *Chalkonsynthasen* aus sechs verschiedenen Pflanzenspezies zeigt (Abb. 3.3.2-1).

- Im 5'-UTR-Bereich der *Whp*-cDNA aus der Linie *C1^S* wurden allerdings deutliche Sequenzunterschiede festgestellt. Die zwei Insertionen von 32 bzw. 7 Nukleotiden, ein Nukleotid Austausch, eine Deletion eines Nukleotides und eine Insertion eines Nukleotides könnten möglicherweise mit für die verstärkte *Whp*-Genexpression in dieser Linie verantwortlich sein (Abb. 3.3.1-5). Aufgrund der im 5'-UTR gefundenen Unterschiede könnten außerdem weitere Veränderungen im Promotorbereich dieses Gens vermutet werden. Um dieser Frage nachzugehen, sollten deshalb die Promotorsequenzen detailliert untersucht werden.

3.4 Isolierung und Charakterisierung des *Whp*-Promotors aus den beiden Genotypen *inc2Whp* und *C1^S*

Bei der Sequenzanalyse der *Whp*-cDNA aus dem *C1^S*-Genotyp wurden im 5'-UTR-Bereich Veränderungen gegenüber der Wildtypsequenz und der Linie *inc2Whp* gefunden (3.3; Abb. 3.3.1-5). Diese könnten möglicherweise für die hohe *Whp*-Genexpression in dieser Linie (3.1; Abb. 3.1-2) mitverantwortlich sein. Es ist bekannt, dass bei der Aktivierung eines Gens Transkriptionsfaktoren mit verschiedenen Sequenzelementen im Promotor-, 5'-UTR- oder 3'-UTR-Bereich dieses Gens interagieren können. Auch eine Interaktion mit Intronsequenzen ist bekannt (Mascarenhas *et al.*, 1990; Maas *et al.*, 1991). Um die Ursachen für die hohe Expression des *Whp*-Gens im *C1^S*-Genotyp zu verstehen, sollte die Sequenz des Promotor-Bereiches kloniert und hinsichtlich möglicher Sequenzveränderungen gegenüber der Wildtypsequenz (Franken *et al.*, 1991) verglichen werden. Außerdem war es interessant, den Promotor aus der Linie *inc2Whp* zu analysieren, in der nur eines der zwei Chalkonsynthasegene, das *Whp*-Gen, funktional ist. Deshalb wurden Experimente durchgeführt, um Promotor-Bereiche aus den beiden Linien *C1^S* und *inc2Whp* mit Hilfe der PCR zu klonieren.

Zur Klonierung der Promotor-Sequenzen wurde die genomische DNA aus Blattmaterial der Linie *C1^S* (Ac 578 *C^S*, GHN 1621) und der Linie *inc2Whp* (Ac Zm 1805, GHN 1808) isoliert (2.6.1). Für die Amplifikation von Promotor-Fragmenten aus den genomischen DNAs dieser Linien (2.13.1) wurden folgende Primernkombinationen verwendet: JK5`*Whp*-39/JK3`*Whp*-40, JK5`*Whp*-32/JK3`*Whp*-40, JK5`*Whp*-32/JK3`*Whp*-31. Die Sequenzen dieser Primer basieren auf der bereits bekannten Sequenz des *Whp*-Wildtypgens (Franken *et al.*, 1991). In der Tabelle 3.4-1 sind die mit diesen Primerpaaren erwarteten Fragmentgrößen und Genbereiche dargestellt. Eine schematische Darstellung der Primer-Positionen ist in der Abbildung 3.4-1 gezeigt.

Primer 5`/3`	Erwartete Fragmentgröße (kb) basierend auf der Wildtypsequenz	Gen-Bereich
JK5` <i>Whp</i> -39/JK3` <i>Whp</i> -40	1,0	Promotor-5`-UTR
JK5` <i>Whp</i> -32/JK3` <i>Whp</i> -40	0,5	Promotor- 5`-UTR
JK5` <i>Whp</i> -32/JK3` <i>Whp</i> -31	0,4	Promotor

Tabelle 3.4-1: Die bei der Amplifikation des *Whp*-Promotors verwendeten Primer und die aufgrund der *Whp*-Wildtypsequenz erwarteten Produktgrößen.

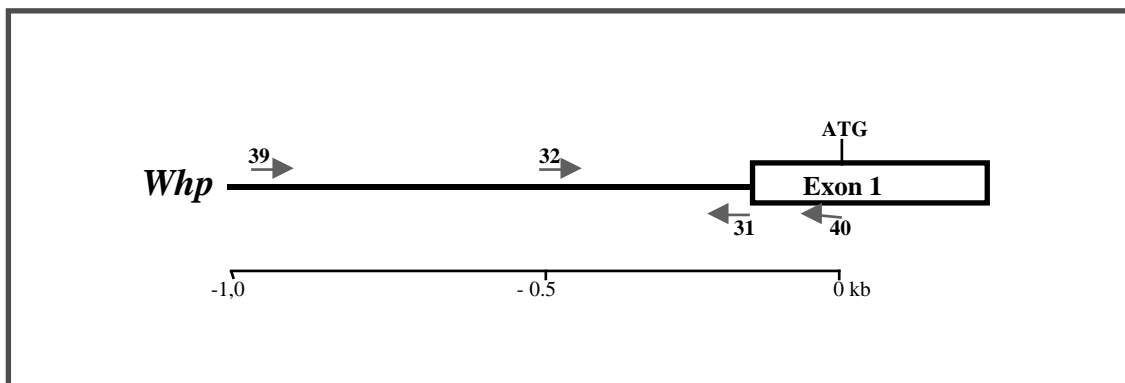


Abb. 3.4-1: Schematische Darstellung des *Whp*-Promotor-Bereiches. Position, Bezeichnung und Orientierung der bei der Amplifikation der *Whp*-Promotor-Bereiche verwendeten Primer. Mit Pfeilen ist die Orientierung der *Whp*-Primer gezeigt. Die Längenangabe der Sequenz ist relativ zum Translationsstart angegeben.

Bei der Amplifikation mit den am weitesten auseinander liegenden Primern JK5` *Whp*-39 und JK3` *Whp*-40 konnten keine *Whp*-spezifischen Produkte erhalten werden. Bei der Betrachtung der Promotor-Sequenz des genomischen *Whp*-Klons des Wildtyps (Franken *et al.*, 1991) konnten im Bereich zwischen $-1,0$ und $-0,5$ kb, in welchem sich auch die Position des JK5` *Whp*-39-Primers befindet, mehrere „repeats“ identifiziert werden, die in „sense“ und „antisense“ orientiert sind und vermutlich außerdem mehrfach im Mais-Genom vorkommen. Diese „repeats“ bilden wahrscheinlich Haarnadelstrukturen, die eine Amplifikation dieses Genbereiches erschweren. Zur Auflösung dieser Sekundärstrukturen wurde DMSO in den Amplifikationsansätzen verwendet, jedoch konnte dadurch das Problem nicht gelöst werden.

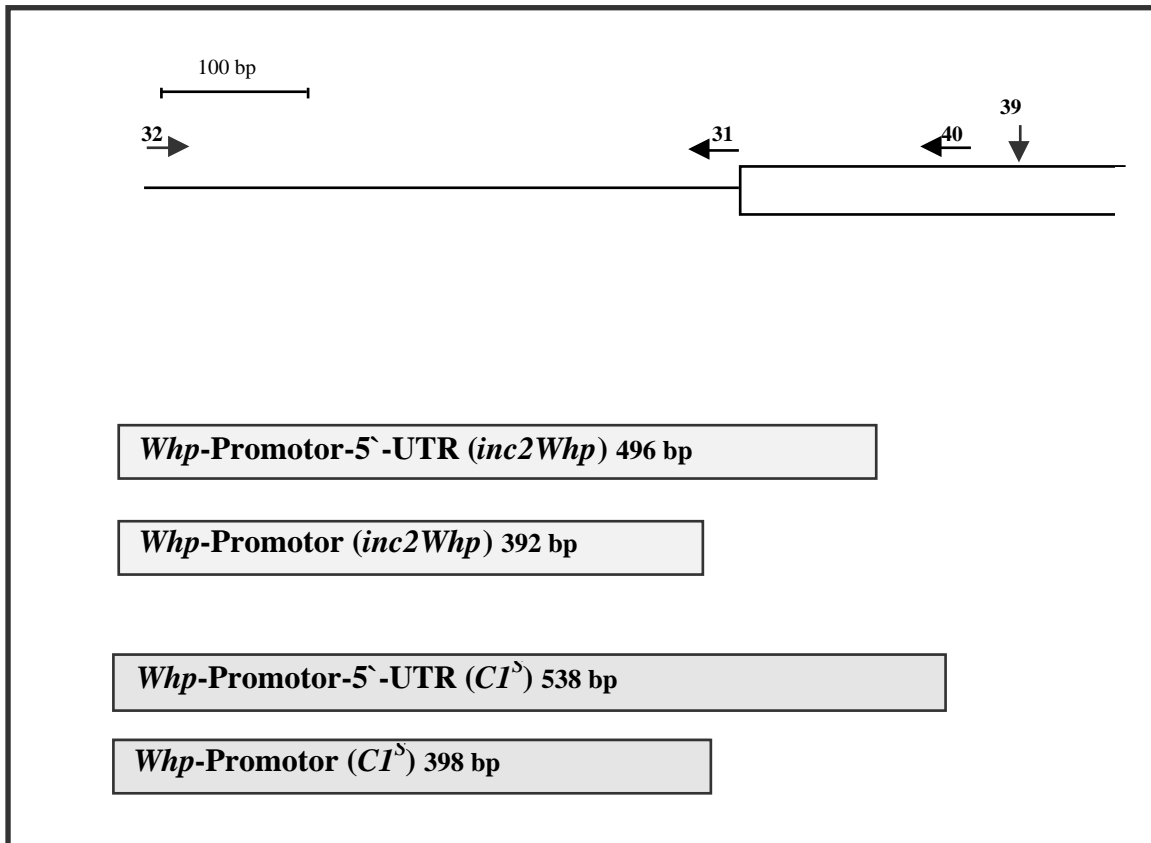


Abb. 3.4-2: Schematische Darstellung der nach PCR-Amplifikation erhaltenen *Whp*-Promotor- und *Whp*-Promotor-5'-UTR-Sequenzen aus den Maislinien *CI^S* und *inc2Whp*. A) Position und Bezeichnung der für die Amplifikation der *Whp*-Promotor-Bereiche verwendeten Primer. Mit den Pfeilen ist die Orientierung der *Whp*-Primer gezeigt. B) Schema der durch PCR erhaltenen und in den pCR[®] 2.1-TOPO[®] Vektor klonierten *Whp*-Promotor-Fragmente der beiden Maislinien.

Bei der Amplifikation von *Whp*-Promotor-5'-UTR- und *Whp*-Promotor-Bereichen mit den entsprechenden Primerpaaren JK5`*Whp*-32/JK3`*Whp*-40 und JK5`*Whp*-32/JK3`*Whp*-31 wurden aus beiden Maislinien PCR-Produkte der erwarteten Länge erhalten, die in den pCR[®] 2.1-TOPO[®] Vektor kloniert wurden (2.16.1). Die aus den erhaltenen Klonen isolierte Plasmid-DNA (2.6.3.2) wurde über Restriktionsanalyse mit *EcoRI* auf enthaltene Inserts untersucht (Daten nicht gezeigt). Die positiven Klone wurden mit den Primern T3 und T7 von beiden Seiten sequenziert (2.19). Die erhaltenen *Whp*-Promotor- und *Whp*-Promotor-5'-UTR-Amplifikate sind in der Abbildung 3.4-2 schematisch dargestellt.

Die Sequenzen der erhaltenen Klonen wurden mit dem *Whp*-Promotor-Bereich des Wildtyps verglichen (Abb. 3.4-3). Der Sequenzvergleich zeigt, dass der Klon mit der Promotor und 5`-UTR-Region aus der Linie *inc2Whp* identisch mit der Wildtyp-Sequenz ist. In dem Promotor-Bereich der Linie *C1^S* treten zusätzlich zu den bereits gefundenen Veränderungen im 5`-UTR-Bereich (zwei Insertionen aus 32, und 7 Nukleotiden, eine Insertion eines Nukleotids, ein Nukleotidaustausch und eine Nukleotiddeletion) weitere Unterschiede im Vergleich mit dem Wildtyp auf (Abb. 3.4-3):

- Deletionen von vier (TAGC, bp 50-54 *wt*), zwei (TA, bp 70-71 *wt*) und einem Nukleotid (G, bp 91 *wt*);
- Neun Nukleotidaustausche;
- Drei Insertionen von Nukleotiden (C, bp 80; C, bp 102; C, bp 225 *C1^S*) und eine Duplikation von sieben Nukleotiden (TTTTCAC, bp 181-187 *C1^S*).

Die Analyse der Promotorsequenzen zeigt, dass im *Whp*-Promotor der Linie *C1^S* Veränderungen vorhanden sind. Es ist nicht ausgeschlossen, dass diese, möglicherweise in Verbindung mit anderen Faktoren, Ursache für eine verstärkte Expression des *Whp*-Gens in dieser Linie sein könnten.

Um zu untersuchen, ob die gefundenen Sequenzunterschiede im *Whp*-Promotor und im 5`-UTR-Bereich des Gens in der Linie *C1^S* im Zusammenhang mit der verstärkten *Whp*-Expression stehen, wurden Promotor-Reporter-gen-Konstrukte hergestellt (3.5.1). Die Expressionsaktivität dieser Konstrukte wurde dann durch Cotransformation mit Regulatoren der Anthocyanbiosynthese in transienten Transformationsassays untersucht und mit der Aktivität des Promotors aus dem Wildtypgen verglichen (3.5.3).

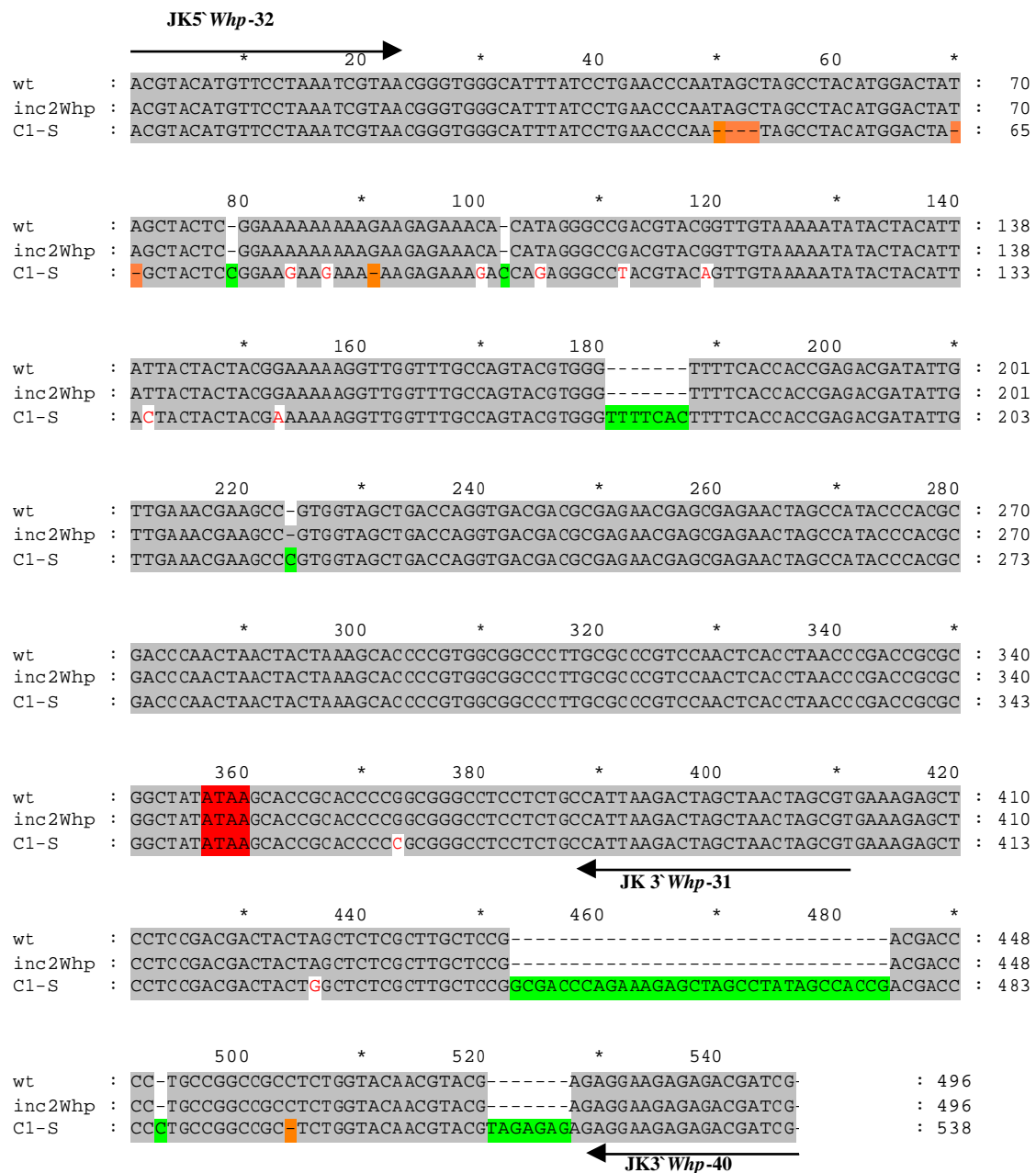


Abb. 3.4-3: Vergleich der Nukleotidsequenz der Promotor- und 5'-UTR-Region des *Whp*-Gens aus den Genotypen *wt*, *inc2Whp* und *C1^S*. Verschiedene Promotor- und 5'-UTR-Fragmente wurden mittels PCR von der genomischen DNA verschiedener Genotypen amplifiziert, in den pCR[®] 2.1-TOPO[®] Vektor kloniert und mit den Primern T3 und T7 von beiden Seiten sequenziert. Die Pfeile kennzeichnen die für die Amplifikation verwendeten Primer (siehe Abb. 3.4-2). Sequenzunterschiede zum Wildtypgen (*wt*) sind farbig gekennzeichnet: orange = Deletionen, grün = Insertionen. Die TATA-Box ist rot hinterlegt. Rote Buchstaben kennzeichnen Nukleotidaustausche.

3.5 Transiente Transformation von Maisembryonen

Die detaillierte Charakterisierung des *C2-Idf*- und des *C1^S*-Allels auf den Ebenen der genomischen bzw. komplementären DNA konnte verschiedene Ansatzpunkte für die molekularen Ursachen der auftretenden Phänotypen aufzeigen. Allerdings reicht die Aufklärung der Genstruktur allein für Erklärungsmodelle der Genfunktion nicht aus. Deshalb wurden verschiedene Experimente zur Promotor-Aktivität der betroffenen Gene durchgeführt.

Die Maiskörner der *C2-Idf*-Mutante sind farblos (1.1.2). In dieser Linie konnte kein *CHS*-Protein nachgewiesen werden (Franken *et al.*, 1991). Die Ergebnisse der Expressionsanalyse (3.1) zeigen, dass in dieser Linie vermutlich keine oder nur sehr wenige *C2*-spezifische Transkripte vorliegen (Abb. 3.1-2). Die Sequenzen der Promotor- und der 5'-UTR-Regionen von zwei der drei *C2*-Kopien dieses Allels (Klone *Qb* und *55*) sind bekannt. Der Promotor-Bereich der *C2-Idf*-Genkopie *55* weist gegenüber der *C2*-Wildtyp-Sequenz nur verschiedene kleinere Deletionen, Insertionen und Austausch von Nukleotiden auf (Borchert, 1998 und Abb. 4.1-2). Die Struktur allein gibt deshalb keine Hinweise auf einen Verlust der Promotor-Aktivität. Im Exon 2 dieser Genkopie ist allerdings ein langes Retroelement vom *PREM-2* Typ inseriert, so dass deshalb von dieser Genkopie wahrscheinlich keine vollständige mRNA transkribiert wird.

Im Promotor der *C2-Idf*-Kopie *Qb* liegt im Gegensatz dazu eine 1,165 bp lange Insertion eines *CACTA*-Elementes vor (Abb. 3.2.3-1). Dieser Promotor ist aus diesem Grund möglicherweise nicht mehr funktionell.

Die Sequenz der dritten *C2-Idf*-Kopie ist noch unbekannt. Aufgrund der genomischen Southern-Blot-Analyse mit dem Restriktionsenzym *EcoRV* wurde jedoch festgestellt, dass der Promotor-Bereich der dritten *C2-Idf*-Kopie vermutlich keine *CACTA*-Insertion enthält und zumindest in der Länge eher dem Promotor-Bereich des *C2-Idf*-Klons *55* entspricht (Abb. 3.2.1-2). Da die bisherigen Informationen zur Struktur dieser dritten *C2-Idf*-Genkopie keine Beweise für lange Insertionen oder Deletionen in dieser Genkopie liefern, ist nicht völlig auszuschliessen, dass eine Transkription vollständiger mRNAs von dieser Genkopie

möglich wäre. Da der Promotor dieser Genkopie bislang für Analysen nicht zugänglich ist, sollte die Frage geklärt werden, ob die Promotoren der Genkopien *55* und *Qb* funktionell sind. Obwohl sich die Sequenzen der Promotor- und 5'-UTR-Bereiche der bekannten *C2-ldf*-Kopien von denen des *C2*-Wildtyps unterscheiden, sind die potentiellen Bindestellen für regulierende Proteine (z.B. Produkte des *C1*- und *R*-Gens) nicht verändert. Allerdings ist es trotzdem möglich, dass schon diese wenigen Sequenzänderungen in dem Promotor- und im 5'-UTR-Bereich der *C2-ldf*-Genkopien zu einem Funktionsverlust dieser Promotoren führen könnten. Dies sollte durch Promotor-Reporter-Gen-Analysen untersucht werden (3.5.2).

Die Aktivierung der Strukturgene des Anthocyanbiosyntheseweges im Aleuron und Scutellum erfolgt nur in der Anwesenheit der regulatorischen Gene *R* und *C1* (Roth *et al.*, 1991). Deshalb sollten diese Gene bei den Promotor-Reporter-Gen-Analysen zusammen mit den Promotor-Reporter-Gen-Konstrukten transformiert und konstitutiv exprimiert werden.

Bei der Promotor-Reporter-Gen-Analyse werden die Gen-Konstrukte in Mais-Gewebe mittels biolistischer Transformation eingebracht (2.20). Durch die Aktivität des Promotors wird das Reporter-Gen exprimiert und das zugehörige Enzym hergestellt. Die Aktivität dieses Enzyms kann im Proteinextrakt des aufgearbeiteten Pflanzenmaterials mit spezifischen Enzymassays bestimmt werden (2.21).

Als Reporter-Gen wurde bei diesen Analysen das Luciferasegen aus der Feuerfliege *Photinus pyralis* (de Luca, 1978) ausgewählt. Das Produkt des Luciferasegens katalysiert eine Reaktion, bei der eine Lichtemission entsteht, die mit Hilfe eines Luminometers quantifiziert werden kann.

Um die Aktivität der Promotoren der zwei *C2-ldf*-Kopien (*Qb* und *55*) zu untersuchen und mit der *C2*-Promotor-Aktivität des Wildtyps vergleichen zu können, sollten entsprechende *C2*-(*wt*)-Promotor-, *C2-ldf*-(*Qb*)-Promotor- und *C2-ldf*-(*55*)-Promotor-Reporter-Gen-Konstrukte hergestellt werden (3.5.1).

Das Aleuron der Linie *C1^S* ist intensiver gefärbt als die des Wildtyps (*LC*). In der aus diesem Genotyp isolierten *Whp*-Promotor-5'-UTR-Sequenz wurden Änderungen im Vergleich zur Wildtyp-Sequenz sowohl in dem Promotor, als auch in

der 5`-UTR-Region gefunden (Abb. 3.4-3). Ob diese Änderungen mögliche regulative Elemente enthalten und eine verstärkte Expression des *Whp*-Gens in dieser Linie hervorrufen (Abb. 3.1-2), sollte ebenfalls durch Promotor-Reporter-Gen-Analysen untersucht werden (3.5.3).

Um die Aktivität der *Whp*-Promotor-Reporter-Genkonstrukte aus der Linie *C1^S* vergleichen zu können, sollten als Kontrolle vergleichbare Genkonstrukte aus der Linie *inc2Whp* verwendet werden. Da zuvor (3.4) gezeigt werden konnte, dass die Sequenz des *Whp*-Promotor-5`-UTR-Bereiches aus der Linie *inc2Whp* mit der Sequenz des Wildtyps identisch ist, werden Konstrukte mit diesem DNA-Fragment nachfolgend als Wildtyp bzw. *LC*-Linie bezeichnet.

Bei Mais ist ein weiteres aleuronspezifisches regulatorisches Gen, *In* (*Intensifier*, Burr *et al.*, 1996), bekannt, das hemmend auf die Expression der Anthocyanogene wirkt (Rojek, 1996). Eine Mutante dieses Gens, *InD* (*Intensifier dilute*), wurde von Rojek (1996) und Pusch (2000) analysiert. Das *InD*-Allel zeigt nicht nur, wie das *In*-Wildtypallel, einen inhibitorischen Effekt auf die Pigmentsynthese im Aleuron, das *InD*-Allel ist außerdem dominant gegenüber dem Wildtypallel (Abb. 1.1.2-3). Das *InD*-Allel wird durch zwei homologe Genkopien repräsentiert: *InD1* und *InD2*. Bisher konnte nur von einer der zwei *InD*-Kopien, der *InD1*-Kopie, eine vollständige cDNA-Sequenz gefunden werden (Rojek, 1996). Die Funktionsweise des Intensifiergenproduktes der verschiedenen Allele konnte bis jetzt nicht endgültig geklärt werden. Interessant ist die Tatsache, dass die putativen *In*- und *InD*-Proteine eine Homologie zu *myc*-Transkriptionsaktivatoren aufweisen. Zu den bekannten *myc*-Transkriptionsfaktoren aus Mais gehören das *R1*- und das *B*-Protein (Chandler *et al.*, 1989; Ludwig *et al.*, 1989; Consonni *et al.*, 1993). Die *myc*-Faktoren bestehen aus zwei funktionellen Domänen: einer sauren N-terminalen Transaktivierungsdomäne (220 AS, Goff *et al.*, 1992) und einer basischen DNA-Bindedomäne mit einem Helix-Loop-Helix-Motiv, das eine Proteindimerisierung vermitteln kann (Lüscher und Eisenman, 1990). Diese Domänen sind auch in dem potentiellen *InD1*-Protein enthalten.

Um die Wirkung des *InD1*-Proteins auf die Promotoren der Strukturgene und auf *C1* und *R* zu untersuchen, sollte ein *InD1*-Konstrukt gemeinsam mit den Regulatoren *R* und *C1* mit den Promotor-Reporter-Gen-Konstrukten in Maisembryonen transient cotransformiert werden (Abb. 3.5-1; 3.5.4).

Alle bei der Analyse verwendeten Effektor-Gen-Konstrukte mit den regulatorischen Genen *R*, *C1* und *InD1* (2.1.2) enthalten cDNAs, die unter der Kontrolle eines konstitutiven *pAct1*-Promotors aus Reis (McElroy *et al.*, 1990) stehen (Abb. 3.5-1). Die Termination der Transkription dieser Gene erfolgt durch den Nopalinsynthese-Terminator aus *Agrobacterium tumefaciens*.

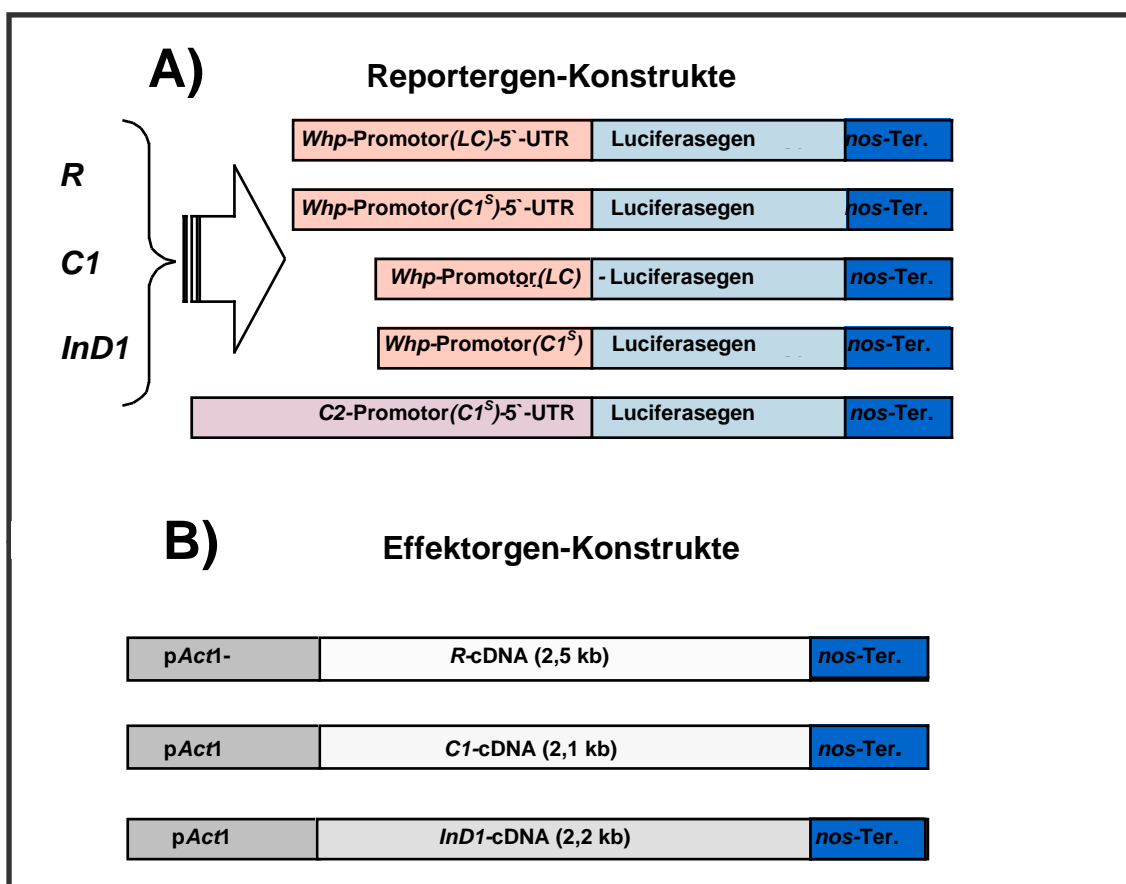


Abb. 3.5-1: Schema der für die transiente Transformation verwendeten Genkonstrukte: A) Promotorreporter-Gen-Konstrukte, B) Effektor-Gen-Konstrukte.

3.5.1 Herstellung der Promotor-Reporter-Gen-Konstrukte

Zunächst war es notwendig, die verschiedenen zu untersuchenden Promotorsequenzen in geeignete Plasmidvektoren zu klonieren. Für die

vergleichenden Experimente mit dem *Whp*-Promotor wurden sowohl Konstrukte mit dem Promotor-Fragment allein als auch Konstrukte mit dem Promotor- und dem 5'-UTR-Bereich des Gens hergestellt. Auf diese Weise sollte der Einfluß möglicher regulatoriver Elemente im 5'-UTR untersucht werden. Zur Herstellung dieser Konstrukte wurden die bei der Analyse des *Whp*-Promotors aus den Linien *C1^S* und *inc2Whp* erhaltenen Klone (Abb. 3.4-2) verwendet.

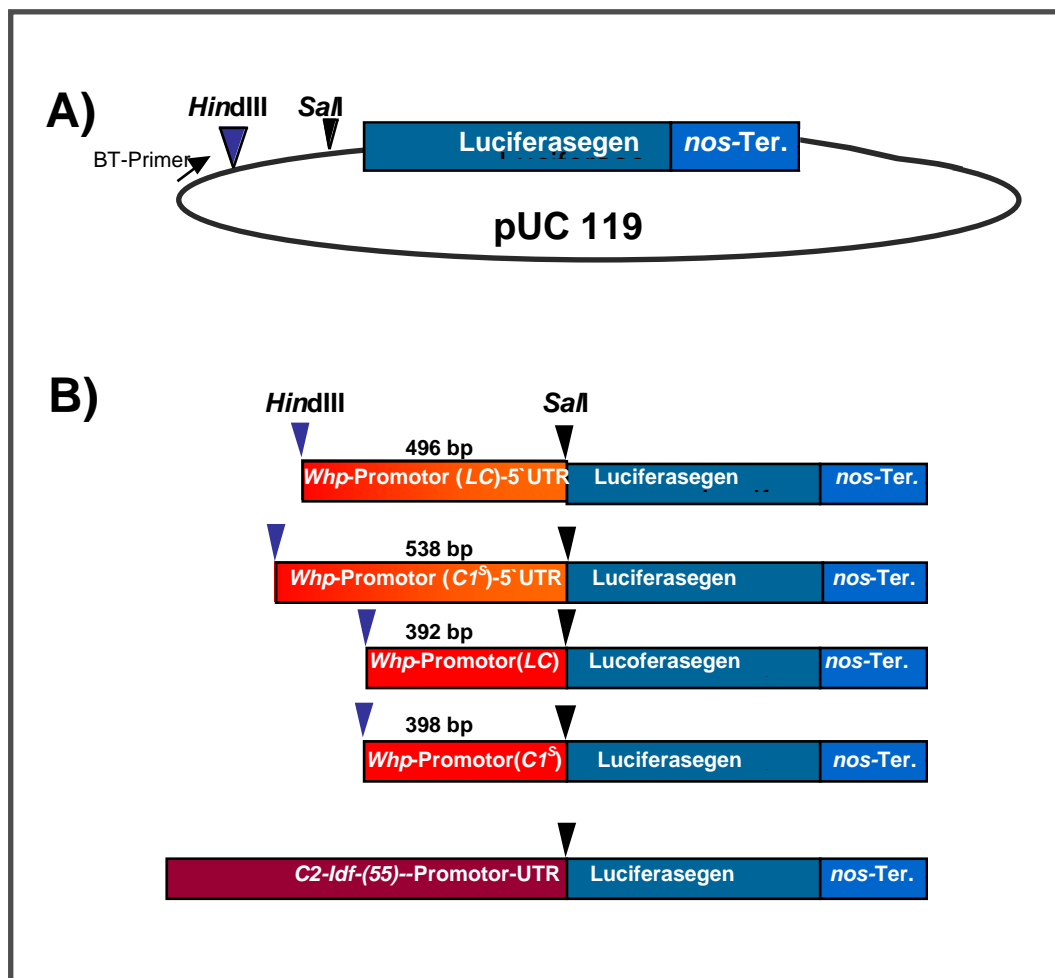


Abb. 3.5.1-1: Schematische Darstellung der Promotor-Reporter-Gen-Konstrukte. A) Basisvektor Luciferase-*nos*-Terminator-pUC119. Die bei der Konstruktion verwendeten Restriktionsschnittstellen sind gekennzeichnet. Mit einem Pfeil ist die Position des bei der Sequenzierung verwendeten BT-Primers gezeigt. **B)** Promotor-Reporter-Gen-Konstrukte: Die *Whp*-Promotor- und *Whp*-Promotor-5'-UTR-Fragmente wurden mittels PCR mit *Whp*-spezifischen Primern von der genomischen DNA der Linien *C1^S* und *inc2Whp* amplifiziert und in den pCR[®] 2.1-TOPO[®] Vektor kloniert. Die *Whp*-Promotor-5'-UTR-Fragmente wurden mit *Hind*III und *Sal*I aus dem pCR[®] 2.1-TOPO[®] Vektor herausgeschnitten und in den mit *Hind*III/*Sal*I restringierten Luciferase-*nos*-pUC119-Vektor einkloniert. Die *Whp*-Promotor-Fragmente wurden durch Restriktion mit *Xho*I aus dem pCR[®] 2.1-TOPO[®] Vektor ausgeschnitten und nach Auffüllen der Enden mit dem Klenow-Fragment der *E.coli* DNA-Polymerase I und anschließender Restriktion mit *Hind*III in den zunächst mit *Sal*I restringierten und nach Auffüllung der Enden mit *Hind*III restringierten Luciferase-*nos*-pUC 119-Vektor einkloniert. Das mit den *C2*-Promotor-5'-800/*C2-Idf*-Promotor-3' Primern amplifizierte *C2-Idf* (55)-Promotor-Fragment wurde in die

mit der Klenow-Polymerase I aufgefüllte *SalI* Schnittstelle des *Luc-nos-pUC 119* ligiert. Die Größen der Promotor-Fragmente sind in Basenpaaren (bp) angegeben.

Da der bei der Amplifikation der *Whp*-Fragmente verwendete JK3`*Whp*-40-Primer eine *SalI*-Restriktionsschnittstelle enthält, wurden die *Whp*-Promotor-5`-UTR-Fragmente (0,5 kb) aus dem pCR[®] 2.1-TOPO[®] Vektor mit *HindIII* und *SalI* herausgeschnitten und vor das Reporteragen in den mit *HindIII* und *SalI* restringierten *Luciferase-nos-pUC119* Vektor (Abb. 3.5.1-1) ligiert (2.16.4). Nach der Transformation der Ligationsansätze (2.17.1) in kompetente *E. coli* XL1-Blue Zellen wurden die erhaltenen Klone über Restriktionsanalyse mit *EcoRI* auf Inserts untersucht. Die positiven Klone wurden anschließend mit dem BT-Primer sequenziert (2.19). Die hergestellten Promotor-Reporteragen-Konstrukte sind in der Abbildung 3.5.1-1, B dargestellt.

Für den Vergleich zwischen der Promotor-Aktivität des *C2*-Gens aus dem Wildtyp mit den Promotor-Aktivitäten der beiden *C2-Idf*-Kopien (Klon 55 und Klon *Qb*) wurde versucht, entsprechende Promotor-Reporteragen-Konstrukte zu klonieren. Dafür wurden zunächst *C2*- und *C2-Idf*-Promotor-Fragmente unterschiedlicher Länge (1,8, 1,4 und 1,0 kb) aus den entsprechenden Plasmid-DNAs (p 108, p 55, p *Qb*) amplifiziert. Leider war die Amplifikation des *C2-Idf*-Promotors des Klons *Qb*, vermutlich aufgrund des inserierten *CACTA*-Elementes, nicht erfolgreich.

Die aus dem p 108 (*C2*-Wildtyp) und aus dem p 55 (*C2-Idf*-Kopie-55) erhaltenen Amplifikate wurden dann mit verschiedenen Klonierungsstrategien vor das Luciferasegen ligiert. Die Ligationsansätze wurden nach der CaCl_2 -Methode durch Elektrotransformation (2.17.1 und 2.17.2) in *E. coli* XL1-Blue transformiert. Nach mehrmals wiederholten Transformationsversuchen konnte nur eine geringe Zahl Bakterienkolonien erhalten werden, von denen nur ein positiver Klon isoliert werden konnte. Dieser Klon enthält das mittels einer PCR (2.13.1) mit den Primern *C2*-Promotor-5`-800/*C2-Idf*-Promotor-3` aus der *C2-Idf*-Genkopie 55 (Plasmid p 55) amplifizierte 1 kb-Promotor-Fragment, das „blunt end“ in die *SalI*-Schnittstelle des Expressionsvektors vor dem Luciferasegen ligiert wurde (3.5.1-1).

Da bei diesen Klonierungen nur ein *C2-Idf*-Promotor-Reporter-Gen-Konstrukt der Genkopie 55 hergestellt wurde, konnten die geplanten vergleichenden Promotor-Analysen der beiden *C2-Idf*-Promotoren miteinander und mit dem Wildtyp nicht durchgeführt werden. Allerdings wurde das *C2-Idf*-Promotor-(55)-Luc-Konstrukt hinsichtlich seiner Promotor-Aktivität trotzdem in den transienten Expressionsstudien untersucht (3.5.2).

3.5.2. Analyse der Promotor-Aktivität der *C2-Idf*-Kopie 55

Aufgrund der molekularen Untersuchungen der *C2-Idf*-Mutante (Borchert, 1998; 3.2.3) ist zu vermuten, dass die Promotorsequenzen von zwei der drei *C2-Idf*-Genkopien (55 und die unbekannte dritte Genkopie) nur wenig von der Promotorsequenz des *C2*-Wildtyps abweichen. Jedoch konnten in der Expressionsanalyse der *C2-Idf*-Linie keine oder nur sehr wenig *C2*-spezifische Transkripte nachgewiesen werden (Abb. 3.1-2). Da die Genkopie 55 im Exon 2 ein Retroelement vom *PREM-2*-Typ enthält, können von dieser Kopie vermutlich keine vollständigen Transkripte synthetisiert werden. Der Promotor dieser Genkopie unterscheidet sich jedoch nur wenig vom Promotor des Wildtyps (Abb. 4.1-2).

Im Promotor des *C2*-Wildtyps liegen Sequenzelemente vor, die für die Genexpression essentiell sind. Zu solchen Sequenzelementen gehören sowohl UV-Boxen (Schulze-Lefert *et al.*, 1989) als auch Erkennungssequenzen für *myc*- und *myb*-homologe Transkriptionsfaktoren. Diese Sequenzelemente stellen potentielle Bindestellen für die Produkte des *C1*- und *R*-Gens dar. Bislang konnte jedoch eine direkte Interaktion dieser Proteine mit dem *C2*-Promotor nicht gezeigt werden. In dem Promotor- und in dem 5'-UTR-Bereich der *C2-Idf*-Kopien (Klone *Qb* und 55) kommen Sequenz-Änderungen gegenüber der *C2*-Wildtyp-Sequenz vor (Borchert, 1998). Obwohl diese Änderungen in dem Promotor der beiden *C2-Idf*-Kopien die oben genannten Sequenzelemente nicht verändern, können sie möglicherweise die Expression des *C2-Idf*-Alles beeinflussen. Der Promotor der dritten bislang unbekanntes Kopie scheint strukturell eher dem Promotor der Genkopie 55 zu entsprechen. Da bislang keine Beweise für starke strukturelle Veränderungen in

dieser dritten Genkopie vorliegen, kann eine Analyse des *55*-Promotors neue experimentelle Ansatzpunkte hinsichtlich einer möglichen Promotor-Aktivität der dritten Genkopie liefern.

Um der Frage nachzugehen, ob der Promotor der *C2-Idf-(55)*-Kopie funktionsfähig ist und durch die regulatorischen Proteine *C1* und *R* induzierbar ist, wurde das *C2-Idf-(55)*-Luc-*nos*-Genkonstrukt (Abb. 3.5.1-1) in verschiedene Mais-Gewebe transient transformiert. Für erste Experimente wurde Kallusgewebe eingesetzt.

Das *C2-Idf-(55)*-Promotor-Luciferasegen-Konstrukt wurde zusammen mit den unter Kontrolle des *Actin1*-Promotors aus Reis stehenden regulatorischen Genen *C1* und *R* (*pAct-C1-nos* und *pAct-R-nos*, Abb. 3.5-1) in Kalluszellen aus Kreuzungen der Linien B73 x A188 cotransformiert (2.20.2 und 2.20.3). Der *Actin*-Promotor führt zu einer starken konstitutiven Expression der Gene *C1* und *R*. Als positive Kontrolle wurde parallel ein *35S*-Luc-*nos*-Konstrukt transformiert. Da die Expression der Gene der Anthocyanbiosynthese durch Licht induziert wird (Taylor und Briggs, 1990), wurden die Probe nach dem Beschuss 30 bis 40 h bei Licht kultiviert. Nach der Kultivierung wurden Luciferase-Assays mit den aus den Geweben gewonnenen Zellextrakten (2.20.4) durchgeführt (2.21.1).

In den Luciferase-Assays konnte die Reportergen-Aktivität sowohl bei dem *C2-Idf-(55)*-Luc-Konstrukt als auch bei dem *35S*-Luc-*nos*-Konstrukt nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Dies deutet darauf hin, dass der *C2-Idf-(55)*-Promotor durch die Regulatoren *C1* und *R* aktiviert werden kann. Allerdings war die Expressionstärke des Reportergens in den verschiedenen Parallelansätzen der Experimente sehr unterschiedlich, so dass über die Expressionsstärken der verwendeten Konstrukte keine Aussagen gemacht werden können (Daten nicht gezeigt). Möglicherweise liegt dies daran, dass die Zellen einer Kalluskultur hinsichtlich ihres Alter und ihrer Qualität nicht homogen sind (R. Brettschneider, Universität Hamburg, persönliche Mitteilung). Aufgrund der starken Streuung der Messwerte scheint dieses Gewebe für diese Form der Expressionsanalysen nicht geeignet zu sein.

Im weiteren Verlauf der Experimente wurden deshalb Mais-Blätter und Mais-Embryonen als zu testendes Gewebe ausgewählt.

Die Blattspitzen von ca. 2,5 cm Länge wurden von Keimlingen des Wildtyps direkt vor der Transformation abgeschnitten, auf 0,7% Wasser-Agar in Petrischalen aufgelegt und mit dem Promotor-Konstrukt und einem oder beiden Konstrukte mit den Regulatorgenen *C1* und *R* cotransformiert (2.20.3). Danach erfolgte die Kultivierung der Blattsegmente, die Protein-Extraktion (2.20.4) und die Bestimmung der Reporter-gen-Aktivität wie zuvor für die Kallusgewebe beschrieben (2.21.1).

Für die Transformation der Promotor-Reporter-gen-Konstrukte in Embryonen wurden unreife Mais-Embryonen (15 bis 20 Tage nach der Pollinierung) der Mais-Inzuchtlinie A188 isoliert und einer vier bis fünf stündigen osmotischen Vorbehandlung unterzogen (2.20.1). Nach der osmotischen Vorbehandlung wurden die Mais-Embryonen mit den selben Promotor-Reporter-gen-Konstrukten wie bei der Transformation von Blattspitzen transformiert. Die Embryonen wurden nach dem Beschuss wie beschrieben inkubiert und die Gewebeextrakte in einem Assay auf vorhandene Luciferase-Aktivität untersucht.

Die Ergebnisse des enzymatischen Aktivitätstests zeigen (Abb. 3.5.2-1), dass der 35S-Promotor nur sehr schwach in Blättern aktiv ist und das Luciferasegen unter Kontrolle des *C2-Idf-(55)*-Promotors in Verbindung mit den transient exprimierten Regulatoren *C1* und *R* gar nicht in Maisblättern exprimiert wird. Die relativen Luciferase-Aktivitäten sind in der Abbildung 3.5.2-1 als grüne Balken dargestellt. Dementsprechend erwiesen sich die Maisblätter für diese transienten Experimente zur Promotor-Aktivität ebenfalls als ungeeignet.

Die Ergebnisse des Luciferase-Aktivitätstests der Promotor-Reporter-gen-Konstrukte in Embryonen sind in der Abbildung 3.5.2-1 als gelbe Balken dargestellt.

Im Unterschied zu der gemessenen Luciferase-Aktivität in Maisblättern sind die Luciferase-Aktivitäten des 35S-Testkonstruktes in Embryonen wesentlich höher. Ausserdem wurde eine starke Promotor-Aktivität des *C2-Idf-(55)*-Promotors festgestellt. Die Aktivierung des *C2-Idf-(55)*-Promotors ist von der Anwesenheit sowohl des *C1*- als auch des *R*-Gens abhängig. Auch das *R*-Genprodukt allein

scheint, im Gegensatz zu dem *C1*-Genprodukt allein, in der Lage zu sein eine geringe Expression des Reportergens zu induzieren.

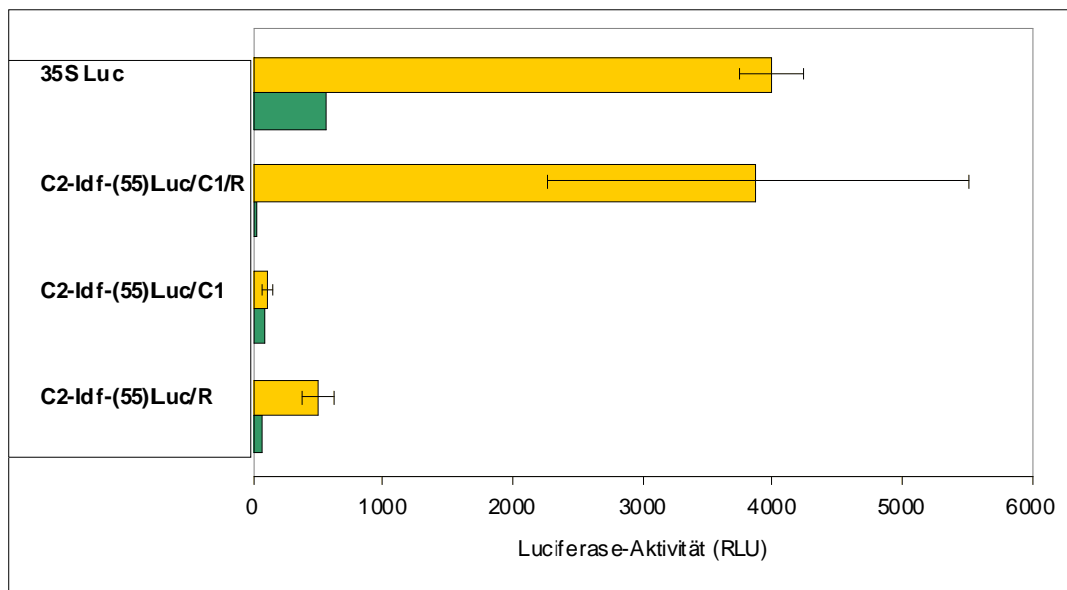


Abb. 3.5.2-1: Relative Mittelwerte der Luciferase-Aktivität nach transienter Transformation von Promotor-Luc-nos-Konstrukten in Blattspitzen und in Embryonen der Mais-Inzuchtlinie A188.

Das 35S-Promotor-Luc-nos-Konstrukt (35S-Luc), das *C2-Idf-(55)*-Promotor-Luc-nos-Konstrukt (*C2-Idf-(55)*-Luc), das pAct-*C1*-Konstrukt (*C1*) und das pAct-*R-nos*-Konstrukt (*R*) wurden in verschiedenen Kombinationen mittels biolistischer Transformation in Blattspitzen (*LC*) oder in Embryonen der Maislinie A188 cotransformiert. Nach der Kultivierung von 30 bis 40 h bei Licht/Dunkel-Wechsel (16/8 h) wurden aus den Geweben Zellextrakte gewonnen und diese in Luciferase-Assays eingesetzt. Dargestellt sind die Mittelwerte der relativen Luciferase-Aktivität (RLU) mit den Standardabweichungen aus je vier Parallelansätzen. Die grünen Balken zeigen die Luciferase-Aktivität der Promotor-Reporter-Konstrukte in Blattspitzen und die gelben Balken die Luciferase-Aktivität in Embryonen. Die verwendeten Genkonstrukte sind neben den Balken angegeben.

Die Ergebnisse der Aktivitätsanalyse des *C2-Idf-(55)*-Promotors zeigen, dass der Promotor einer der drei *C2-Idf*-Kopien (des Klons 55) durch die gemeinsame Expression des *C1*- und *R*-Genproduktes aktiviert wird und die Transkription des Luciferase-Reportergens in einer mit dem 35S-Promotor vergleichbaren Weise initiiert wird.

Da gezeigt werden konnte, dass der *C2-Idf-(55)*-Promotor durch die Regulatoren *C1* und *R* induziert werden kann, wurde dieses Konstrukt in die weiteren Analysen zur Wirkung von regulativen Genen auf die Promotoren der Strukturgene einbezogen (3.5-4).

Weiterhin wurde in diesem Experiment die unterschiedliche Eignung der verschiedenen Mais-Gewebe für transiente Transformationsexperimente festgestellt. Beim Vergleich der Reporter-gen-Aktivitäten der gleichen Genkonstrukte zwischen den drei getesteten Geweben (Kalli, Blattspitzen und Embryonen) erwiesen sich Embryonen als am besten geeignetes Gewebe für die durchzuführenden Promotorstudien. Allerdings hat die Verwendung dieses Gewebes einige Nachteile: z.B. ist der Zeitaufwand für die Isolierung und Vorkultivierung der Embryonen sehr groß. Aufgrund der sehr geringen Oberfläche müssen acht bis zehn Embryonen gemeinsam für eine Transformation eingesetzt werden und die Wahrscheinlichkeit, dass ein Teil der verwendeten DNA nicht die Zielprobe trifft, ist ziemlich groß. Deshalb sind Schwankungen der Luciferase-Aktivitäten zwischen Parallelansätzen denkbar. Als Vorteile sind das definierte Alter und die Homogenität der Embryonen zu nennen, da diese von demselben Maiskolben stammen können, wenn eine ausreichende Menge an Material verfügbar ist. Aufgrund der Ergebnisse der Voruntersuchungen wurden bei allen weiteren Promotorstudien Embryonen verwendet.

3.5.3 Vergleich der Aktivitäten der *Whp*-Promotoren aus den Genotypen *C1^S* und *LC* (Wildtyp)

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Expressionsuntersuchungen des *Whp*-Gens in verschiedenen Maislinien zeigen eine deutlich stärkere Expression dieses Gens in der Linie *C1^S* (3.1, Abb. 3.1-2, Spur 7). In den molekularen Analysen konnten daraufhin auch Sequenzunterschiede zwischen den beiden Linien im Promotor-Bereich und im 5'-UTR-Bereich dieses Gens gefunden werden (3.4, Abb. 3.4-3). Um zu untersuchen, ob diese Unterschiede im Promotor- und 5'-UTR-Bereich des *Whp*-Gens aus der Linie *C1^S* mit verantwortlich für die verstärkte Expression dieses Gens sind, wurden diese Sequenzbereiche in transienten Assays hinsichtlich ihrer *C1*- und *R*-abhängigen Transkriptionsaktivität untersucht und mit dem Wildtyppromotor verglichen. Dazu wurden die zuvor erstellten (3.5.1) Reporter-gen-Konstrukte (Abb. 3.5.1-1) in Maisembryonen nach der Methode von Brettschneider *et*

al. (1997) transformiert. Um den Einfluß des rezessiven *in*-Allels sowie des dominanten *In*-Allels auf die Promotor-Aktivität zu untersuchen, wurden neben Embryonen der Wildtypelinie *LC (InInC2C2WhpWhp)* auch Embryonen der Linie *ininc2C2whpwhp* (Ac 3484) für diese Experimente eingesetzt.

Die Maisembryonen wurden 15-20 Tage nach der Bestäubung aus den unreifen Körnern isoliert und nach der osmotischen Behandlung (2.20.1) mit den Promotor-Reporter-Gen-Konstrukten (Abb. 3.5-1 und 3.5.1-1) in unterschiedlichen Kombinationen biolistisch in 3-8 Parallelansätzen transformiert (2.20.2, 2.20.3). Zusätzlich zu den Promotor-Reporter-Gen- und Effektor-Gen-Konstrukten wurde in jedem Ansatz das 35S-Gus(Glucuronidase)-*nos*-Plasmid cotransformiert. Dieses sollte als interne Kontrolle zur Standardisierung der Transformationseffizienz dienen. Um die Ergebnisse aus unabhängigen Experimenten miteinander vergleichen zu können, wurde in jedem Experiment auch das 35S-Luciferase-*nos*-Plasmid transformiert. Die Inkubation der Embryonen erfolgte wie zuvor beschrieben (3.5.2) Zum Nachweis der Reporter-Gen-Aktivität wurden aus den transformierten Embryonen Proteinextrakte hergestellt (2.20.4) und mit diesen die Luciferase- und β -Glucuronidase-Assays (2.21) durchgeführt.

Die Auswertung der erhaltenen Werte der Luciferase-Aktivität erfolgte auf zwei verschiedenen Wegen (2.21.1): einerseits als Luc/Gus Verhältnisse und relativ prozentual zum 35S-Luc-Konstrukt (= Luc/Gus) sowie andererseits nur als relative Luciferase-Aktivität prozentual zum 35S-Luc-Konstrukt (= Luc). In beiden Ansätzen wurde dazu der Wert für das Referenzkonstrukt 35S-Luc gleich 100% gesetzt. Durch zwei unterschiedliche Auswertungsverfahren sollten experimentell bedingte Schwankungen leichter erkannt werden.

Die Ergebnisse verschiedener unabhängiger Experimente wurden bei beiden Berechnungsverfahren ebenfalls gemittelt und es wurde die Standardabweichung der Mittelwerte mit einem Kalkulationsprogramm (Microsoft Excel) errechnet.

Bei der Auswertung der Luciferase-Aktivitäten nach der Transformation in die zwei verschiedenen Mais-Linien *Lc* und *in/in,C2/c2,whp/whp* wurde in keinem Fall ein Einfluss des genetischen Hintergrundes auf die Expression des Reporter-Genes

beobachtet. Deshalb wurden die aus den Transformationsexperimenten der beiden Linien erhaltenen Messdaten nachfolgend zusammengefasst ausgewertet.

Jedes Experiment wurde in zehn unabhängigen Transformationsreihen mit jeweils drei bis acht Parallelansätzen pro Konstrukt-Kombination durchgeführt. Die Auswertung der Experimente ist in der Abbildung 3.5.3-1 dargestellt. Die auf zwei Wegen ausgewerteten Daten zeigten für alle Konstrukte die gleiche Tendenz. Deshalb sind in der Abbildung 3.5.3-1 nur die Luc/Guc-Daten dargestellt.

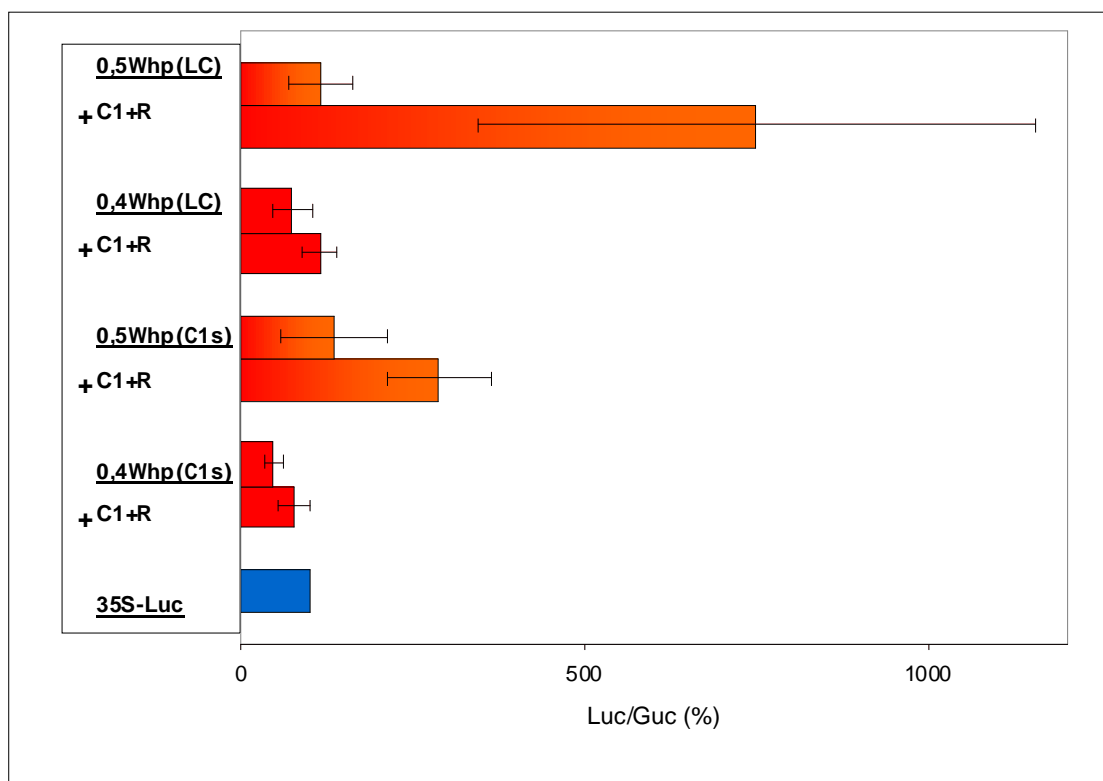


Abb. 3.5.3-1: Luciferase-Aktivität in Maisembryonen nach transientser Transformation mit *Whp*-Promotor- und *Whp*-Promotor-5'-UTR-Reporter-Gen-Konstrukten. Die vor das Luciferasegen klonierten *Whp*-Promotor- (0,4 *Whp*) und *Whp*-Promotor-5'-UTR-Bereiche (0,5 *Whp*) aus den Linien *C1^S* und Wildtyp (*LC*) wurden in Maisembryonen der Linie *LC* (15 – 20 Tage nach Pollinierung) allein oder zusammen mit den unter Kontrolle des *Actin*-Promotors stehenden regulatorischen Genen *R* und *C1* transient transformiert. Außerdem wurde in allen Ansätzen ein 35S-Gus-Konstrukt als interne Kontrolle eingesetzt. Nach einer Inkubationszeit von 30 h bei Licht/Dunkel (16/8h) und 24°C wurden die Reporter-Gen-Aktivitäten durch Luc- und Gus-Enzymassays bestimmt. Dargestellt sind die Ergebnisse aus zehn unabhängigen Transformationsexperimenten mit jeweils drei bis acht Parallelansätzen mit jedem Konstrukt. Angegeben ist der Quotient aus der relativen Luciferase-Aktivität und der relativen Gus-Aktivität in Prozent, bezogen auf die gleich 100% gesetzte relative Luc/Guc-Aktivität eines 35S-Luc-Konstruktes (blau). Zur Ermittlung der Hintergrundaktivität wurde in einem Experiment Gold ohne Plasmid-DNA transformiert und die in den Assays gemessene Aktivität vor der Auswertung von allen Meßwerten abgezogen. Bei allen Aktivitäten sind die Standardfehler der arithmetischen Mittel angegeben.

Die transienten Expressionsstudien zeigen, dass der *Whp*-Promotor-Bereich mit der 5'-UTR-Region aus beiden Linien eine signifikante Expressionsinduktion des Reportergens vermittelt, wenn das *C1*- und das *R*-Gen coexprimiert werden (Abb. 3.5.3-1; 0,5 *Whp*). Diese Induktion erfolgt nicht, wenn nur der Promotor-Bereich verwendet wird (Abb. 3.5.3-1; 0,4 *Whp*). Offensichtlich sind Sequenzelemente im 5'-UTR-Bereich für eine Expression des Reportergens in diesem Testsystem notwendig. Interessanterweise ist die *C1* und *R* vermittelte Reporter-gen-Induktion mit dem *Whp*-Promotor aus der *C1^S*-Linie bei beiden Konstrukten deutlich niedriger als mit dem Wildtyp-Promotor. Diese Daten stehen in direktem Gegensatz zu den Ergebnissen der RT-PCR Experimente (3.1).

Die Transformationsergebnisse zeigen, dass die Expression des *Whp*-Gens sowie auch die Expression des *C2*-Gens (3.5.2-1), zumindest zum Teil einer Regulation durch das *C1*- und das *R*-Genprodukt unterliegen. Außerdem konnte ein Einfluß des *Whp*-5'-UTR-Bereiches auf die Expressionsstärke des Reportergens festgestellt werden.

3.5.4 Untersuchungen zur Wirkung des *InD1*-Proteins auf die Promotoren der Strukturgene *C2-Idf-(55)*, *Whp* und *A1*

Das Intensifizieren übt einen reprimierenden Einfluß auf die Anthocyanbiosynthese aus (1.1.2). Bislang ist unklar, auf welcher Ebene der Genregulation und auf welche Weise dieser Einfluß ausgeübt wird. Deshalb sollte die Wirkung des Intensifizierproteins auf die Promotoren verschiedener Strukturgene der Anthocyanbiosynthese untersucht werden. Dazu wurde die cDNA der *InD1*-Genkopie des *InD*-Allels, die für ein vollständiges Intensifizierprotein kodiert, unter Kontrolle des *Actin*-Promotors mit verschiedenen Promotor-Reporter-gen-Konstrukten in Maisembryonen transient transformiert (Abb. 3.5-1). Das *InD*-Allel und sein Genprodukt sind deshalb von besonderem Interesse, da dieses Allel, ähnlich wie das *C2-Idf*-Allel einen dominanten Dosis-effekt auf das Wildtypallel ausübt (1.1.2).

Bei den Analysen wurden Promotoren der Strukturgene *C2-Idf-(55)*, *A1* und *Whp* verwendet (Abb. 3.5.1-1 und 3.5.4-1). Die Reporter-gen-Konstrukte mit den Promotoren der beiden Chalkonsynthasegene sind in der Abbildung 3.5.1-1 gezeigt. Ein *A1*-Promotor-Luciferasegen-Konstrukt (p 179) wurde freundlicherweise von A. Schrell (Universität Köln, 1991) zur Verfügung gestellt. Dieses Konstrukt ist schematisch in der Abbildung 3.5.4-1 dargestellt. In dem Konstrukt p 179 ist zwischen dem *A1*-Promotor (1,758 kb) und dem Luciferasegen außerdem ein Enhancer-Element integriert, das die Genexpression in Monokotyledonen um das 100-fache steigert (Maas *et al.*, 1991; Callis *et al.*, 1987). Dieser Enhancer ist ein 1,1 kb großes Exon1-Intron1-Fragment des *Shrunken-1*-Gens aus Mais.

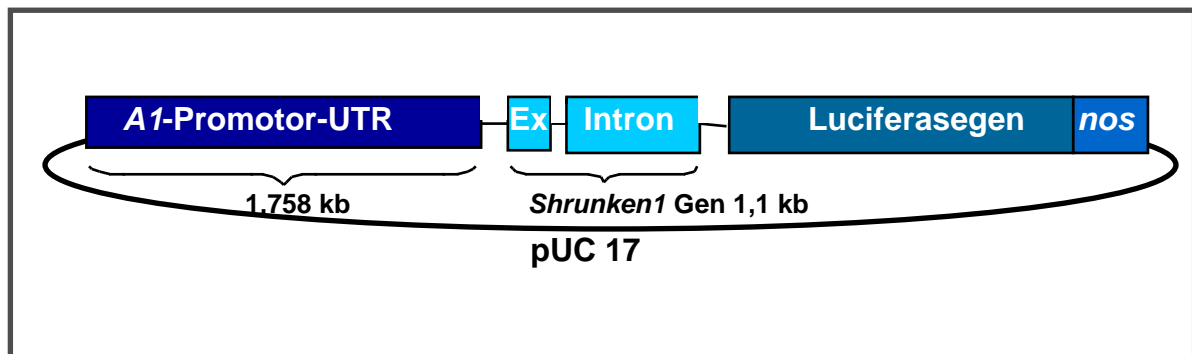


Abb. 3.5.4-1: Schematische Darstellung des für transiente Transformationen verwendeten A1-Luc-nos-Konstruktes (Schrell, Universität Köln, 1991). Das *A1*-Promotor-Reporter-gen-Konstrukt besteht aus dem 1,758 kb großen Promotor-5'-UTR-Fragment des *A1*-Gens aus Mais, dem 1,1 kb großen Exon1-Intron1-Fragment des *Shrunken* Gens aus Mais (Maas *et al.*, 1991) und dem kodierenden Bereich des Luciferasegens aus der Feuerfliege (*Photinus pyralis*), welches mit dem *nos*-Terminator (Nopalinsynthase-Terminator) aus *Agrobacterium tumefaciens* fusioniert wurde.

Bei der Cotransformation wurden die oben genannten Promotor-Reporter-gen-Konstrukte gemeinsam mit den in verschiedenen Kombinationen (Tab. 2.20.2-1) eingesetzten Effektor-gen-Konstrukten *C1*, *R* und *InD1* in Mais-Embryonen transformiert, um folgenden Fragestellungen nachzugehen:

- Das Intensifierprotein weist eine ähnliche Struktur wie die *myc*-Proteine auf, zu denen auch das *R*-Protein gehört. Es soll untersucht werden, ob das Intensifierprotein *InD1* des *InD*-Allels eine Aktivierung des Reporter-gens aufgrund seiner Homologie zu *myc*-Transkriptionsfaktoren hervorgerufen kann.

- Um zu untersuchen, ob das *InD1*-Genprodukt das *R*-Genprodukt ersetzen kann und auf diese Weise zusammen mit dem *C1*-Genprodukt eine Induktion der verwendeten Promotoren auslösen kann, wurde das *InD1*-Gen zusammen mit einem der zwei regulatorischen Gene *R* und *C1* sowie den verschiedenen Promotor-Reporter-Gen-Konstrukten transient zur Expression gebracht.
- Um zu analysieren, ob und wie das *InD1*-Protein die durch das *R* und das *C1*-Protein ausgelöste Aktivierung der Reporter-Genexpression beeinflusst, wurden alle drei Effektorgene gemeinsam mit verschiedenen Promotor-Reporter-Gen-Konstrukten cotransformiert.

Die Cotransformationen der Mais-Embryonen aus den Linien *LC* und *Ac 3484 (ininC2c2whpwhp)*, die Kultivierung der Embryonen nach der Transformation und die anschließende Bestimmung der Reporter-Gen-Aktivitäten erfolgten wie in 2.20 und 2.21 beschrieben. Die Werte der Luciferase-Aktivitäten wurden in mindestens zehn unabhängigen Transformationsexperimenten mit jeweils drei bis acht Parallelansätzen ermittelt und für jede getestete Konstrukt-Kombination auf zwei unterschiedlichen Wegen wie zuvor beschrieben (3.5.3) ausgewertet. Die Ergebnisse der Luciferaseexpression sind nachfolgend separat für jedes Promotor-Reporter-Gen-Konstrukt in Balkendiagrammen dargestellt (Abb. 3.5.4-2, Abb. 3.5.4-3), obwohl in den Transformationsexperimenten mehrere Promotor-Reporter-Gen-Konstrukte parallel analysiert wurden (Anhang 7).

Da die auf zwei verschiedenen Wegen ausgewerteten Daten der Luciferase-Aktivitäten (Luc- und Luc/Gus-Werte) mit den *Whp*-Promotor- und den *C2-Idf-(55)*-Promotor-Reporter-Gen-Konstrukten gleiche Tendenzen zeigen, sind die Ergebnisse für diese Konstrukte nur in Form der relativen prozentualen Luc/Gus-Werte gezeigt (3.5.4-2, A und B). Bei der Auswertung der Luciferase-Aktivitäten des *A1*-Promotor-Reportergens wurden im Gegensatz dazu deutliche Unterschiede bei beiden Auswertemethoden erhalten. Deshalb sind für diesen Promotor beide Auswertungen abgebildet (3.5.4-3, A und B).

Alle Daten der in dieser Arbeit durchgeführten Transformationsexperimente sind außerdem im Detail im Anhang 7 tabellarisch angegeben.

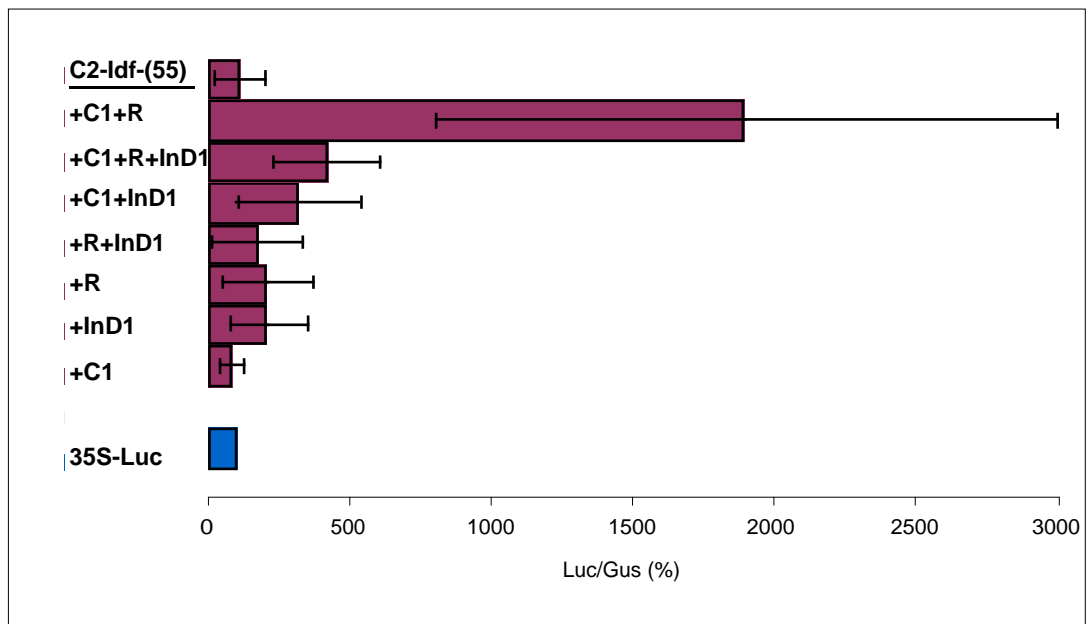
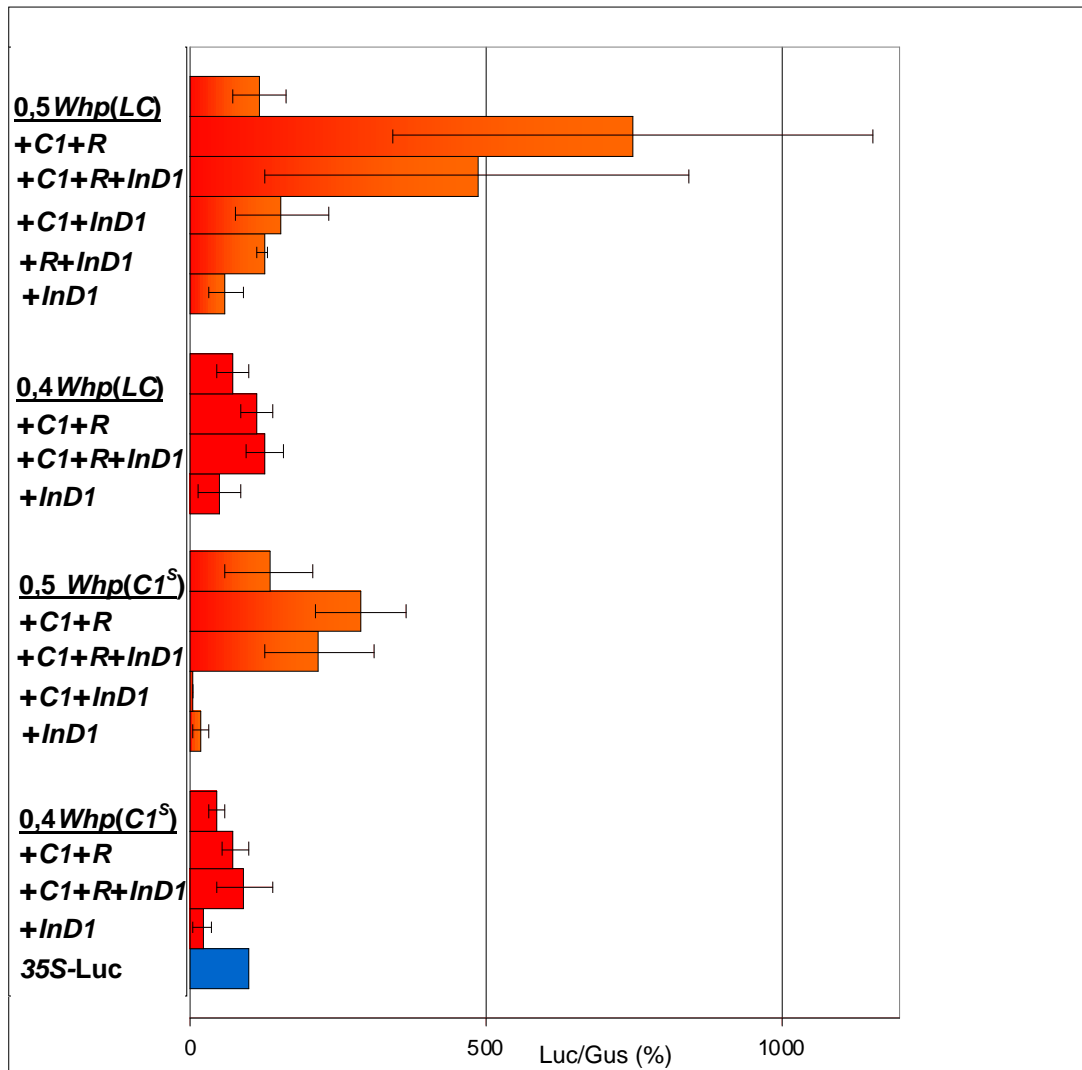
Bei allen untersuchten Promotor-Reporter-Gen-Konstrukten wurde eine Induzierbarkeit bzw. Grundaktivität auch ohne Cotransformation der Effektorgene festgestellt. Diese Aktivität ist möglicherweise auf die Wirkung der im Scutellum vorkommenden Transkriptionsfaktoren zurückzuführen.

Anhand der Transformationsexperimente, die in der Abbildung 3.5.4-2, A, B dargestellt sind, ist festzustellen, dass die untersuchten *C2-Idf-(55)*- und *Whp*-Promoter-Reporter-Gen-Konstrukte eine vergleichbare Regulation mit den drei eingesetzten Effektoren *C1*, *R* und *InD1* zeigen:

Bei Coexpression des *C1* und des *R* Gens weisen die meisten der untersuchten Promotor-Reporter-Gen-Konstrukte eine Luciferase-Aktivität und damit eine Induktion der Promotoren auf. Die bei der Analyse verwendeten Promotoren sind hinsichtlich der Stärke ihrer Induzierbarkeit durch die *C1* und *R* Genprodukte jedoch sehr unterschiedlich. Der Grad der Promotorinduzierbarkeit kann aufsteigend in folgender Reihenfolge eingeordnet werden: das 400 bp Promotor-Fragment des *Whp*-Gens, das 500 bp Promotor-Fragment des *Whp*-Gens mit dem 5'-UTR-Bereich und das 1,0 kb Fragment des *C2-Idf-(55)*-Promotors (Abb. 3.5.4-2, A, B). Dabei konnte mit dem 400 bp Promotor-Fragment des *Whp*-Gens im Vergleich zu dem Experiment ohne die Effektoren *C1* und *R* keine signifikante Induktionssteigerung festgestellt werden.

(Abbildung folgende Seite)

Abb. 3.5.4-2: Luciferase-Aktivitäten der *Whp*- und *C2-Idf-(55)*-Promotor-Reporter-Gen-Konstrukte nach transients Transformation in Mais-Embryonen. Die *Whp*- und *C2-Idf-(55)*-Promotor-Reporter-Gen-Konstrukte wurden allein oder in Kombination mit den Effektorgenen (*pAct-C1*, *pAct-R* und *pAct-InD1*) transient in Mais-Embryonen (18-20 DAP) transformiert. Nach der Transformation wurden die Embryonen bei L/D 16/8 h für 30 bis 40 h kultiviert. Aus den Embryonen wurden Proteinextrakte hergestellt und Luc- und Gus-Assays durchgeführt. In **A**) sind die Luciferase-Mittelwerte der *Whp*-Promotor-5'-UTR- und *Whp*-Promotor-Reporter-Gen-Konstrukte aus zehn unabhängigen Transformationsexperimenten mit jeweils drei bis acht Parallelansätzen dargestellt (siehe auch Abb. 3.5.3-1). Angegeben sind die relativen Luc/Gus-Werte prozentual gegenüber der gleich 100% gesetzten Positivkontrolle *35S-Luc-nos* (Luc/Gus). Das Diagramm **B**) zeigt die Mittelwerte der Luciferase-Aktivitäten des *C2-Idf-(55)*-Promotor-Luc-Genkonstruktes aus acht unabhängigen transienten Transformationen mit jeweils drei bis vier Parallelansätzen. Auswertung der Daten wie unter A).



Bei Coexpression der drei Effektorgene *C1*, *InD1* und *R* ist die Induzierbarkeit des Reportergens, gemessen als Luciferase-Aktivität bei den Experimenten mit dem 0,5 kb *Whp*- und dem *C2-Idf-(55)*-Promotor-Fragment reduziert. Die Inhibition beträgt verglichen mit den Experimenten ohne *InD1* bis zu 70% (Abb. 3.5.4-2).

Bei den Luciferasewerten des 0,5 *Whp(LC)*-Promotor-Reportergen-Konstruktes, das mit den *C1/R*- und *C1/R/InD1*-Konstrukten cotransformiert wurde, ist der Standardfehler des arithmetischen Mittels sehr groß. Ursache hierfür ist, dass in den unabhängigen Transformationsexperimenten die absolute Luciferase-Aktivität bei gleicher Kombination der Genkonstrukte im Vergleich zum 35S-Luc-Konstrukt sehr unterschiedlich war. Allerdings konnte in den einzelnen Experimenten immer eine vergleichbare Tendenz der Luciferaseexpression bei allen untersuchten Promoter-Reportergen-Konstrukten beobachtet werden (Anhang 7). Ob die unterschiedliche Intensität der Luciferase-Aktivität aus unabhängigen Experimenten auf die Qualität des verwendeten Gewebes oder auf die Transformations- oder auch Verarbeitungsbedingungen zurückzuführen ist, konnte nicht geklärt werden. Mit dem 0,4 kb *Whp*-Fragment ohne 5'-UTR konnte durch zusätzliche Expression des *InD1* keine signifikante Reduktion der Promotor-Aktivität beobachtet werden. Allerdings ist bereits mit *C1* und *R* ohne *InD1* keine signifikante Induzierbarkeit dieses Promotor-Bereiches festzustellen (siehe oben).

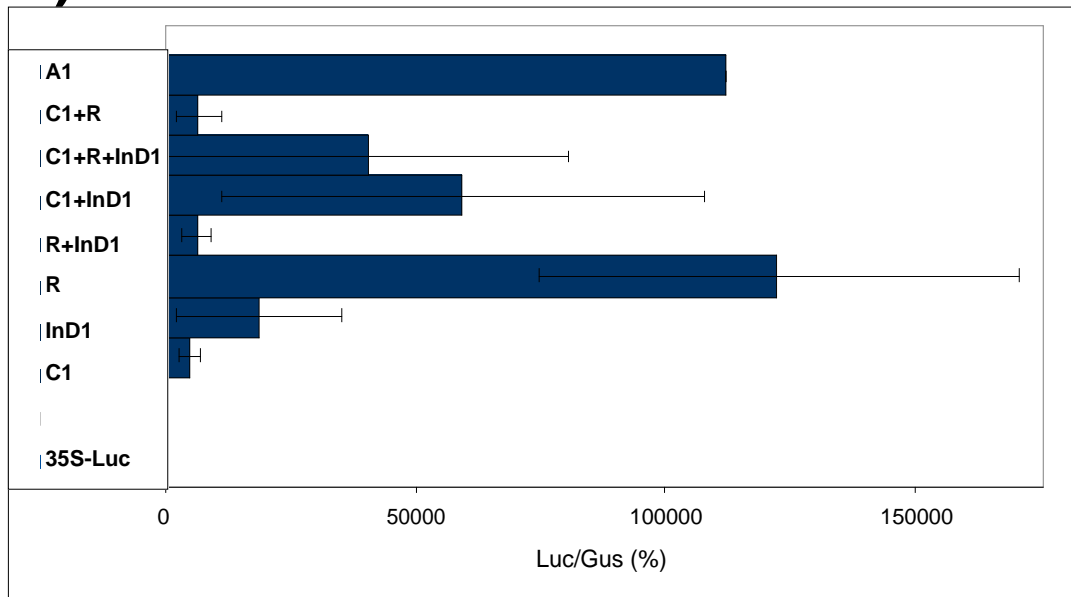
Bei den Experimenten zur Fragestellung, ob das *InD1*-Genprodukt das *R*-Genprodukt im Komplex mit dem *C1*-Genprodukt ersetzen kann, konnten aufgrund der großen Streuung der Daten keine eindeutigen Ergebnisse erzielt werden. In keinem der Experimente konnte jedoch eine höhere Promotor-Aktivität als mit der Kombination *C1/R* festgestellt werden. Das *InD1*-Genprodukt scheint nicht in der Lage zu sein, allein eine Aktivierung der getesteten Promotoren hervorzurufen, da in keinem Fall eine über der Grundaktivität (ohne Effektor-Konstrukte) liegende Reportergen-Aktivität gemessen wurde.

Die mit dem 0,5 *Whp(C1^S)*- und 0,5 *Whp(LC)*-Promotor-Reportergen-Konstrukt erhaltene „Grundaktivität“ des Reportergens scheint sich sogar zu

reduzieren, wenn diese Konstrukte mit dem *InD1*-Genkonstrukt cotransformiert werden (Abb. 3.5.4-2, A). Möglicherweise übt das *InD1*-Protein einen inhibierenden Einfluss auf den *Whp*-Promotor-5'-UTR-Bereich aus. Eine statistisch nicht signifikante Reduktion ist auch bei beiden 0,4 kb Promotorfragmenten (*LC* und *C1^S*) finden. Die Inhibition der Luciferase-Aktivität scheint insgesamt bei beiden Konstrukten aus der Linie *C1^S* deutlicher zu sein, als bei den Promotor-Reporter-Gen-Konstrukten aus dem Wildtyp.

Bei der Auswertung der Daten der *A1*-Promotor-Reporter-Gen-Aktivität wurden im Gegensatz zu den anderen Experimenten abhängig von der Auswertungsmethode sehr unterschiedliche Daten erhalten (Abb. 3.5.4-3, A, B). Dies ist möglicherweise auf eine geringere Anzahl der durchgeführten Experimente (zwei) und Parallelansätze (drei) zurückzuführen. Erstaunlicherweise wurde eine sehr hohe Promotor-Aktivität bereits ohne Transformation der Effektor-Konstrukte festgestellt. Vermutlich aufgrund des verstärkenden Introns ist die Reporter-Gen-Aktivität in allen Ansätzen um ein vielfaches stärker als mit dem *35S*-Referenzkonstrukt. Aufgrund der grossen Standardabweichungen können jedoch insgesamt keine zuverlässigen Aussagen für die Experimente mit diesem Promotor gemacht werden.

A)



B)

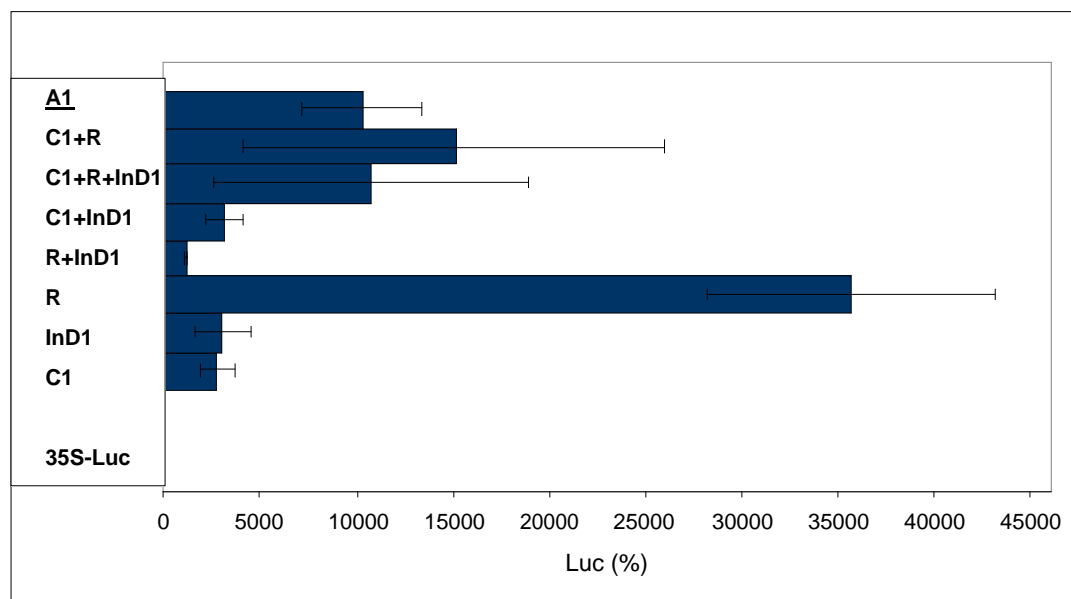


Abb. 3.5.4-3: Luciferase-Aktivitäten des A1-Promotor-Reportergen-Konstruktes nach transienter Transformation in Mais-Embryonen. Das A1-Promotor-Reportergen wurde allein oder in Kombination mit den Effektorgenen (*pAct-C1*, *pAct-R*, und *pAct-InD1*) transient in Mais-Embryonen (18-20 DAP) transformiert. Nach der Transformation wurden die Embryonen bei L/D 16/8 h für 30 bis 40 h kultiviert. Aus den Embryonen wurden Proteinextrakte hergestellt und Luc- und Gus-Assays durchgeführt. Die aus zwei Transformationsexperimenten mit jeweils drei Parallelansätzen erhaltenen Daten wurden auf zwei Wegen ausgewertet. Da beide Auswertungen zum Teil entgegengesetzte Ergebnisse zeigen, sind beide Auswertungen dargestellt. In **A**) sind die Mittelwerte der relativen Luc/Gus-Werte prozentual gegenüber der gleich 100% gesetzten Positivkontrolle 35S-Luc-nos (Luc/Gus) dargestellt. In **B**) sind nur die relativen Mittelwerte der Luciferase-Aktivität prozentual gegenüber der gleich 100% gesetzten Positivkontrolle 35S-Luc-nos (Luc) dargestellt.

Zur Klärung der Frage, ob das *InD1*-Genprodukt das *R*-Genprodukt ersetzen kann und mit dem *C1*-Genprodukt interagiert, konnten die transienten Experimente mit Promotor-Reporter-gen-Konstrukten keine eindeutigen Resultate liefern (Abb. 3.5.4-2 A, B; Abb. 3.5.4-3, A, B). Es ist bekannt, dass es bei der gemeinsamen transienten Transformation des *pAct-R*- und des *pAct-C1*-Genkonstruktes in Mais-Embryonen einer Linie, in der mindestens ein funktionelles Chalkonsynthasegen vorhanden ist, nach einer ca. 30 stündigen Kultivierung bei Licht zur sichtbaren Pigmentbildung kommt.

Falls das *InD1*-Genprodukt das *R*-Genprodukt ersetzen kann, sollte theoretisch bei Cotransformation des *pAct-C1*-Konstruktes zusammen mit dem *pAct-InD1*-Konstrukt Pigmentsynthese in Embryonen induziert werden können. Da das *R*-Genprodukt allein auch zu einer Induktion der Anthocyanbiosynthese in Embryonen ausreicht (persönliche Beobachtung), könnte dazu auch das *InD1*-Genprodukt in der Lage sein.

Um dies zu untersuchen, wurden nach transients Transformation Embryonen der Mais-Linie Ac 3484 (*in/in,C2/c2,whp/whp*), in der das *C2*-Gen funktionsfähig ist, und Embryonen der Linie *in/in,c2/c2,Whp/Whp*, in der das *Whp*-Gen funktional ist, visuell hinsichtlich einer Pigmentbildung in den Zellen ausgewertet.

Die Ergebnisse dieser Experimente sind in der Tabelle 3.5.4-1 zusammengefasst. Die Anzahl der Sterne gibt dabei die Intensität und Anzahl der gefärbten Zellen wieder. Bei den mit den *pAct-C1*- und *pAct-R*-Genkonstrukten cotransformierten Embryonen wurden bei beiden Mais-Linien (*in/in,C2/c2,whp/whp* und *in/in,c2/c2,Whp/Whp*) viele intensiv rot gefärbte Einzelzellen und gefärbte Bereiche, die aus mehreren Zellen bestanden, beobachtet (Abb. 3.5.4-4).

Wurde nur das *pAct-R*-Konstrukt für die Transformation eingesetzt, konnte ebenfalls, wenn auch in geringer Menge und Intensität, eine Induktion der Anthocyanbiosynthese festgestellt werden.

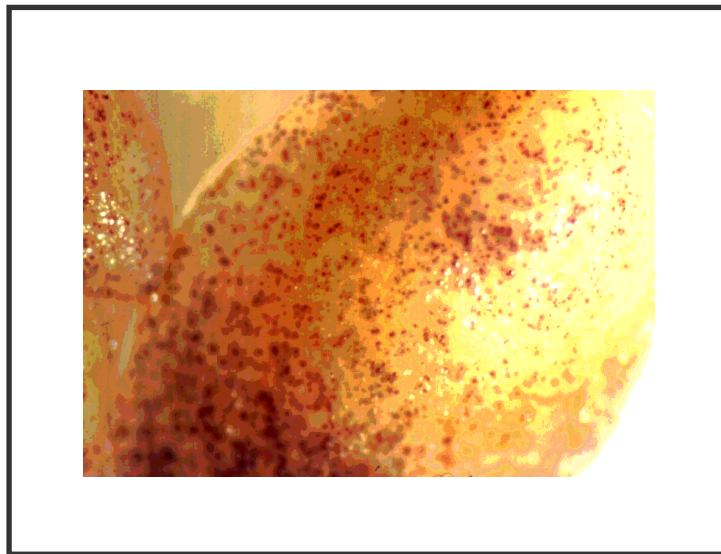


Abb. 3.5.4-4: Aufnahme von mit dem *pAct-C1*- und dem *pAct-R*-Konstrukt transient transformierten Mais-Embryonen (18 DAP) der Linie Ac 3484 (*ininC2c2whpwhp*). Die zuvor aus unreifen Körnern eines Kolbens isolierten Embryonen wurden mit den *pAct-C1*- und *pAct-R*-Konstrukten transformiert. Nach der Transformation wurden die Embryonen bei Licht/Dunkel (16/8 h) 30 bis 40 h kultiviert.

Bei den mit den drei Konstrukten *pAct-C1*, *pAct-R* und *pAct-InD1* transformierten Embryonen waren die Anzahl und Intensität pigmentierter Zellen ebenfalls reduziert. Damit bestätigen diese Experimente den zuvor mit den Promotor-Konstrukten gefundenen inhibierenden Effekt des *pAct-InD1*-Konstruktes.

Bei den mit dem *pAct-R* und dem *pAct-InD1*-Konstrukt transformierten Embryonen waren die Anzahl und Intensität der gefärbten Zellen sehr gering. Bei diesen Embryonen ist die Pigmentbildung möglicherweise auf die alleinige Aktivität des *R*-Proteins zurückzuführen. Keine gefärbten Zellen konnten bei den mit dem *pAct-C1*-Konstrukt transformierten Embryonen beobachtet werden.

Bei der Betrachtung der Embryonen nach Transformation mit dem *pAct-C1*- und dem *pAct-InD1*- oder dem *pAct-InD1*-Konstrukt allein konnte nicht eindeutig unterschieden werden, ob die Zellen tatsächlich leicht gefärbt waren oder ob es sich um die bei dem Beschuss entstandenen bräunlichen Verletzungsstellen handelte.

A) *ininC2c2whpwhp***B)** *ininc2c2WhpWhp*

Transform. Genkonstrukte	rote Spots		
<i>C1</i>	-		
<i>R</i>	***	Transform. Genkonstrukte	rote Spots
<i>InD1</i>	-	<i>InD1</i>	-
<i>C1/R</i>	****	<i>C1/R</i>	****
<i>C1/InD1</i>	-	<i>C1/InD1</i>	-
<i>R/InD1</i>	*		
<i>C1/R/InD1</i>	***		

Tab. 3.5.4-1: Ergebnisse der transienten Transformation von Mais-Embryonen zwei unterschiedlicher Linien. **A)** Die Linie Ac 3484 - *in/in,C2/c2,wh/whp*, (18 DAP), **B)** Die Linie - *in/in,c2/c2,Whp/Whp*, (18 DAP). In der Spalte „Transform. Genkonstrukte“ sind die eingesetzten Konstrukte angegeben, mit denen die Mais-Embryonen mit Hilfe der „particle gun“ transient transformiert wurden. Nach der Transformation und Kultivierung der Embryonen (L/D 18/6 h) wurden diese mit Hilfe eines Binokulars auf das Vorhandensein von pigmentierten Zellen untersucht. In der Spalte „rote Spots“ sind die Ergebnisse dieser Auswertung mit Sternchen und Strichen dargestellt. Durch Sternchen und deren Anzahl ist das Vorhandensein und die Intensität der rot gefärbten Zellen dargestellt. Mit Strichen sind die Proben bezeichnet, bei denen keine Pigment-Synthese festgestellt werden konnte.

Allerdings konnten zu dem Zeitpunkt, bei dem mit den *R*-, *R/C1*- und *R/C1/InD1*-Konstrukten gefärbte Zellen beobachtet wurden, bei keinem der mit den *C1/InD1*- und *InD1*-Konstrukten transformierten Embryonen pigmentierte Zellen nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse und die Daten aus den transienten Studien deuten darauf hin, dass das *InD1*-Genprodukt nicht in der Lage ist, das *R*-Genprodukt in den durchgeführten Experimenten zu ersetzen. Im Gegensatz dazu scheint es zu einer Inhibition der Anthocyanbiosynthese und der untersuchten Promotor-Elemente durch die Expression des *pAct-InD1*-Konstruktes zu kommen.

4. Diskussion

In dieser Arbeit wurden molekulare Analysen mit zwei Mutantenlinien aus Mais, *C2-Idf* (*Inhibitor diffuse*) und *C1^S* („S„ - strong), durchgeführt, die auffällige und entgegengesetzte Veränderungen in der Anthocyanbiosynthese aufweisen. Die Körner der *C2-Idf*-Linie sind farblos und die Körner der *C1^S*-Linie sind nahezu schwarz gefärbt. In der *C2-Idf*-Linie ist das erste Strukturgen des Anthocyanbiosyntheseweges, *C2*, mutiert und in der *C1^S*-Linie ist ein Regulatorgen der Anthocyanbiosynthese, *C1*, verändert. Die Gemeinsamkeit zwischen den beiden Mutationen ist die dominante Ausprägung der Allele. Interessanterweise besitzt die *C2-Idf*-Mutation außerdem einen inhibitorischen Charakter (1.1.2). Zur Untersuchung des Einflusses der mutierten Allele auf die Expression anderer Gene des Anthocyanbiosyntheseweges wurde die Expression verschiedener Struktur- und Regulatorgene, welche miteinander in Wechselwirkung stehen, im Aleuron mittels RT-PCR untersucht (3.1).

Um die molekularen Ursachen der *C2-Idf*-Mutation zu verstehen, wurden Experimente zur Vervollständigung der genomischen Struktur des *C2-Idf*-Allels durchgeführt (3.2). Ebenfalls wurde die Aktivität des Promotors einer der *C2-Idf*-Genkopien in transienten Transformationsexperimenten untersucht (3.5.2).

Um eine Ursache für die verstärkte Expression des zweiten Chalkonsynthasegens *Whp* in der *C1^S*-Mutante zu finden, wurde die *Whp*-cDNA aus dieser Linie kloniert und mit einer ebenfalls klonierten *Whp*-cDNA aus der Linie *in/in,c2/c2,Whp/Whp* verglichen (3.3). Die dabei gefundenen Sequenzunterschiede im 5'-UTR-Bereich und im Promotor-Bereich (3.4) wurden hinsichtlich ihrer möglichen regulativen Eigenschaften in transienten Transformationsassays näher untersucht (3.5.3).

Das *myc*-homologe Intensifiziergen übt eine reprimierende Wirkung auf die Anthocyanbiosynthese aus. Deshalb war es interessant, die Wirkung dieses Proteins auf die Promotoren der Chalkonsynthasegene in transienten Transformationsexperimenten zu analysieren (3.5.4). Für diese Experimente wurde exemplarisch das *InD1*-Protein des Intensifizier Allels *InD* (*Intensifizier dilute*) eingesetzt, da dieses Allel ebenfalls einen dominant inhibitorischen Charakter aufweist.

Die bei diesen Untersuchungen entstandenen Ergebnisse werden in diesem Kapitel der Arbeit diskutiert.

4.1 Die *C2-Idf*-Mutante

Die Ergebnisse der durchgeführten Expressionsanalysen lassen im Consens mit früheren Daten (Franken *et al.*, 1991; Rojek, 1996; Borchert, 1998) vermuten, dass in der *C2-Idf*-Linie keine oder wenig *C2*-spezifische Transkripte vorliegen (Abb. 3.1-2). Aufgrund der hohen Homologie (95%) zwischen den kodierenden Bereichen der Chalkonsynthasegene *C2* und *Whp* ist es nicht auszuschließen, dass die in der *C2-Idf*-Linie detektierten Amplifikate möglicherweise vom *Whp*-Gen stammen.

Eine Verringerung der *C2*-Gentranskripte ist auch in der reziproken Kreuzung zwischen der *C2-Idf*-Linie und dem Wildtyp zu beobachten, wenn zwei *C2-Idf*-Allele vorliegen (Abb. 3.1-2). Auch die Ergebnisse der Northern-Blot-Analyse von Borchert (1998) an Kreuzungen der *C2-Idf*-Linie mit der *C1^S*-Linie zeigen, dass mit zunehmender Anzahl der *C2-Idf*-Allele eine Abnahme der *C2*-spezifischen Wildtyp-Transkripte erfolgt. Somit wird der dominant inhibitorische Charakter der *C2-Idf*-Mutation nicht nur phänotypisch, sondern auch auf der Ebene der *C2*-Transkription sichtbar.

Auffällig sind in dieser Linie auch die geringen Transkriptmengen des *R*- und *C1*-Gens, was vermuten lässt, dass das *C2-Idf*-Allel auch einen Einfluss auf die Expression dieser regulativen Gene haben könnte und auf diese Weise hemmend auf die Expression der Strukturgene wirkt. In diesem Fall würde man allerdings auch keine Expression des zweiten Chalkonsynthasegens *Whp* und des *A1* Gens (17 DAP) finden können, weil alle Strukturgene des Anthocyanbiosyntheseweges von denselben Regulationsgenen (*C1* und *R*) kontrolliert werden (Dooner und Nelson, 1979). Da jedoch diese Gene unverändert exprimiert werden, reichen offensichtlich die geringen Produktmengen des *C1*- und *R*-Gens aus, um die Transkription der Strukturgene zu induzieren. Sowohl bei dem *C1*-, als auch bei dem *R*-Gen nimmt die Transkriptmenge im Wildtyp zwischen 17 und 27 DAP ab (Abb. 3.1-2). Wann die Induktion dieser Gene im Verlauf der Kornentwicklung erfolgt, ist bislang unbekannt. Deshalb ist eine denkbare Erklärung für die geringeren *C1*- und *R*-Transkriptmengen

in der *C2-ldf*-Linie eine im Vergleich mit dem Wildtyp veränderte Expressionskinetik aufgrund einer zeitlich unterschiedlichen Kornentwicklung. Um diese Frage zu untersuchen, ist es notwendig, eine vergleichende Genexpressionsanalyse des *C1*- und *R*-Gens in verschiedenen Entwicklungsstadien der beiden Genotypen durchzuführen. Dies ist jedoch problematisch, da bei der Anpflanzung der *C2-ldf*- und der *LC*-Pflanzen unter gleichen Bedingungen bei der *C2-ldf*-Mutante eine zeitlich um ca. 10 Tage verzögerte Entwicklung im Vergleich zum Wildtyp beobachtet wurde. Somit ist es sehr schwierig, vergleichbare Entwicklungsstadien zu definieren. Die Beobachtungen deuten jedoch darauf hin, dass die untersuchten Regulatorgene in der *C2-ldf*-Mutante nur aufgrund einer verzögerten Kornentwicklung weniger stark exprimiert sind, als im Wildtyp.

Die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse für die *C1*-Genexpression in der *C2-ldf*-Linie stehen zum Teil im Gegensatz zu den Ergebnissen der Northern-Blot-Analysen von Borchert (1998), der keine Reduzierung der *C1*-Transkripte in der *C2-ldf*-Linie (28 DAP) beobachten konnte. Möglicherweise hängt dies mit dem verwendeten Pflanzenmaterial zusammen. Allerdings stimmen die Ergebnisse der *C1*-Genexpression in den reziproken Kreuzungen (*C2-ldf/wt* und *wt/C2-ldf*, 30 DAP) mit den Ergebnissen von Borchert (*C2-ldf/C1^S* und *C1^S/C2-ldf*, 28 DAP) überein. In beiden Fällen wurde im Vergleich zu der Kontroll-Linie keine veränderte *C1*-Expression in Abhängigkeit von der Anzahl der *C2-ldf*-Allele nachgewiesen.

In den Körnern aus den reziproken Kreuzungen *wt/C2-ldf* und *C2-ldf/wt* (30 DAP) konnten auch Transkripte des zweiten Regulatorgens *R* nachgewiesen werden (Abb. 3.1-2). Diese scheinen mit Zunahme der *C2-ldf*-Allele geringfügig abzunehmen. Es ist jedoch zu vermuten, dass diese Reduktion nicht in Verbindung mit der Zunahme des *C2-ldf*-Allels steht, sondern, wie bei dem *C1*-Gen, eher auf eine linienspezifische zeitlich veränderte Expressionsregulierung zurückzuführen ist.

Die Expression der Strukturgene *A1* und *Whp* ist sowohl in der *C2-ldf*-Linie 17 DAP als auch in den Kreuzungen *wt/C2-ldf* und *C2-ldf/wt* im Vergleich mit der Expression in dem Wildtyp unverändert. Nur 27 Tage nach Pollinierung ist die *A1*-Transkriptmenge in der *C2-ldf*-Linie stark reduziert (Abb. 3.1-2). Diese Daten stimmen mit den Ergebnissen der Northern-Blot-Analyse von Borchert (1998) überein, bei der in *C2-ldf*-Maiskörnern 28 Tage nach der Pollinierung auch eine geringe *A1*-Transkriptmenge beobachtet wurde. Da bei der Northern-Blot-Analyse

des *A1*-Gens von Borchert (1998) nur ein Zeitpunkt (28 DAP) untersucht wurde, wurde postuliert, dass das *C2-Idf*-Allel die Expression des *A1*-Gens inhibiert. Da in der vorliegenden Arbeit jedoch gezeigt werden konnte, dass in der Linie *C2-Idf* die Transkriptmenge 17 Tage nach Pollinierung der Transkriptmenge im Wildtyp entspricht, scheint es sich eher um eine entwicklungspezifische Transkriptabnahme zu handeln.

Wie bereits erwähnt, wird die Expression des zweiten Chalkonsynthasegens *Whp* in der *C2-Idf*-Linie nicht durch das *C2-Idf*-Allel beeinflusst und die Transkriptmenge des *Whp*-Gens entspricht der des Wildtyps (Abb. 3.1.-2). Allerdings kann das *Whp*-Gen die Funktion des *C2*-Gens im Aleuron nicht komplementieren, da aufgrund des vorhandenen dominanten *In*-Allels die *Whp*-Transkripte im Aleuron nicht translatiert werden (Franken *et al.*, 1991). Da die Wirkung des *In*-Gens auf das *Whp*-Gen gewebespezifisch ist und nur im Aleuron stattfindet, kann die *Chalkonsynthase* in den männlichen Blütenanlagen dieser Linie trotzdem synthetisiert werden (Franken, *et al.*, 1991). Dies ist für den Erhalt der Linie wichtig, da die Anthocyanbiosynthese für die Fertilität des Maispollens notwendig ist. Aus diesem Grund kommt es bei dieser Linie trotz ungefärbter Körner zur Entwicklung von funktionsfähigem Pollen.

Aus dem Vergleich zwischen der Genexpression der *C2-Idf*-Linie mit der des Wildtyps sowie mit der der reziproken Kreuzungen ist anzunehmen, dass sich die hemmende Wirkung des *C2-Idf*-Allels in erster Linie nur auf die Expression des *C2*-Gens auszuüben scheint und die Expression der übrigen in dieser Arbeit analysierten Struktur- und Regulatorgene nicht direkt durch die Mutation beeinflusst wird. Dementsprechend könnte eine der vielen möglichen Ursachen dieser dominanten inhibitorischen Mutation mit der genomischen Struktur des *C2-Idf*-Allels zusammenhängen. Um dieser Frage nachzugehen, wurden in dieser Arbeit weitere Analysen zur Aufklärung der genomischen Struktur des *C2-Idf*-Allels durchgeführt.

Aus vorherigen Untersuchungen ist bekannt, dass das *C2-Idf*-Allel auf dem Chromosom 4 in der Nähe des *C2*-Allels vorliegt (Greenblatt, 1975). Jedoch ist die Organisation der *C2-Idf*-Kopien auf dem Chromosom bislang nicht bekannt. Die Ergebnisse der Southern-Blot-Analyse der *C2-Idf*-Mutante von Borchert (1998) lassen vermuten, dass das *C2-Idf*-Allel in drei *C2*-homologen Kopien vorliegt. Zum

Beginn der vorliegenden Arbeit waren zwei Teilsequenzen von zwei dieser *C2-Idf*-Kopien bekannt, die als Klon 55 und Klon Qb bezeichnet wurden (Wienand unveröffentlicht; Borchert, 1998). Die Veränderungen in der Struktur dieser genomischen Klone gegenüber dem Wildtyp-Allel sind in der Einleitung beschrieben und schematisch in der Abbildung 3.2.1-1 dargestellt.

In der vorliegenden Arbeit sollte die Struktur der bekannten *C2-Idf*-Kopien weiter vervollständigt werden und eine dritte, bislang unbekannte *C2-Idf*-Kopie hinsichtlich ihrer molekularen Struktur analysiert werden. Leider ist es nicht gelungen, aus einer *C2-Idf*-genomischen Bank neue Teilbereiche des *C2-Idf*-Allels zu isolieren (3.2.2). Beim Screening einer mit *EcoRI* gespaltenen *C2-Idf*-genomischen Bank mit einem *C2*-spezifischen Promotor-Fragment konnten zwar fünf positive Klone isoliert werden, nachfolgende Untersuchungen zeigten aber, dass sich alle fünf *C2-Idf*-Phagen-Klone hinsichtlich ihrer Insert-Struktur nicht voneinander unterscheiden und mit dem bereits bekannten *C2-Idf*-Klon 55 identisch sind (Abb. 3.2.2-3, 3.2.2-4).

Schon bei den früheren Untersuchungen der *C2-Idf*-Mutante wurde erwähnt, dass auch dort Schwierigkeiten verschiedener Art bei der Klonierung der genomischen *C2-Idf*-Kopien auftraten, deren Ursache nicht geklärt werden konnte (Borchert, 1998). Möglicherweise sind die aufgetretenen Schwierigkeiten auch auf die Struktur des *C2-Idf*-Allels zurückzuführen, in dem dieses z.B. aufgrund starker Methylierung für eine Klonierung nicht zugänglich ist.

Da das Durchmustern der genomischen *C2-Idf*-Bank (3.2.2) nicht zu dem gewünschten Ergebnis führte, wurde im weiteren Verlauf versucht, das *C2-Idf*-Allel durch PCR-Experimente mit genomischer *C2-Idf*-DNA und mit *C2*- und *C2-Idf*-spezifischen Primern zu analysieren (3.2.3). Dabei sollte drei Fragen nachgegangen werden:

- Wie ist die genomische Struktur der *C2-Idf*-Kopie des Klons 55 hinter dem im zweiten Exon inserierten transponierbaren Element?
- Wie ist die genomische Struktur des Introns der *C2-Idf*-Kopie des Klons Qb und enthält diese Genkopie das zweite Exon?

-
- Welche genomische Struktur besitzt die dritte, bislang unbekannte *C2-Idf*-Kopie?

Die zum Verständnis der Struktur der *C2-Idf*-Kopie des Klons 55 durchgeführten PCR-Experimente mit *C2-Idf*-, *C2*- und *PREM*-spezifischen Primern führten zu keiner Amplifikation spezifischer Fragmente (3.2.3). Möglicherweise sind die bei der PCR-Analyse entstandenen Schwierigkeiten sowohl auf die Struktur, als auch auf die große Länge des in der *C2-Idf*-Kopie 55 vorliegenden Retroelementes zurückzuführen. Dementsprechend muss die Frage, ob hinter der Transposon-Insertion im zweiten Exon die fehlenden Bereiche dieses Exons vorhanden sind, ungeklärt bleiben.

Für die vollständige Aufklärung der genomischen Struktur der *C2-Idf*-Kopie des Klons *Qb* wurden ebenfalls PCR-Experimente mit *C2*-, *C2-Idf*-, *C2-Idf*-(*Qb*)-spezifischen Primern durchgeführt (Abb. 3.2.3-1). Dabei konnten aus der *C2-Idf*-gDNA keine Amplifikate erhalten werden, die den Bereich vom Promotor bis zum Exon 2 in einem Stück enthielten. Dies war überraschend, da bei den parallel durchgeführten Kontroll-PCRs mit dem Wildtypgen genomische Fragmente der erwarteten Länge erhalten werden konnten (Tab. 3.2.3-1). Allerdings konnten durch diese PCR-Experimente zumindest einzelne Genbereiche des *C2-Idf*-Allels erhalten werden, die das 1,7 kb lange Intron und das vollständige zweite Exon enthielten:

- Mit Primern aus dem zweiten Exon konnte aus der *C2-Idf*-gDNA ein vollständiges Exon 2 amplifiziert werden, das in beiden oder in einer der zwei *C2-Idf*-Kopien *Qb* und 3. vorliegt (Abb. 3.2.3-4, B C). Die Sequenz des zweiten Exons aus der *C2-Idf*-Linie ist, mit Ausnahme von zwei Nukleotidaustauschen am Beginn des Exons, bis zum Stoppkodon mit der Sequenz des *C2*-Wildtyps identisch. Die zwei Nukleotidaustausche liegen auch in der *C2-Idf*-Kopie 55 an den gleichen Positionen vor und führen zu keiner Änderung der Aminosäuresequenz (Abb. 3.2.3-3, B). Im 3'-UTR-Bereich sind, verglichen mit der Wildtypsequenz, zwei Deletionen von jeweils 21 bzw. 3 Basen und eine Duplikation von drei Nukleotiden (AAT) vorhanden (Abb. 3.2.3-3, C). Diese Unterschiede in der Sequenz sind wahrscheinlich linienspezifisch, da sie in allen bislang untersuchten Genkopien des *C2-Idf*-Allels vorliegen.

Da der bislang bekannte Bereich der Genkopie *Qb* nur bis in das Intron, 275 bp vor Beginn des zweiten Exons reicht, waren keine Informationen über die Länge

des Introns dieser *C2-Idf*-Kopie verfügbar. Die Ergebnisse aus PCR-Analysen mit *C2(wt)*-spezifischen Primern (Abb. 3.2.3-2) und aus Southern-Analysen mit *EcoRV* geschnittener *C2-Idf*-gDNA (Abb. 3.2.1-2) liefern Hinweise, dass die Intronstruktur bei allen drei *C2-Idf*-Kopien gleich sein könnte. Da die Bindestelle des verwendeten JK5`C2-37 Primers an einer Position ist, an der bei den bekannten *C2-Idf*-Kopien 55 und *Qb* eine veränderte Sequenz vorliegt, ist mit diesem Primer kein Amplifikat vom *C2-Idf*-Allel zu erwarten, falls die dritte unbekannte Kopie auch ein vom Wildtyp abweichendes Intron besitzt. Tatsächlich konnte aus der *C2-Idf*-gDNA mit diesem Primer kein Amplifikat erhalten werden (Abb. 3.2.3-2, B; C). Dies deutet darauf hin, dass in allen *C2-Idf*-Kopien des *C2-Idf*-Allels der „5`Intron-Bereich“, die selbe Struktur besitzt. Außerdem wurde mit spezifischen Primern für das *C2*-Intron (JK5`C2-38 und JK5`C2-35, Abb. 3.2.3-2, A) aus der *C2-Idf*-gDNA nur ein 1,7 kb langes Amplifikat erhalten und kein Amplifikat, das dem kürzeren Wildtypintron entspricht (Abb. 3.2.3-2, B). Dieses Ergebnis deutet ebenfalls darauf hin, dass in allen drei *C2-Idf*-Kopien des *C2-Idf*-Allels ein 1,7 kb langes Intron vorliegen könnte.

Das Ergebnis der Southern-Analyse der mit *EcoRV* geschnittenen *C2-Idf*-gDNA mit einer *C2*-Promotor-Sonde (Abb. 4.1-1, A) unterstützt das Ergebnis dieser PCR-Analyse. Aufgrund einer *EcoRV*-Schnittstelle im Promotor des *C2*-Wildtypallels ist im Southern-Blot beim Wildtyp eine 10 kb Bande zu detektieren. In den bekannten Genkopien des *C2-Idf*-Allels ist zusätzlich zu der ebenfalls im Promotor vorliegenden *EcoRV*-Schnittstelle eine zweite Schnittstelle in der Insertion im Intron vorhanden. Im Southern-Blot der *C2-Idf*-Linie wird mit der *C2*-Promotor-Sonde eine 3 kb Bande doppelter Intensität, die der *C2-Idf*-Kopie 55 und der unbekannten Kopie entspricht, sowie eine 4,2 kb Bande der *C2-Idf*-Kopie *Qb* detektiert. Die größere 4,2 kb Bande ist auf die Insertion des *CACTA*-Elementes im Promotor der Kopie *Qb* zurückzuführen. Da beide Fragmente der beiden übrigen Kopien gleich lang sind, ist von einer gleichen Genstruktur in diesem Genbereich auszugehen.

Aufgrund der PCR-Ergebnisse und der Southern-Hybridisierung ist anzunehmen, dass in dem *C2-Idf*-Allel kein Wildtyp-ähnliches Intron vorhanden ist und dass alle *C2-Idf*-Kopien des *C2-Idf*-Allels zumindest im 5`-Bereich des Introns vor der *EcoRV* Restriktionsschnittstelle die gleiche Struktur besitzen. Da in dieser Arbeit durch die PCR-Analyse nur einzelne *C2-Idf*-spezifische Genbereiche erhalten

werden konnten, kann allein aufgrund dieser Daten über die gesamte Struktur der *C2-Idf*-Kopien *Qb* und 3. Kopie keine genauen Aussagen gemacht werden. Offensichtlich handelt es sich dabei um eine komplexe Struktur und dementsprechend ist es von Vorteil, die Struktur dieser *C2-Idf*-Kopien im Zusammenhang mit Southern-Analysen mit einer *C2*-Intron-Sonde von Borchert (1998) zu diskutieren.

Aufgrund des Vorliegens der *EcoRV* Schnittstelle in der Intron-Insertion des *C2-Idf*-Allels wird das Intron bei Restriktion der genomischen DNA in zwei Bereiche aufgeteilt, so dass mit einer *C2*-Intron-Sonde sowohl der „Promotor-Exon1-5`Intron-Bereich,“ als auch der „3`Intron-Bereich,“ auf unterschiedlichen Fragmenten detektiert werden kann (Abb. 4.1-1, C). Zusätzlich ist das Fragment mit dem „Promotor-Exon1-5`Intron-Bereich,“ auch mit einer *C2*-Promotor-Sonde nachzuweisen (Abb. 4.1-1; C).

Die 3 kb lange Bande doppelter Intensität in der Southern-Hybridisierung mit dem *C2*-Promotor-Fragment entspricht dem „Promotor-Exon1-5`Intron-Bereich,“ der *C2-Idf*-Kopien 55 und 3. Kopie (siehe oben). Diese Fragmente hybridisieren entsprechend auch mit der *C2*-Intron-Sonde (Abb. 4.1-1, A, B). Die 4,2 kb lange Bande in der Southern-Hybridisierung mit der *C2*-Promotor-Sonde entspricht dem vorderen Bereich der *C2-Idf*-Kopie *Qb* und ist auch in der Hybridisierung mit der Intron-Sonde zu identifizieren. Diese Fragmente wurden bereits zuvor diskutiert.

Aufgrund des Vorkommens einer weiteren *EcoRV* Schnittstelle in der Sequenz des Retroelementes der *C2-Idf*-Kopie 55 (Abb. 4.1-1, C), ist das mit der *C2*-Intron-Sonde detektierte 3,7 kb lange Fragment dem „3`Intron-Exon2(-77 bp)-Retroelement-Bereich,“ dieser *C2-Idf*-Kopie zuzuordnen.

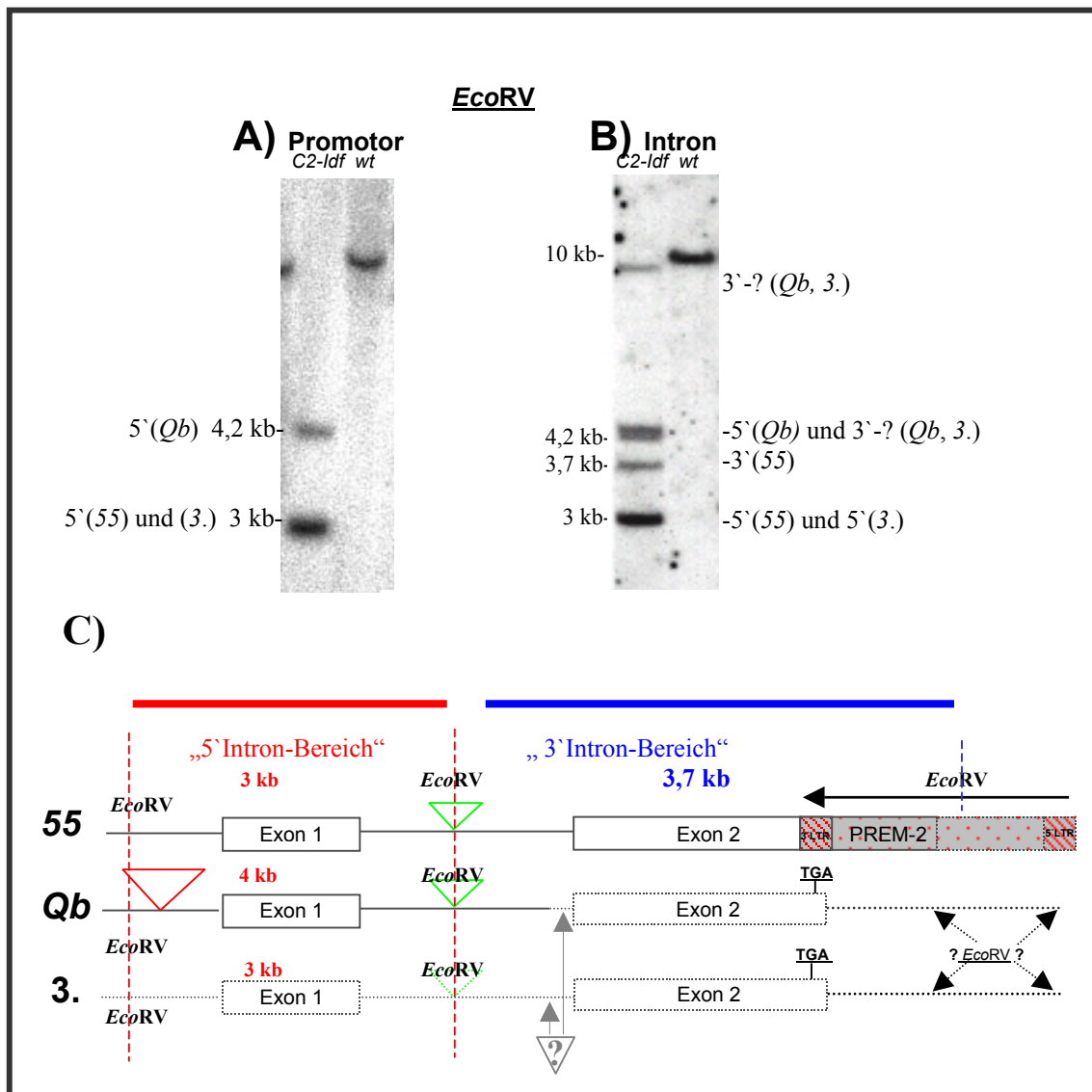


Abb. 4.1-1: Southern-Hybridisierung genomischer *C2-Idf*- und *LC*-DNA mit einer *C2*-Promotor- und einer *C2*-Intron-Sonde. **A)** Southern-Hybridisierung der mit *EcoRV* gespaltenen genomischen *C2-Idf*- und *LC*-DNA mit einem *C2*-Promotor-Fragment (*Hinfl*). **B)** Southern-Hybridisierung der mit *EcoRV* gespaltenen genomischen *C2-Idf*- und *LC*-DNA mit einem *C2*-Intron-Fragment (übernommen von Borchert, 1998). Die Längen der detektierten Fragmente sowie die theoretische Zuordnung der Genkopien 55, *Qb* und dritte unbekannte Kopie (3.) sind angegeben. Die Angaben 3' und 5' beziehen sich auf das Schema in C). Kann ein Fragment nicht eindeutig zugeordnet werden, steht „?“. **C)** Schematische Darstellung der *C2-Idf*-Kopien. Mit durchgezogenen Linien sind die bekannten Genbereiche (nach Borchert, 1998) und gepunktet die aufgrund der in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Analysen vermuteten Genstrukturen dargestellt. Ein rotes Dreieck kennzeichnet die Insertion eines CACTA-Elementes. Mit grünen Dreiecken ist der von der Wildtypsequenz abweichende Intronbereich markiert. Aufgrund der in B) gezeigten Ergebnisse könnte auch eine lange Insertion im Intron (graues Dreieck mit Fragezeichen) einer der zwei *C2-Idf*-Kopien (*Qb*, 3.) vorhanden sein. Mit PREM-2 ist die Insertion eines Retroelementes bezeichnet. Der Pfeil gibt die Orientierung des Retroelementes in 5'-3'-Richtung an. Ein roter Balken kennzeichnet die Genbereiche, die mit sowohl der *C2*-Promotor-Sonde als auch mit der *C2*-Intron-Sonde nachzuweisen sind. Ein blauer Balken kennzeichnet die Genbereiche, die nur mit der *C2*-Intron-Sonde detektierbar sind. Die vermutete Position der *EcoRV*-Schnittstelle im 3'-Bereich der zwei *C2-Idf*-Kopien (*Qb*, 3.) ist durch Pfeile markiert.

Neben der zuvor erwähnten 4,2 kb Bande ist in diesem Größenbereich ein weiteres Fragment spezifisch nur mit der Intron-Sonde zu detektieren. Diese Bande und eine Bande bei 9 kb müssen den „3´Intron-Exon2-Bereichen„ der *Qb* und der dritten unbekanntenen Kopie entsprechen. Bislang ist jedoch eine Zuordnung der Banden nicht möglich. Auffallend ist, dass die Fragmente eine sehr unterschiedliche Länge aufweisen, die auf Unterschiede in der Sequenz zurückzuführen sind. Da die bisherigen Ergebnisse zeigen, dass vermutlich in allen drei Kopien ein Intron gleicher Länge vorliegt und zwei *C2-Idf*-Kopie (*Qb* und 3. Kopie) das Exon 2 enthalten, sollte die variable *EcoRV* Schnittstelle hinter dem Bereich des *C2*-Gens vorliegen. Bei der *C2-Idf*-Kopie, die der 4,2 kb Bande zugeordnet ist, sollte die variable *EcoRV* Schnittstelle ca. 2 kb hinter dem Stoppkodon vorliegen. Bei der anderen *C2-Idf*-Kopie ca. 7 kb hinter dem Gen (Abb. 4.1-1, B, C).

Allerdings ist nicht völlig auszuschließen, dass bei einer dieser zwei *C2-Idf*-Kopien eine lange Insertion im 3´-Bereich des Introns vorliegen könnte (Abb. 4.1-1, C). Dies würde zunächst den PCR-Ergebnissen widersprechen, bei denen aus der *C2-Idf*-Linie nur ein 1,7 kb langes Intron amplifiziert wurde und zur Schlussfolgerung führen, dass in allen *C2-Idf*-Kopien das selbe Intron vorliegt. Jedoch könnte eine sehr lange Insertion, wie sie in diesem Fall anzunehmen wäre, der Amplifikation nicht zugänglich sein, so dass von dieser Genkopie kein PCR-Amplifikat erhalten werden könnte.

Da aufgrund der in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse und der übrigen Daten (Wienand, unveröffentlicht; Borchert; 1998) zu vermuten ist, dass in den *C2-Idf*-Kopien des *C2-Idf*-Allels zumindest insgesamt alle Bereiche der kodierenden Regionen des *C2*-Gens wiederzufinden sind, ist noch nicht endgültig bewiesen, dass in der *C2-Idf*-Mutante die fehlenden bzw. geringen *C2*-Transkripte auf funktionslose Genkopien zurückzuführen sind. Insbesondere für die dritte Genkopie sind die hierfür vorliegenden Daten unzureichend. Eine mögliche andere Ursache für die nicht vorhandenen Transkripte könnte ein Verlust der Promotor-Aktivität sein. Aus den vorherigen Untersuchungen sind die Promotor-Sequenzen der zwei *C2-Idf*-Kopien *55* und *Qb* bekannt (Borchert, 1998). Diese weisen gegenüber der *C2*-Wildtyp-Sequenz einige Unterschiede auf, die schematisch in der Abbildung 4.1-2 gezeigt sind.

In dem Promotor der *C2-Idf*-Kopie *55* liegen kleinere Deletionen und Nukleotidaustausche vor (Abb. 4.1-2). Obwohl diese Änderungen die für die

Expression essentiellen Grundstrukturen, die potentiellen Bindungsstellen des *C1*-Genproduktes (*myb*-Protein-T/CAACG/GG; Biedenkapp *et al.*, 1988) und des *R1*-Genproduktes (*myc*-Protein-G/TGCAGGTGG/T; Sen und Baltimore, 1986), sowie vorhandene UV-Boxen (Schulze-Lefert *et al.*, 1989) nicht verändern, ist es durchaus möglich, dass die Expression dieser *C2-Idf*-Kopie dadurch beeinflusst sein könnte.

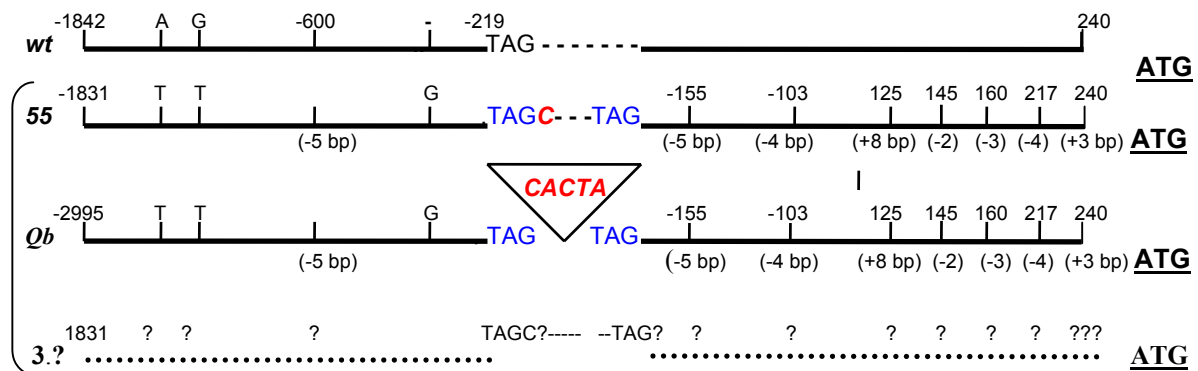


Abb. 4.1-2: Schematische vergleichende Darstellung der Promotor-5'-UTR-Region des *C2*-Wildtypgens und der *C2-Idf*-Kopien. Die bekannten Genbereiche des Promotor-5'-UTR-Bereiches des *C2*-Wildtypgens (Wienand *et al.*, 1986) und der zwei bekannten *C2-Idf*-Kopien (Borchert, 1998) sind als Balken gezeigt. Der durch Southern-Analyse mit einer *C2*-Promotor-Sonde vermutete Promotor-5'-UTR-Bereich der dritten *C2-Idf*-Kopie ist gepunktet dargestellt. Die Positionen der vorliegenden Sequenz-Änderungen im Vergleich zur Wildtypsequenz sind mit Zahlen angegeben. Die Zahlen in Klammern zeigen die Anzahl inserierter (+) oder deletierter (-) Nukleotide. Mit einem Dreieck ist die Insertion eines *CACTA*-Elementes und in blau sind die Insertionsduplikationen angegeben. Der vermutete „footprint“, in der Kopie 55 ist ebenfalls farblich markiert.

Im Promotor der *C2-Idf*-Kopie *Qb* ist zusätzlich zu den in der *C2-Idf*-Kopie 55 vorkommenden Änderungen ein Transposon der *CACTA*-Familie inseriert (Abb. 4.1-2), das ebenfalls eine Wirkung auf die Promotor-Aktivität dieser Kopie ausüben könnte. Die Promotorsequenz der dritten *C2-Idf*-Kopie ist nicht bekannt, allerdings ist aufgrund der Southernanalysen anzunehmen (Abb. 4.1-1, A, C), dass diese eher wie der Promotor der *C2-Idf*-Kopie 55 strukturiert ist und keine langen zusätzlichen Insertionen enthält.

Die in den zwei bekannten *C2-Idf*-Kopien gefundenen Insertionen transponierbarer Elemente (Abb. 4.1-1, C) liefern Hinweise, dass das *C2-Idf*-Allel im Laufe der Evolution durch die Aktivität von Transposons entstanden ist. Es gibt eine Vielzahl von Beispielen, die darauf hindeuten, dass die Aktivität der transponierbaren Elemente für die Reorganisation eines Genomes verantwortlich ist. Bei Mais können häufig Chromosomenbrüche, Genduplikationen oder andere Veränderungen der

Chromosomenstruktur auf die Wirkung der Retrotransposons zurückgeführt werden (Flavell *et al.*, 1994; Wessler *et al.*, 1995; McDonald, 1990; Zhang *et al.*, 2000; Bennetzen, 2000). Anhand der bekannten Bereiche der zwei Kopien 55 und *Qb* (Borchert, 1998) kann man über die mögliche Entstehung des *C2-Idf*-Allels spekulieren. Die *C2-Idf*-Kopie *Qb* ist möglicherweise die älteste *C2*-Kopie, die im Laufe der Evolution durch die Aktivität von Transposons dupliziert wurde, was zur Entstehung der *C2-Idf*-Kopie 55 führte. Einen Hinweis darauf liefert die Insertion des *CACTA*-Elementes im Promotor der *C2-Idf*-Kopie *Qb* und ein „footprint„ (TAGCTAG) an der gleichen Position in der *C2-Idf*-Kopie 55 (Abb. 4.1-2). Nach der Duplikation erfolgte möglicherweise die Insertion des Retroelementes in die *C2-Idf*-Kopie 55 (Abb. 4.1-1, C). Wie es zur Entstehung der dritten *C2-Idf*-Kopie kam, kann aufgrund fehlender Informationen über ihre Sequenz bislang nicht gesagt werden. Da in dem Promotor dieser Kopie kein *CACTA*-Element vorliegt, könnte sie als Vorläufer der *C2-Idf*-Kopie *Qb* angesehen werden, die dupliziert wurde bevor die Insertion des *CACTA*-Elementes erfolgte. Eine andere Möglichkeit ist die Abstammung von der *C2-Idf*-Kopie 55. Dabei müsste die Duplikation nach der Exzision des *CACTA*-Elementes, allerdings vor der Insertion des Retroelementes stattgefunden haben (Abb. 4.1-1, C).

Um der Frage nachzugehen, ob die Promotoren der *C2-Idf*-Kopien trotz der vorliegenden Sequenzänderungen funktionsfähig sind und, falls sie funktionell sind, ob sie eine gegenüber dem *C2*-Wildtyp-Promotor abweichende Expressionsaktivität aufweisen, sollten in dieser Arbeit vergleichende Promotor-Analysen durchgeführt werden. Da bei den Klonierungen zur Herstellung der Promotor-Reporter-Gen-Konstrukte leider nur ein *C2-Idf-55*-Promotor-Reporter-Gen-Konstrukt hergestellt werden konnte, wurde nur die Promotor-Aktivität dieses Konstruktes in den transienten Transformationsexperimenten analysiert (3.5.2). Die großen Schwierigkeiten, die bei der Klonierung der Promotor- und anderer Genfragmente auftraten, sind vermutlich in erster Linie auf die spezifischen Sequenzen der zu klonierenden Bereiche zurückzuführen. Vermutlich ist eine starke Tendenz zu Sekundärstrukturen, die auch in anderen Klonierungsversuchen mit dem *C2*-Promotor Probleme verursachte (M. Littek, R. Lorbiecke, Universität Hamburg, persönliche Mitteilung), hierfür ausschlaggebend.

Die Ergebnisse der transienten Promotoruntersuchungen zeigen, dass der *C2-Idf-55*-Promotor durch die Produkte des *R*- und *C1*-Gens im Scutellum induziert wird. Damit konnte zum ersten Mal molekular eine direkte Induktion eines *C2*-Promotors durch diese beiden Regulatorgene gezeigt werden. Bislang konnte die durch die Produkte des *C1*- und des *R*-Gens hervorgerufene Induzierbarkeit *in vivo* nur für die Promotoren des *Bz1*-, *Bz2*- und *A1*-Strukturgens der Anthocyanbiosynthese gezeigt werden (Klein *et al.*, 1989; Roth *et al.*, 1991; Bodeau und Walbot, 1992, Goff *et al.*, 1990, 1992; Grotewold *et al.*, 2000). Die transienten Expressionsstudien bestätigen damit die genetischen Daten für die *C2*-Induktion (Dooner und Nelson, 1979). Außerdem zeigt die Induzierbarkeit im transienten System, dass zumindest theoretisch auch *in vivo* eine Transkriptionsinduktion durch den Promotor der *C2-Idf*-Kopie 55 denkbar ist, da dieser funktionsfähig ist. Da die wenigen zur Verfügung stehenden Daten über den Promotor der bislang unbekanntes dritten Genkopie auf eine ähnliche Struktur hinweisen, ist auch ein theoretisch funktioneller Promotor für diese Genkopie vorstellbar. Über die Funktionalität des *Qb*-Promotors mit inseriertem *CACTA*-Element können bislang keine Aussagen gemacht werden. Es ist jedoch zu vermuten, dass die Insertion eher einen ungünstigen Einfluss auf die Expression dieser Genkopie ausübt.

Bei Betrachtung der vorliegenden Ergebnisse aus den molekularen Untersuchungen der *C2-Idf*-Mutante lässt sich der Mechanismus der dominanten dosisabhängigen Inhibition der *C2-Idf*-Mutation nicht eindeutig klären. Es können jedoch folgende Hypothesen über die molekularen Mechanismen der *C2-Idf*-Mutation postuliert werden:

Antisense-Hypothese: Es gibt Beispiele bei Pflanzen und anderen Eukaryoten, wo den LTR-Bereichen von Retrotransposons eine Promotor-Aktivität zugeschrieben wird (Bennetzen, 2000; Esnault *et al.*, 2000; Maestre *et al.*, 1995; Boeke, 1997). Da im Exon 2 der *C2-Idf*-Kopie 55 ein Retroelement vorliegt, könnte es sein, dass durch die aktivierende Wirkung seines 3'-LTR-Bereiches diese *C2*-Kopie in entgegengesetzter Richtung transkribiert wird und eine um 77 Basen verkürzte antisense *C2*-mRNA entsteht. Diese könnte die von anderen Kopien transkribierte sense *C2*-mRNA durch die Bildung von RNA-Doppelsträngen inaktivieren. Die RNA-Doppelstränge (dsRNA) können dann Ziel für spezifische RNasen sein (Bass, 2000;

Matzke *et al.*, 2001). Auf diese Weise könnte die Abwesenheit der C2-spezifischen Transkripte in der C2-*Idf*-Linie erklärt werden, auch wenn die dritte Genkopie vollständig funktionell wäre. Der inhibitorische Charakter des C2-*Idf*-Allels auf das C2-Wildtyp-Allel kann erklärt werden, wenn die Promotor-Aktivität des LTRs ausreicht, um genügend antisense Transkripte für die Inhibierung der durch die reziproken Kreuzungen eingebrachten ein oder zwei Wildtyp-Allele herzustellen. Da mit Zunahme der Wildtyp-Allele auch eine gewisse Zunahme der C2-Transkripte beobachtet werden kann (Abb. 3.1-2), ist ein Dosiseffekt, hervorgerufen durch eine definierte Menge an Antisense-Transkripten, durchaus vorstellbar. Allerdings ist einzuwenden, dass die Transkriptmenge des sehr homologen zweiten Chalkonsynthasegens *Whp* offensichtlich nicht durch potentielle C2-Antisense Transkripte beeinflusst wird (Abb. 3.1-2). Deshalb liegt vermutlich ein komplizierterer Regulationsmechanismus vor.

Das Auftreten von natürlichen antisense-RNAs in Eukaryoten ist mehrfach beschrieben worden (Mol *et al.*, 1990; Meins, 2000; Vanhee-Brossollet und Vaquero, 1998; Cock *et al.*, 1997; Jung-Ha *et al.*, 1998; Vaucheret, *et al.*, 2001; Ansaldi *et al.*, 2000). Antisense RNA kann eine Ursache für die als „epigenetic silencing“, bezeichnete Abschaltung von Genen sein. Dabei handelt sich um transkriptionale (TGS – transcriptional gene silencing) und post-transkriptionale (PTGS – post-transcriptional gene silencing) Genregulation durch antisense-RNA (RNAi-interfering). Die TGS-Regulation erfolgt durch Modifizierung von DNA, z.B. Methylierung von homologen DNA-Bereichen. Bei der posttranskriptionalen Regulierung handelt sich um kleine antisense RNAs (siRNA – short interfering RNA), die komplementäre mRNA binden (Bass, 2000, 2001; Sharp, 1999, 2001). Diese dsRNA werden mit Hilfe von zellulären, bislang nicht charakterisierten Enzymen markiert und mit Hilfe von RNAsen abgebaut.

Die RNAi wurde zum ersten Mal bei dem Nematoden *Caenorhabditis elegans* gefunden (Fire *et al.*, 1998) und später in mehreren Organismen nachgewiesen (Muskens *et al.*, 2000; Schneider *et al.*, 2001).

Im Genom des Menschen kommen etwa 100 bis 500 Tausend Kopien von LINEs-Retrotransposons vor (Kazazian *et al.*, 1998; Singer *et al.*, 1993). Wie bereits erwähnt, können die LTRs von Retrotransposons direkt oder invers orientiert vorliegen. Manche LTRs besitzen eine Promotor-Aktivität. Die Untersuchungen von

Speek (2001) zeigen, dass durch die Aktivität eines antisense vorliegenden Promotors eines LTRs die an das Transposon angrenzenden Gene transkribiert werden können, so dass antisense Gentranskripte entstehen können. Ein weiteres Beispiel einer Beteiligung von Retroviren an der Genregulation durch antisense Inhibition beim Menschen liefern die Daten von Schneider *et al.* (2001). Im Intron 9 eines C4-Gens fanden die Autoren eine inverse Insertion eines Retrovirus HERV-K. Sie konnten außerdem antisense HERV-K spezifische Transkripte nachweisen. Dabei war die Expression des C4-Gens signifikant reduziert.

Es liegen verschiedene Berichte vor, dass in Tandemanordnung liegende Gene sehr häufig IR (inverted repeats) enthalten und sensitiver für „gene silencing“ sind, als einzeln vorliegende Gene (Muskens *et al.*, 2000). Dies wurde sowohl anhand von transgenen Pflanzen, bei welchen die „Tandems“ künstlich konstruiert und dann transformiert wurden, als auch bei den durch Mutationen natürlich entstandenen „Tandems“ (endogene) beobachtet (Muskens *et al.*, 2000). Nachfolgend sollen einige Beispiele der „endogenen tandems“ beschrieben werden, für welche „gene silencing“ gezeigt werden konnte. In der Abbildung 4.1-3 sind natürlich vorkommende Genstrukturen gezeigt, die mit dem „gene silencing“ assoziiert sind.

Bei *Antirrhinum majus* sind zwei Mutanten des *nivea*-Gens charakterisiert: *niv-525* und *niv-571* (Coen und Carpenter, 1988; Bollmann *et al.*, 1991). Das *nivea*-Gen kodiert für die *Chalkonsynthase*. In dem dominanten *niv-525*-Allel liegt eine direkt orientierte Genkopie und eine invers orientierte Insertion von 207 Basen vor, die 62 Basen des Promotors und 145 Basen des ersten Exons des *nivea*-Gens enthält. In dem *niv-571*-Allel liegen, ähnlich wie bei dem *C2-Idf*-Allel, drei *nivea*-Kopie vor. Eine der drei *nivea*-Kopien ist invers orientiert. Bislang konnte nicht nachgewiesen werden, ob die Abschaltung der mutierten Allele einer PTGS oder TGS unterliegen.

Bei Sojabohnen wurden ebenfalls Mutanten des *CHS*-Gens gefunden, die der *C2-Idf*-Mutation ähneln (Todd und Vodkin, 1996). Die Struktur der dominanten *I'* und *I*-Allele ist unterschiedlich (Abb. 4.1-3). In dem *I'*-Allel liegen drei Kopien des *Chs*-Gens (*Chs1*, *Chs3* und *Chs4*) vor, von denen zwei invers orientiert sind. In dem *I*-Allel liegt im Vergleich zu dem *I'*-Allel noch eine weitere Genkopie vor, die durch Duplikation der *Chs1*-Kopie entstanden ist. Die Orientierung dieser Kopie ist nicht bekannt. Die Untersuchungen von Todd und Vodkin (1996) zeigen, dass das

dominante *I*-Allel den Promotor des *CHS*-Wildtypgens beeinflusst, was zu einer Reduktion der *Chs*-Transkripte führt.


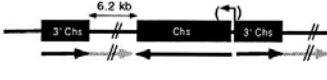


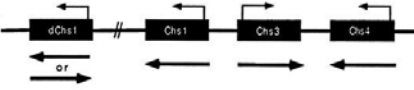
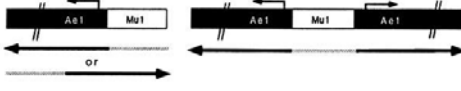
Pflanze	Gen	Struktur	Referenz
Antirrhinum	'nivea' <i>niv-525</i>		Coen and Carpenter, 1988
	<i>niv-571</i>		
Arabidopsis	<i>PAI1-PAI4</i>		Luff et al., 1999
Soybean	'inhibitor' <i>ij</i>		Todd and Vodkin, 1996
	<i>I</i>		
Maize	<i>Ae1-5180</i>		Stinard et al., 1993

Abb. 4.1-3: Endogen vorkommende, in Tandemanordnung liegende Gene mit Inverted Repeats aus verschiedenen Pflanzen (übernommen von Muskens et al., 2000). In der Abbildung sind mutierte Allele aus Pflanzen dargestellt, die mehrere Genkopien enthalten. Die Orientierung der Genkopien ist mit Pfeilen gezeigt. Die gezeigte Allele sind mutierte Allele der folgenden Gene: das Chalkonsynthasegen – *nivea* (*Chs*) – aus *Antirrhinum majus*; das Phosphoribosylanthranilate - isomerase-Gen (*PAI*) – aus *Arabidopsis thaliana*; das Chalkonsynthasegen (*Chs*) – aus Sojabohnen; das Amylose extender1 - Gen(*ae1*) – aus Mais.

Aus Mais wurde das dominante *Ae1-5180*-Allel des *ae1*-Gens (*amylose extender1*) beschrieben, welches die Expression des Wildtypallels inhibiert (Stinard et al., 1993). Das *Ae1-5180*-Allel entstand durch die Aktivität eines Mutator Transposons und enthält sowohl eine direkt als auch eine invers orientierte Kopie des *ae1*-Gens (Abb. 4.1-3). Auch bei diesem Beispiel ist nicht bekannt, auf welche Weise das *Ae1-5180*-Allel die Expression des Wildtypallels beeinflusst.

Paramutation ist eine weitere Art von natürlich vorkommendem „gene silencing“ in Pflanzen (Coe, 1968; Hollick *et al.*, 1997; Walker und Panavas, 2001; Fedoroff, 1995; Chandler *et al.*, 2000; Dooner und Nelsson, 1977). Paramutation wird als Interaktion zwischen einem wirkenden „paramutagene“ und einem sensitiven „paramutable“ Allel definiert. Dabei vererbt das sensitive Allel durch Meiose eine reduzierte Genexpression. Paramutation wurde für mehrere Gene beschrieben, unter anderem auch für Regulatorgene der Anthocyanbiosynthese aus Mais: *B* (Stam *et al.*, 2001; Bebele *et al.*, 2001), *Pl* (Jay, 2001) und *P* (Goettel und Messing, 2001; Sidorenko *et al.*, 2001).

In wieweit Mechanismen des „gene silencing“ durch „antisense“ Expression oder der Paramutagenese an der Ausprägung des *C2-Idf*-Allels beteiligt sind, ist bislang unklar. Die Ähnlichkeiten zwischen den in der Literatur beschriebenen Allelen und dem *C2-Idf*-Allel sind jedoch eindeutig.

Methylierung-Hypothese: Es ist bekannt, dass Methylierung und Genexpression zusammenhängen (Doerfler, 1984; Zhang *et al.*, 2000). Ein geringerer Methylierungsgrad korreliert häufig mit einer aktiven Genexpression während stark methylierte Gene nicht oder sehr schwach transkribiert werden. Es ist deshalb vorstellbar, dass aufgrund einer starken Methylierung des *C2-Idf*-Allels keine *C2*-spezifischen Transkripte in dieser Linie hergestellt werden. Das Restriktionsenzym *AvaI* ist methylierungssensitiv und schneidet spezifisch methylierte Sequenzen. Das Enzym schneidet theoretisch aus dem *C2*-Wildtypallel und aus dem *C2-Idf*-Allel das vollständige Intron heraus, wenn die Schnittstellen nicht methyliert sind. In der Southern-Analyse der mit *AvaI* geschnittenen Wildtyp- und *C2-Idf*-gDNA mit einer *C2*-Intron-Sonde konnte bei dem Wildtyp eine 1,5 kb Bande und bei der *C2-Idf*-Mutante keine Bande detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Dieses Ergebnis stimmt mit Daten von Borchert (1998) überein und unterstützt die Vermutung, dass das *C2-Idf*-Allel stärker methyliert ist als das Wildtypallel. Möglicherweise erklärt dies auch die bei der Klonierung des *C2-Idf*-Allels entstandenen Schwierigkeiten (siehe oben). In wieweit Methylierung an dem dominant inhibitorischen Einfluss des *C2-Idf*-Allels beteiligt sein könnte, ist unklar.

Repressorprotein-Hypothese: Eine weitere denkbare Erklärung für die Ausprägung der *C2-ldf*-Mutation ist die Anwesenheit eines linienspezifischen Regulatorproteins in der *C2-ldf*-Linie, das inhibierend auf die Transkription des *C2*-Gens wirkt. Da die *C2-ldf*-Mutation stabil vererbt wird, ist eine Cosegregation dieses potentiellen Repressors mit dem *C2-ldf*-Allel zu postulieren. Die Expression der anderen an der Anthocyanbiosynthese beteiligten Gene wäre durch diesen Repressor nicht beeinflusst, da die Ergebnisse der Expressionsanalysen zeigen, dass mit der Zunahme der *C2-ldf*-Allele zwar eine Reduktion der *C2*-spezifischen Transkripte erfolgt, die Transkriptmenge der anderen Regulator- und Strukturgene jedoch relativ unverändert bleibt (Abb. 3.1-2).

Der mögliche Repressor in der *C2-ldf*-Linie könnte die Transkription des *C2*-Gens in ähnlicher Weise unterbinden, wie das *In*-Gen negativ auf das *Whp*-Gen im Aleuron wirkt (Burr *et al.*, 1996). Ein weiteres Beispiel für die inhibitorische Wirkung auf Gene der Anthocyanbiosynthese liefert die Analyse des *a3*-Gens aus Mais. Das *a3*-Protein übt, ähnlich wie das *In*-Protein, im Pflanzengewebe einen hemmenden Einfluss auf das regulatorische Gen *B* aus (Styles und Coe, 1986; Heeckeren, *et al.*, 1996).

Denkbar ist, dass es sich in der *C2-ldf*-Linie um eine Mutation eines noch unbekanntem Regulatorgens handelt, die einen Transkriptionsaktivator in einen Repressor umgewandelt hat. Möglicherweise könnte es sich auch um eine Mutation eines bislang unbekanntem Repressors handeln, dessen inhibierenden Effekt durch die Mutation weiter verstärkt wird. Beispiele dafür sind die Mutationen *C1-I* und *InD*. Das *C1-I*-Allel („*I*“, - *Inhibitor*) ist ein dominant inhibitorisches Allel des *C1*-Regulatorgens, das die Anthocyanbiosynthese im Aleuron verhindert (Coe, 1962; Cone *et al.*, 1986). Bei dieser Mutation handelt es sich um eine Insertion im Bereich des dritten Exons des *C1*-Gens, welche zu einem verkürzten putativen *C1-I* Protein führt. In diesem Protein ist die transaktivierende Domäne, verglichen mit der Domäne des *C1*-Proteins aus dem Wildtyp, verändert (Paz-Ares *et al.*, 1990). Das *InD*-Allel (*Intensifier dilute*) ist ein mutiertes Allel des *In*-Regulatorgens und ist ebenfalls dominant gegenüber dem Wildtypallel. Die Untersuchungen von Rojek (1996) zeigen, dass sich das putative *InD*-Protein vom *In*-Protein des Wildtyps im Bereich der funktionalen Domäne geringfügig unterscheidet.

Die Identifizierung eines neuen Regulorgens aus Mais (Selinger und Chandler, 1999), das zusammen mit dem *C1* und *R*-Gen für die Induktion der Strukturgene der Anthocyanbiosynthese notwendig ist, ist ein Hinweis auf die Beteiligung weiterer, bislang nicht identifizierter, Regulorgene der Anthocyanbiosynthese im Aleuron. Das Protein des von Selinger und Chandler identifizierten *pac1*-Gens (*pale aleuron color1*) induziert gemeinsam mit den *C1* und *R*-Proteinen die Promotoren der *C2*-, *A1*- und *Bz1*-Gene im Aleuron und Scutellum. Die Sequenz des *pac1*-Gens hat eine hohe Homologie zur Sequenz der Regulorgene der Anthocyanbiosynthese *ttg1* aus *Arabidopsis* und *an11* aus Petunie (Charles *et al.*, 2001). Das mutierte Allel dieses Gens, *pac1-ref*, reduziert die Transkriptmenge der Strukturgene *C2*-, *A1*- und *Bz1*. Diese Expressionshemmung erfolgt jedoch nur im Aleuron und nicht in dem vegetativen Gewebe der Pflanze. Es wurden außerdem zwei weitere *pac*-Gene identifiziert *pac5* und *pac7*. Eine Mutation des *pac5*-, *pac7*-Gens führt sowohl in vegetativen als auch in reproduktiven Geweben zur Reduktion der Expression der *B1*-, *C1*-Regulorgene und des *A1*-Strukturgens der Anthocyanbiosynthese (Lavin *et al.*, 2001).

Es ist denkbar, dass an der Induktion der Promotoren von Strukturgenen der Anthocyanbiosynthese im Aleuron außer dem *pac1*-, *R*- und *C1*-Protein weitere, noch nicht identifizierte Faktoren beteiligt sind und Mutationen der zugehörigen Gene eine Auswirkung auf die übrigen Gene der Anthocyanbiosynthese haben. Zukünftige Untersuchungen müssen zeigen, ob neben *C1* und *R* andere trans-regulatorische Elemente an der Ausprägung des *C2-ldf*-Allels beteiligt sind bzw. ob und welche der angesprochenen Theorien sich letztendlich als richtig erweist.

4.2 Die *C1^S*-Mutante

Um ein Bild von der Expression der Anthocyanbiosynthesegene im Aleuron der *C1^S*-Mutante zu erhalten, wurden Expressionsanalysen mittels RT-PCR durchgeführt (3.1). Das Ergebnis dieser Analyse zeigt, dass in dieser Linie alle untersuchten Anthocyanbiosynthesegene gegenüber der Wildtyp-Linie verstärkt exprimiert werden (Abb. 3.1-2).

Beim Vergleich der Expression zwischen den zwei Chalkonsynthasegenen *C2* und *Whp* im Aleuron des Wildtyps ist auffallend, dass die Transkriptionsrate dieser Gene sehr unterschiedlich ist. Während das *C2*-Gen verhältnismäßig stark exprimiert wird, ist eine konstitutive schwächere Expression des *Whp*-Gens zu beobachten. Eine vergleichbare *Whp*-Transkriptmenge konnte auch in den anderen untersuchten Linien (*C2-Idf*, *C2-Idf/wt*; *wt/ C2-Idf*) festgestellt werden, jedoch nicht in der *C1^S*-Linie, bei der die *Whp*-Expression erheblich stärker ist (Abb. 3.1-2). Dies ist interessant, da im Gegensatz dazu die Expression des *C2*-Gens in der verschiedenen Linien sehr unterschiedlich ist. Die Expression des *Whp*-Gens stellt, indem nur eine veränderte Expression in der *C1^S*-Linie und nicht in einer der anderen Linien festgestellt wurde, eine Ausnahme dar.

Zunächst sollen mögliche Ursachen für die gegenüber dem *C2*-Gen schwächere Expression des *Whp*-Gens im Wildtyp aufgrund der genomischen Sequenz dieser Gene diskutiert werden.

Mehr als 100 *Chalkonsynthase*-Gene, die eine hohe Sequenzhomologie von bis zu 80% auf Aminosäureebene aufweisen, wurden aus verschiedenen höheren Pflanzen kloniert (Yamazaki *et al.*, 2001; Durbin, *et al.*, 2000; Niesbach-Klößgen *et al.*, 1987). Auffallend ist das Vorhandensein von mindestens zwei *CHS*-Genen in den meisten Spezies. Dies ermöglicht es, dass sich die Gene im Laufe der Evolution auseinanderentwickeln können, so dass nur ihre kodierenden Regionen zueinander homolog bleiben. Die nicht kodierenden Bereiche können aufgrund eines geringeren Selektionsdrucks durch Mutationen, z.B. durch die Aktivität von Transposons, verändert werden, was zu einer unterschiedlichen Regulation dieser Gene hinsichtlich ihrer Gewebespezifität oder Expressionsstärke führen kann.

In dem kodierenden Bereich weisen beide Chalkonsynthasegene aus Mais eine Homologie von 95% zueinander auf (Wienand *et al.*, 1986; Franken, 1991). Größere Unterschiede sind, wie zu erwarten, in den nicht kodierenden Regionen und im Promotor vorhanden (Abb. 1.1.1-1). Wie bereits erwähnt wurde, wird die Expression von Strukturgenen des Anthocyanbiosyntheseweges gemeinsam von *myc*- und *myb*-homologen Transkriptionsfaktoren induziert, welche einer lichtabhängigen Regulation unterliegen (Kirby und Styles, 1970; Taylor and Briggs, 1990; Goff *et al.*, 1990). In vielen Promotoren der Strukturgene kann man deshalb zwei regulatorische Regionen definieren: Erstens potentielle Bindestellen für *myc*-

und *myb*-homologe Transkriptionsfaktoren und zweitens Elemente für die lichtabhängige Genregulation (UV-Boxen I und II; Ludwig *et al.*, 1989; Schulze-Lefert *et al.*, 1989). Allerdings ist sowohl die Anordnung der einzelnen Elemente im Promotor, die Anzahl der Binde-Motive für die *myc*- und *myb*-ähnlichen Proteine sowie der Abstand zwischen diesen Motiven im Promotor von Gen zu Gen sehr variabel. Es ist denkbar, dass diese Variabilität zu einer unterschiedlichen Genexpression führt.

Beim Vergleich des *C2*- und des *Whp*-Promotors aus dem Wildtyp hinsichtlich dieser Elemente ist auffallend, dass die Anzahl der im *Whp*-Promotor vorliegenden putativen *myc*- und *myb*-Erkennungssequenzen geringer und der Abstand zwischen ihnen größer ist als im *C2*-Promotor. Außerdem sind die Homologien zur Consensussequenz der *myc*-Bindestelle im *Whp*-Promotor niedriger als beim *C2*-Gen. Es ist deshalb möglich, dass diese Unterschiede mit einer reduzierten Expression des *Whp*-Gens im Vergleich zu dem *C2*-Gen zusammenhängen.

Als weitere denkbare Ursache der unterschiedlichen Expression beider *Chalkonsynthasegenen* könnte eine unterschiedliche Methylierungsrate sein. Es gibt Studien, die zeigen, dass Methylierungsstärke eines Gens eine entscheidene Rolle bei der Regulierung seiner Expression spielen kann und häufig hängt sie mit einer Expressionsrate zusammen (Doerfler, 1984). Die Untersuchungen von Zhang *et al.* (2000) an dem *P1*-Regulatorgen der Anthocyanbiosynthese aus Mais zeigen, dass Methylierungsstärke des *P1*-Promotors mit der Expression dieses Gens und dementsprechend mit dem Phänotyp korreliert (Zhang *et al.*, 2000; Sidorenko und Peterson, 2001). Das *Prr*-Allel ist im Vergleich zu den anderen *P1*-Allelen stärker methyliert und die *Prr*-Transkriptmenge deutlich reduziert sind. Außerdem haben sie gezeigt, dass auch gewebespezifische Expression des *P1*-Gens von Methylierungsstärke seines Promotors abhängt (Zhang *et al.*, 2000). Möglicherweise ist die geringe *Whp*-Genexpression im Vergleich mit der Expression des *C2*-Gens auf die stärkere Methylierung des *Whp*-Promotors, zurückzuführen. Um es zu untersuchen soll Methylierungsanalyse mit den Promotoren beider *Chalkonsynthasegenen* durchgeführt werden.

Im folgenden Abschnitt werden Experimente diskutiert, die Erklärungen für die verstärkte Expression des *Whp*-Gens in der Linie *C1^S* liefern sollten.

Analyse der *Whp*-cDNA aus der *C1^S*- und *inc2Whp*-Linie

Zur Untersuchung der verstärkten Expression des *Whp*-Gens in der Linie *C1^S* war es erforderlich, die *Whp*-cDNA und den *Whp*-Promotor-Bereich dieser Linie zu klonieren, um diese mit der Sequenz des *Whp*-Gens bzw. der *Whp*-cDNA aus dem Wildtyp vergleichen zu können (3.3, 3.4). Da bislang nur die genomische Sequenz des *Whp*-Gens aus der Linie *Inc2Whp* bekannt war und alle bisherigen Untersuchungen zur Klonierung einer *Whp*-cDNA erfolglos waren (Franken *et al.*, 1991; Rojek, unveröffentlicht), lagen zu Beginn dieser Arbeit keine Daten über eine nachgewiesene funktionelle *Whp*-cDNA vor. Deshalb war es notwendig, auch eine entsprechende Wildtyp-cDNA zu klonieren. Ein geeignetes System stellte hierfür die Linie *inc2Whp* dar, da dort von beiden Chalkonsynthasegenen nur das *Whp*-Gen funktionell ist (Coe und Neuffer, 1977).

Zur Klonierung der *Whp*-cDNAs wurde die aus Maiskörnern isolierte Gesamt-RNA mit Oligo-dT-Primern mittels reverser Transkriptase in die komplementäre DNA umgeschrieben. Aus dieser cDNA-Bank wurde die *Whp*-cDNA mittels einer PCR mit *Whp*-spezifischen Primern amplifiziert (3.3.1).

Der Sequenzvergleich der aus den Linien *C1^S* und *inc2Whp* klonierten *Whp*-cDNAs mit der genomischen *Whp*-Sequenz des Wildtyps (Franken *et al.*, 1991) zeigte, dass sich beide cDNAs zum Teil von dem bislang bekannten genomischen *Whp*-Klon unterscheiden. Die Sequenzunterschiede befinden sich hauptsächlich im mittleren Bereich des zweiten Exons (Abb. 3.3.1-5), während ca. 45 Basen hinter dem Startkodon und 120 Basen vor dem Stoppkodon zu dem genomischen *Whp*-Klon identisch sind.

Bei dem Sequenzvergleich der klonierten *Whp*-cDNAs mit der *C2*-cDNA (Wienand, unveröffentlicht) wurde überraschend festgestellt, dass die in den *Whp*-cDNAs gefundenen Sequenzunterschiede im mittleren Sequenzbereich der Sequenz der *C2*-cDNA entsprechen. Dies bedeutet, dass beide klonierten *Whp*-cDNAs wie chimäre Sequenzen aus den beiden Chalkonsynthasegenen aussehen (Abb. 3.3.1-5). Um Amplifikationsartefakte auszuschließen, wurde die Sequenz der *Whp*-cDNA aus der Linie *inc2Whp* durch die Klonierung und Sequenzanalyse eines

genomischen Exon2-Fragmentes, welches den chimären Bereich abdeckt, aus dieser Linie bestätigt (3.3.3).

Auch der Vergleich der aus den klonierten *Whp*-cDNAs, der *C2*-cDNA und dem *Whp*-Gen abgeleiteten Aminosäuresequenzen zeigt, dass sich die *Whp*-cDNAs besonders im Bereich des Exons 2 vom genomischen *Whp*-Klon von Franken *et al.* (1991) unterscheiden (Abb. 3.3.2-1). Von den 21 gefundenen Unterschieden in der Aminosäuresequenz dieser *Chalkonsynthasen* sind zehn nicht-konservative und elf konservative Veränderungen. Der Vergleich mit *Chalkonsynthasen* anderer Organismen zeigt, dass diese Veränderungen vermutlich nicht die Funktionsfähigkeit des Enzyms beeinflussen (Niesbach-Klöggen, 1987; Durbin, *et al.*, 2000).

Es ist nicht zu erklären, wie der chimäre Charakter des *Whp*-Gens in den Linien *C1^S* und *inc2Whp* entstanden ist. Da bereits das Gen in der Linie *inc2Whp* die Sequenzunterschiede aufweist, sind posttranskriptionale Mechanismen jedoch auszuschließen. In *Arabidopsis* konnte eine nicht homologe Rekombination zwischen sehr ähnlichen Genabschnitten, die sich in Tandemanordnung befinden, nachgewiesen werden (Jelesko, *et al.*, 1999). Dies ist jedoch in diesem Fall eher unwahrscheinlich, weil das *C2*- und das *Whp*-Gen auf verschiedenen Chromosomen (2 und 4) vorliegen (Wienand *et al.*, 1986; Franken *et al.*, 1991). Falls eine Rekombination Ursache wäre, dann müsste es sich um ein Doppel-Cross-over zwischen dem *C2*- und dem *Whp*-Gen gehandelt haben. Der umgetauschte Bereich ist jedoch so klein, dass die Rekombinationsfrequenz eines Doppel-Cross-over sehr gering wäre, da diese vom Abstand zwischen Genen oder Genbereichen abhängt. Je näher die Bereich auf einem Chromosom vorliegen, desto weniger Rekombinationen finden durch ein Doppel-Cross-over statt. Um diesen Zusammenhang weiter zu untersuchen, wäre auch die Klonierung der *C2*-Gene aus den Linien *C1^S* und *inc2Whp* notwendig.

Analyse der *Whp*-Promotorsequenzen aus der *C1^S*- und *inc2Whp*-Linie

Beim Sequenzvergleich der beiden klonierten *Whp*-cDNAs aus der *C1^S*- und der *inc2Whp*-Linie mit der genomischen *Whp*-Sequenz von Franken *et al.* (1991)

wurden im 5'-UTR-Bereich der *Whp*-cDNA aus der Linie *C1^S* erhebliche Sequenzunterschiede festgestellt (Abb. 3.3.1-5): Diese betreffen zwei Insertionen von jeweils 32 und 7 Basen, einen Nukleotidaustausch sowie eine Baseninsertion und eine Basendeletion. Demgegenüber ist der 5'-UTR-Bereich der *Whp*-cDNA aus dem *inc2Whp*-Genotyp vollständig mit der Sequenz des Wildtypgens (Franken *et al.*, 1991) identisch. Möglicherweise sind die spezifischen Sequenzunterschiede im 5'-UTR der *C1^S*-Linie für die verstärkte Expression des Gens verantwortlich.

Um weitere Sequenzunterschiede zu finden, wurden Promotor-Bereiche des *Whp*-Gens aus beiden Linien näher charakterisiert (3.4). Zur Untersuchung der Promotor-Sequenz des *Whp*-Gens aus den Linien *C1^S* und *inc2Whp* wurden die Promotor- und Promotor-5'-UTR-Bereiche mit *Whp*-spezifischen Primern mittels PCR aus genomischer DNA amplifiziert, die erhaltene Fragmente kloniert und sequenziert (Abb. 3.4-2, 3.4-3). Der Sequenzvergleich der klonierten Promotor-Bereiche zeigt, dass auch im Promotor des *Whp*-Gens aus der Linie *C1^S* weitere Veränderungen gegenüber dem *Whp*-Wildtypgen vorliegen (Abb. 3.4-3): Dabei handelt es sich um Deletionen von vier, zwei und einem Nukleotid; neun Nukleotidaustauschen; einer Duplikation von sieben Nukleotiden und drei Insertionen von einzelnen Nukleotiden.

Im weiteren Verlauf der Arbeit wurden die aus den Linien *C1^S* und *inc2Whp* isolierten Promotor-Bereiche hinsichtlich der Promotor-Aktivität mit Hilfe eines Luciferase-Reportergens in transienten Transformationsassays analysiert (3.5.3).

Analyse der *Whp*-Promotor-Aktivität aus der *C1^S*-Linie

Zur Klärung der Frage, ob die Änderungen im Promotor- und im 5'-UTR-Bereich für die verstärkte Expression des *Whp*-Gens in der *C1^S*-Linie verantwortlich sind, wurden entsprechende Promotor- Promotor-5'-UTR-Reportergen-Konstrukte hergestellt (3.5.1). Um die Aktivität des Promotors aus der Linie *C1^S* vergleichen zu können, wurden die gleichen Promotor-Reportergen-Konstrukte mit den *Whp*-Sequenzen aus der *inc2Whp*-Linie hergestellt (3.5.1). Da die *Whp*-Sequenz der Linie *inc2Whp* im klonierten Promotor- und 5'-UTR-Bereich mit der von Franken *et al.* (1991) klonierten genomischen *Whp*-Wildtypsequenz identisch ist (Abb. 3.4.-3),

werden die entsprechenden *inc2Whp*-Expressionskonstrukte nachfolgend als Wildtyp bezeichnet.

Alle Expressionskonstrukte wurden allein oder zusammen mit den für eine Induktion notwendigen Effektorgenen *C1* und *R* in Maisembryonen transient transformiert (3.5.3). Die ohne Effektorgene transformierten Promotor-Reporter-Konstrukte weisen eine geringe Grundaktivität der Expression auf. Diese könnte möglicherweise auf die Aktivität von im Scutellum synthetisierten Transkriptionsfaktoren zurückzuführen sein (Abb. 3.5.3-1). Es ist durchaus möglich, dass die Synthese dieser Transkriptionsfaktoren als Antwort auf die bei der Transformation verursachte Verletzung („mechanische Stress,“) ausgelöst wird.

Bei der Cotransformation der *Whp*-Promotor-5'-UTR-Genkonstrukte beider Linien mit den Effektorgenen *C1* und *R* wurde eine signifikante Reporter-Gen-Aktivität beobachtet. Damit konnte gezeigt werden, dass, ebenso wie bei dem *C2-ldf*-Promotor, eine Expression der Gene *C1* und *R* für die Induktion des *Whp*-Promotors notwendig ist. Unerwarteter Weise ist die Reporter-Gen-Aktivität des Konstruktes mit dem Promotor-5'-UTR aus der Linie *C1^S* deutlich niedriger als mit dem Promotor aus dem Wildtyp. Diese Ergebnisse widersprechen zunächst den Daten der Expressionsanalyse des *Whp*-Gens in der *C1^S*- und Wildtyp-Linie (Abb. 3.1-2).

Es ist denkbar, dass dieser Unterschied durch das Testsystem hervorgerufen werden und die transformierten Promotor-Reporter-Gen-Konstrukte anders als das endogene *Whp*-Gen reguliert werden. Möglicherweise sind noch weitere Faktoren an der Genaktivierung beteiligt, die gewebe- oder linienspezifisch exprimiert werden könnten. Auch die durch transiente Expression von *C1* und *R* stark verschobenen Mengenverhältnisse der Transkriptionsregulatoren könnten dabei eine Rolle spielen. Durch transiente Expressionsstudien in den Linien *C1^S* und *inc2Whp* könnten einige der möglichen Ursachen weiter untersucht werden.

Es ist bekannt, dass auch die 5'-UTR-, Intron- und 3'-UTR-Bereiche eines Gens bei der Expression eine stimulierende Wirkung auf die Transkription haben können (Mascarenhas *et al.*, 1990; Maas *et al.*, 1991; Sandhu *et al.*, 1998; Callis *et al.*, 1987). Deshalb wurden auch Konstrukte ohne den 5'-UTR-Bereich untersucht. Sowohl mit dem *C1^S*- als auch mit dem Wildtyp-Promotor wurde eine deutliche

Reduktion der *C1/R* induzierbaren Reporter-gen-Aktivität festgestellt (Abb. 3.5.3-1). Das weist darauf hin, dass der 5'-UTR-Bereich für die Expression des *Whp*-Gens bedeutsam ist. Die potentiellen Bindungsstellen für die Proteine *C1* und *R* liegen allerdings nur im Promotor-Bereich des *Whp*-Gens. Im 5'-UTR-Bereich konnten keine Sequenzmotive identifiziert werden, die als potentielle Bindungsstellen dienen könnten. Möglicherweise ist die 5'-UTR-Region deshalb essentiell für die Bindung anderer bei der Expression beteiligter Regulationsfaktoren, die eventuell zusammen mit den Produkten der *C1*- und *R1*- Gene einen transkriptionsaktiven Komplex bilden könnten.

Bei Mais ist eine Familie von DNA-Bindeproteinen, *dof* (DNA binding with one finger), bekannt, die an dem DNA-Bindemotiv AAAAGG bindet (Yanagisawa, 1995). Diese Motive wurden in mehreren Promotoren verschiedener Pflanzen gefunden. Zu den Mitgliedern dieser Zink-Finger-Proteinfamilie gehören sowohl Repressor- als auch Aktivator-Proteine (Yanagisawa und Sheen, 1998). Im Promotorbereich des *Whp*-Gens konnten potentielle DNA-Bindemotive für Proteine der *dof*-Familie identifiziert werden. In dem 5'-UTR-Bereich des *Whp*-Gens aus der *C1^S*-Linie liegt, im Vergleich zu dem *Whp*-5'-UTR des Wildtyps ein zusätzliches *dof*-Motiv in der *C1^S*-spezifischen 32-Basen Insertion vor. Das Vorhandensein dieses Sequenzmotivs zeigt, dass theoretisch, aufgrund kleiner Sequenzänderungen zusätzliche Bindemotive, wie z.B. für *dof*-ähnliche Proteine, entstehen können, die auch die Expression des *Whp*-Gens verändern könnten. Auch eine Interaktion von im 5'-UTR bindenden Faktoren mit den Transkriptionsfaktoren *C1* und *R* ist, wie zuvor angedeutet, vorstellbar.

Dementsprechend ist es auch denkbar, dass andere Genbereiche, neben dem bislang untersuchten Promotor und 5'-Bereich, essentiell für die verstärkte Transkriptionaktivierung des *Whp*-Gens in der *C1^S*-Linie sind. Um dies zu untersuchen, müsste man das vollständige *Whp*-Gen aus der Linie *C1^S* klonieren und Konstrukte mit Promotor, Intron und 3'-UTR hinsichtlich ihrer Wirkung auf das Reporter-gen in transienten Experimenten untersuchen.

4.3 Das *InD*-Gen inhibiert die durch *C1* und *R* induzierte Promotor-Aktivität der Chalkonsynthasegene

Das *myc*-homologe Protein des *In*-Gens (*Intensifier*) inhibiert die Aktivität des *Whp*-Gens gewebespezifisch im Aleuron (Coe und Neuffer, 1977). Das *InD*-Allel (*Intensifier dilute*) ist ein mutiertes Allel des *In*-Gens, das gegenüber dem Wildtyp-Allel dominant ist und eine stärkere Hemmung auf die Anthocyanbiosynthese ausübt (1.1.2). Wie bei der *C2-Idf*-Mutation ist bei den reziproken Kreuzungen eine Reduktion der Pigmentierung mit Zunahme des *InD*-Allels zu erkennen (Abb. 1.1.2-1, 1.1.2-3). Rojek (1996) konnte zeigen, dass die Expression der Chalkonsynthasegene im Aleuron der einzelnen Linien und der Kreuzungen nicht verändert ist. Allerdings nimmt die Menge des *CHS*-Proteins mit Zunahme der *InD*-Allele ab. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde von Rojek (1996) postuliert, dass das *InD*-Allel die Chalkonsynthasegene posttranskriptional reguliert. Aufgrund der Untersuchungen von Franken (1991) wurde dem *In*-Gen die Rolle eines Inhibitors zugeschrieben, der spezifisch posttranskriptional auf das *Whp*-Gen im Aleuron wirkt. Demgegenüber postulierten Burr *et al.* (1996), dass das *In*-Protein ein Transkriptionsrepressor ist, der durch Bindung bzw. Interaktion mit anderen *myc*-Proteinen die Expression der Strukturgene verhindert. Bisher konnte nicht geklärt werden, welches der Regulationsmodelle *in planta* zutrifft, so dass die genaue Funktionsweise sowohl des *In*-Proteins als auch des *InD*-Proteins bislang ungeklärt ist.

Im *InD*-Allel liegen zwei homologe Genkopien vor, *InD1* und *InD2*. Nur von einer der zwei Kopien, *InD1*, wird eine vollständige cDNA synthetisiert. Die putativen *In*- und *InD1*-Proteine weisen eine sehr hohe Homologie zu *myc*-ähnlichen Transkriptionsfaktoren auf, zu denen auch das *R* und das *B*-Gen gehören (Burr *et al.*, 1996; Rojek, 1996). Die Unterschiede zwischen diesen Proteinen liegen im Bereich der funktionalen Domäne. In den Sequenzen des *In*-, *InD1*- und *R*-Proteins konnten putative Kernlokalisationssequenzen identifiziert werden (Shieh *et al.*, 1993; Rojek, 1996). Sowohl für das *R*- als auch für das *InD1*-Protein konnte eine Kernlokalisierung durch transiente Importexperimente gezeigt werden (Goff *et al.*, 1992; Techen, unveröffentlicht). Die Kernlokalisierung des *InD1*-Proteins spricht eher für eine Funktion als Transkriptionsregulator auf DNA-Ebene.

Die Promotor-Aktivität der Anthocyanbiosynthesegene lässt sich mit Hilfe von transient transformierten Reporter-Gen-Konstrukten untersuchen. So konnte gezeigt werden, dass die Promotoren der Strukturgene *Bz1* und *A1* durch das *R* und *C1*-Protein indizierbar sind (Klein *et al.*, 1989; Bodeau und Walbot, 1992). In den in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Promotoranalysen wurde gezeigt, dass die Promotoren des *C2*- (*C2-Idf-55*) und des *Whp*-Gens (*wt*, *C1^S*) durch das *C1*- und das *R*-Protein induziert werden können (3.5.2, 3.5.3).

Um die Wirkung des *InD1*-Proteins auf die Promotoren dieser Strukturgene zu untersuchen, wurde das zu testende Promotor-Konstrukt gemeinsam mit der *InD1*-cDNA und den Effektorgenen *C1* und *R* in Maisembryonen transient transformiert. Jede dieser cDNAs stand dabei unter Kontrolle eines konstitutiven Promotors. Nach einer Inkubationsphase wurde dann der Einfluss der konstitutiv exprimierten Effektoren auf die Promotor-Reporter-Gen-Konstrukte untersucht (Abb. 3.5.-1, 3.5.4.). Durch diese Experimente sollten folgende Fragen geklärt werden:

- Kann das *InD1*-Protein das *R*-Protein in dem *R/C1*-Transkriptionskomplex ersetzen und so mit dem *C1*-Protein interagieren, dass eine Aktivierung der Promotoren erfolgt?
- Welchen Einfluss hat das *InD1*-Protein auf die gemeinsam durch das *C1*- und *R*-Protein hervorgerufene Promotor-Aktivität?
- Kann das *InD1*-Protein, aufgrund seiner Ähnlichkeit mit dem *R*-Protein, allein das Reporter-Gen aktivieren?

In den transienten Transformationen wurden das *C2-Idf-55*-Promotor-Fragment und der 0,5 kb Promotor-5'-UTR-Bereich des *Whp*-Gens aus den Linien *LC* und *C1^S* untersucht (Abb. 3.5.4-2, A, B). Aus den Ergebnissen dieser Experimente kann gefolgert werden, dass,

- das *C1*- und *R*-Protein gemeinsam aktivierend auf die getesteten Promotor-Reporter-Gen-Konstrukte wirken.

- die durch die Wirkung der Proteine *C1* und *R* hervorgerufene Promotor-Aktivität durch den Einfluss des *InD1*-Proteins bis zu 70% reduziert wird.
- das *InD1*-Protein allein nicht in der Lage ist, die untersuchten Promotor-Bereiche zu aktivieren.
- das *InD1*-Protein das *R*-Protein im *R/C1*-Komplex nicht in einer Weise ersetzen kann, die zu einer Genaktivierung führt.

Mit diesen Experimenten konnte gezeigt werden, dass das *InD1*-Protein hemmend auf die Promotoren beider *CHS*-Gene wirkt. Die Hemmung ist demnach nicht nur spezifisch für das *Whp*-Gen, sondern betrifft auch die Aktivität des *C2-Idf-55*-Promotors (Abb. 3.5.4-2, A, B). Interessanterweise scheint selbst die gemessene Grundaktivität der *0,5Whp(C1^S)*- und *0,5Whp(LC)*-Promotor-Konstrukte, die bereits ohne Effektoren gemessen werden konnte, durch die Transformation mit dem *InD1*-Konstrukt reduziert zu werden. Eine gewisse Hemmung ist auch bei den entsprechenden Konstrukten ohne 5'-UTR-Bereich *0,4Whp(C1^S)* zu erkennen. Diese Hemmung ist jedoch nicht so ausgeprägt, wie mit den Konstrukten, die die 5'-UTR-Regionen enthalten. Möglicherweise deuten diese Ergebnisse auf eine Notwendigkeit der 5'-UTR-Region bei der *InD1*-abhängigen Repression hin.

Diese Ergebnisse stimmen mit der von Burr *et al.* (1996) postulierten Hypothese über eine transkriptionale Regulierung der Expression von Anthocyanbiosynthesegenen durch das *In*-Protein überein. Dabei vermuteten Burr *et al.*, dass die Hemmung der Transkription durch das *In*-Protein auf der Ausbildung von Heterodimeren mit anderen *myc*-Transkriptionsfaktoren basiert und so die Expression der Strukturgene verhindert werden könnte. Es könnte sich auch um Interaktion *In* mit *C1* handeln, die die Bildung von *C1/R*-Komplexe verhindern.

Franken *et al.* (1991) zeigten, dass das *In*-Gen seine hemmende Wirkung nur spezifisch auf das *Whp*-Gen im Aleuron ausübt. Da gezeigt wurde, dass das *InD1*-Protein auf die Promotoren beider Chalkonsynthesegene hemmend wirkt, kann man sich vorstellen, dass die unspezifischere Wirkung des *InD1* auf die geringen Änderungen in der Aktivierungsdomäne zurückzuführen ist. Um dies zu testen, sollte

zukünftig auch die Wirkung des *In*-Proteins auf die Promotoren beider Chalkonsynthasegene in transienten Experimenten untersucht werden.

Eine Interaktion des *B1*-Proteins mit dem *C1*- bzw. dem *C1-I*-Protein wurde sowohl *in vivo* mit dem „Two Hybrid“ System als auch in transienten Transformationen von Goff *et al.* (1992) nachgewiesen. Von Techen (unveröffentlicht) wurde die Interaktion zwischen *R*, *InD1*, *C1* und *C1-I*-Proteinen *in vivo* mit dem „Two Hybrid“ System untersucht. Sie konnte zeigen, dass *R* und *C1* bzw. *C1-I* miteinander interagieren können. Die dabei beobachtete Reporterogenaktivität war sehr stark. Eine schwache Aktivierung des Reportergens konnte auch mit einer Kombination von *C1* und *InD1* nachgewiesen werden, allerdings nur, wenn die Bindedomäne des „Two Hybrid“ Systems mit dem *C1*-Protein und die Aktivierungsdomäne mit dem *InD1*-Protein fusioniert wurde. Eine entgegengesetzte Fusion führte zu keiner Genaktivierung. Möglicherweise sind deshalb unspezifische Aktivitäten für die beobachtete Genaktivierung mit *C1* und *InD1* verantwortlich.

Bei einer transienten Transformation des *pAct1-R*-Genkonstruktes allein oder gemeinsam mit dem *pAct1-C1*-Genkonstrukt in Maisembryonen einer Linie mit mindestens einem funktionellen Chalkonsynthasegen, kommt es nach einer ca. 30 stündigen Kultivierung der Embryonen bei Licht zur Synthese von Anthocyanen. Sowohl durch die in dieser Arbeit durchgeführten transienten Transformationsexperimente, als auch durch die beschriebenen „Two Hybrid“ Analysen (Techa, unveröffentlicht) konnte nicht eindeutig geklärt werden, ob das *InD1*-Protein das *R*-Protein im Komplex mit dem *C1*-Protein ersetzen kann. Deshalb wurden Experimente durchgeführt, die auf der optischen Wahrnehmung induzierter Anthocyanbiosynthese basieren. Falls das *InD1*-Protein das *R*-Genprodukt ersetzt und zusammen mit dem *C1*-Protein die Anthocyanbiosynthese induziert, sollte es in Embryonen des passenden genetischen Hintergrundes (siehe oben) nach transienter Transformation zur Pigmentbildung kommen.

Um dies zu untersuchen, wurde die Intensität und Quantität von pigmentierten Zellen bei Embryonen nach transienter Transformation ausgewertet (3.5.4). In dem Experiment wurden Embryonen von zwei Maislinien verwendet, in welchen entweder

das *C2*-Gen (*in/in,C2/c2,whp/whp*) oder das *Whp*-Gen funktionsfähig ist (*in/in,c2/c2,Whp/Whp*).

Die erhaltenen Daten unterstützen die Ergebnisse der enzymatischen Assays (Tab. 3.5.4-1). Während die mit den *pAct1-C1/pAct1-R1*-Genkonstrukten transformierten Embryonen viele intensiv gefärbte Zellen enthielten, war die Anzahl der gefärbten Zellen bei zusätzlicher Verwendung des *InD1*-Konstruktes (*pAct1-C1/pAct1-R1/pAct1-InD1*) deutlich niedriger und weniger ausgeprägt. Bei den Embryonen, die mit dem *pAct1-R1*-Genkonstrukt transformiert wurden, war die Anzahl und die Intensität der gefärbten Zellen noch geringer, ebenso wie mit den Konstrukten *pAct1-R1* und *pAct1-InD1*, wo die Pigmentierung allein auf die Aktivität des *R*-Proteins zurückzuführen ist.

Bei den Proben, die mit dem *pAct1-InD1* allein oder mit dem *pAct1-InD1* zusammen mit dem *pAct1-C1*-Konstrukt transformiert wurden, konnte zu dem Zeitpunkt, bei dem mit den anderen oben genannten Genkonstrukten intensiv gefärbte Zellen beobachtet wurden, keine pigmentierten Zellen nachgewiesen werden. Allerdings konnte eine diffuse leichte rosa Färbung beobachtet werden. Dabei handelte es sich nicht um die Färbung, die bei dem Blindexperiment (nur Gold, ohne Genkonstrukte) oder auch mit dem *C1*-Genkonstrukt allein an der Verletzungsstelle entstand. Es ist deshalb nicht auszuschließen, dass das *InD1*-Protein die Anthocyanbiosynthese relativ ineffizient und mit einer Verzögerung durch Interaktion mit dem *C1*-Protein induzieren kann. Dies würde mit den Daten von Techen (siehe oben) korrelieren, die eine gewisse Interaktion von *InD1* und *C1* im „Two Hybrid“ System nachweisen konnte. Eine verzögerte Synthese des *CHS*-Proteins wurde von Rojek (1996) in der *InD*-Linie im Vergleich mit dem Wildtyp beobachtet. Bei dem Wildtyp konnte bei drei Stadien der Kornentwicklung eine relativ konstante *CHS*-Proteinmenge in Maiskörnern nachgewiesen werden. In der *InD*-Linie wurden dagegen erst 26 Tage nach der Pollinierung kleine Mengen des *CHS*-Proteins gefunden. Ob diese verzögerte Proteinsynthese auf die Anwesenheit des *InD1*-Proteins zurückzuführen ist, ist unklar.

Die Untersuchungen von Grotewold *et al.* (2000) zeigen, dass bereits eine Änderung von 5 Aminosäuren zwischen den homologen Proteinen *C1* und *P* im Bereich der *myb*-Domäne zu einer unterschiedlichen Regulation der

Anthocyanbiosynthesegene und veränderter Interaktion mit dem *R*-Protein führt. Wie bereits erwähnt, sind das *C1*- und das *P*-Protein *myb*-ähnliche Transkriptionsfaktoren, die gewebespezifisch exprimiert werden. Die Homologie zwischen den beiden Proteinen beträgt im Bereich der *myb*-Domäne 70%. In der *myb*-Domäne können drei Regionen unterschieden werden: Helix1 (R1), Helix2 (R2) und Helix3 (R3). Die Untersuchungen von Grotewold *et al.* (2000) im „Two Hybrid“-System zeigen, dass das *P*-Protein, im Gegensatz zu dem *C1*-Protein, nicht mit dem *R*-Protein interagiert. Die Interaktion erfolgt dagegen mit einem *P-C1*-Fusionskonstrukt, bei dem die R3-Region des *P*-Proteins durch die entsprechende Region des *C1*-Proteins ersetzt wurde. Das bedeutet, dass die R3-Region der *myb*-Domäne des *C1*-Proteins verantwortlich für die spezifische Interaktion mit dem *R*-Protein ist. Nach transienter Transformation mit den Promotoren der Gene *A1*- und *Bz1* konnten die Autoren zeigen, dass das *P*-Protein allein nur den *A1*-Promotor induziert und nicht den *Bz1*-Promotor. Im Gegensatz dazu induziert das *C1*-Protein beide Promotoren, jedoch nur in Gegenwart des *R*-Proteins.

Die Untersuchungen von Tuerck und Fromm (1994) zeigen, dass der *A1*-Promotor durch die Proteine *C1* und *B* sowie durch das *P*-Protein induziert wird. Grotewold *et al.* (1994) zeigten, dass die Induktion des *A1*- bzw. *Bz1*-Promotors in der Gegenwart der *C1*- und *R*-Proteine, oder auch mit dem *P*-Protein allein erfolgt. Diese Beispiele demonstrieren, dass homologe Proteine einer *myb*-Familie, aufgrund ihrer variablen Sequenz im Bereich der *myb*-Bindedomäne, mit verschiedenen Proteinen interagieren können, was wiederum zur differentiellen Regulation von Genexpression führt.

Bei den in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Experimenten mit dem *A1*-Promotor-Konstrukt konnten im Gegensatz zu den Ergebnissen mit den anderen Genkonstrukten keine aussagekräftigen Ergebnisse erhalten werden (Abb. 3.5.4-3, A, B). Die bereits sehr hohe Grundaktivität dieses Konstruktes ist vermutlich auf das Vorhandensein eines Verstärker-Introns aus dem *Shrunken*-Gen von Mais zurückzuführen (Mass *et al.*, 1991). Es ist auch denkbar, dass dieser Enhancer, der zwischen dem *A1*-Promotor und dem Reportergen integriert ist, eine mögliche Promotorinduktion durch die getesteten Transkriptionsaktivatoren beeinflusst (Schrell, 1991). Es scheint jedoch eine gewisse Induktion des Promotors durch *C1*

und *R* möglich. Insgesamt müssen die erhaltenen Daten für diesen Promotor aufgrund der sehr großen Streuung und geringeren Anzahl von Parallelexperimenten sehr kritisch betrachtet werden. Durch diese Experimente wird jedoch deutlich, wie viele unbekannte Faktoren transiente Expressionsanalysen beeinflussen können.

Littlewood und Evan (1994) beschreiben für basische Helix-Loop-Helix-Proteine (bHLH) aus unterschiedlichsten Organismen zahlreiche Möglichkeiten der Proteininteraktion. Diese kann sowohl zwischen Proteinen derselben Familie, als auch zwischen Proteinen aus verschiedenen Familien stattfinden. Aus den angeführten Beispielen geht hervor, dass spezifische Dimerisierung zwischen Proteinen mit verschiedenen Partnern erfolgen kann. Dies resultiert in unterschiedlichen Kombinationen der Proteine (Homodimere, Heterodimere) und hat auch unterschiedliche Bindenspezifitäten zur Folge. Dabei handelt es sich jeweils um eine spezifische Partnerschaft und nicht um eine unregelte Dimerisierung der Proteine. Nicht alle bHLH-Proteine können miteinander interagieren. Die Spezifität einer Protein-Interaktion wird von der Sequenz des α -Helix-Bereiches bestimmt. Eine Sequenzänderung des α -Helix-Bereiches ermöglicht neue Protein-Interaktionen. Dies kann wiederum die ursprüngliche Funktion der interagierenden Proteine ändern und als Folge davon auch die Regulation der Genexpression beeinflussen. Neben der Proteininteraktion sind für diese Gruppe von Transkriptionsfaktoren außerdem eine Vielzahl anderer Regulationsmechanismen, wie z.B. Phosphorylierung (Lüscher *et al.*, 1990) beschrieben.

Basierend auf den in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen ist davon auszugehen, dass diese komplexen Regulationsmechanismen auch bei den zu dieser Gruppe gehörenden Transkriptionsfaktoren *C1*, *R* und *In/InD1* anzutreffen sind.

Bei der Genregulation handelt es sich um eine komplexe Interaktion verschiedenster sowohl endogener als auch exogener Komponenten, die miteinander im Wechselspiel stehen und in ihrer Gesamtheit eine biologisch sinnvolle Genregulation zur Folge haben. Vielleicht können die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen an den Maismutanten *C2-Idf* und *C1^S* einen kleinen Beitrag zum Verständnis dieser komplizierten Vorgänge leisten.

4.4 Ausblick

Da durch die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen keine endgültige Aussage über die genomische Struktur des *C2-Idf*-Allels getroffen werden kann, sollten zukünftige Untersuchungen weiterhin die Vervollständigung des *C2-Idf*-Allels zum Ziel haben.

Aufgrund der Southern-Blot-Analysen ist zu vermuten, dass der Bereich des *C2-Idf*-Allels, der die drei *C2*-Kopien enthält, mindestens 21 kb lang ist. Um umfassende Informationen über die Organisation der drei Kopien zueinander zu bekommen, könnte versucht werden, diesen Bereich mit Hilfe von BAC- oder YAC-Bibliotheken zu klonieren.

Ob in dem *C2-Idf*-Allel eine der drei Kopien invers vorliegt und von dieser Kopie „antisense“ RNA synthetisiert wird, könnte durch Northern-Blot-Analysen mit einzelsträngigen RNA-Sonden untersucht werden. Alternativ sind auch Experimente mit RT-PCR vorstellbar.

Als eine mögliche Ursache der Expressionshemmung des *C2-Idf*-Allels wird verstärkte Methylierung vermutet. Um dies detaillierter zu untersuchen, sollte die *C2-Idf*-DNA mit methylierungssensitiven Restriktionsendonukleasen geschnitten werden. Da sich die Methylierung im Verlauf der Entwicklung verändern kann, sollten unterschiedliche Zeitpunkte hinsichtlich der Methylierung analysiert werden. Dabei wäre es interessant, auch DNA aus den reziproken Kreuzungen zwischen der *C2-Idf*-Linie und dem Wildtyp zu untersuchen, um so mögliche „gene silencing“ Effekte beim Wildtypgen zu charakterisieren.

Um Ursachen für die verstärkte Expression des *Whp*-Gens in der Linie *C1^S* zu finden, sollte untersucht werden, ob andere Genbereiche neben den bislang untersuchten Promotor und 5'-UTR-Bereichen für die verstärkte Transkription des *Whp*-Gens notwendig sind. Dazu müsste das vollständige *Whp*-Gen aus dieser Linie kloniert werden.

Um die Entstehung des chimären Exon2-Bereiches in den *Whp*-cDNAs aus den Linien *C1^S* und *inc2Whp* zu verstehen, müsste zunächst die genomische Sequenz des *C2*-Gens aus den beiden Linien kloniert werden.

Ob die verstärkte Expression des *Whp*-Gens in der *C1^S*-Linie auf das Vorkommen eines linienspezifischen Transkriptionsfaktors zurückzuführen ist, könnte möglicherweise durch transiente Analysen in Embryonen aus verschiedenen Maislinien, z.B. *C1^S* und *Lc* untersucht werden. Dabei ist jedoch zu berücksichtigen, dass das Gewebe, in dem die *Whp*-Expression natürlicherweise erfolgt (Aleuron) für transiente Studien methodisch bislang nicht zugänglich ist.

Es konnte gezeigt werden, dass das *InD1* Protein die *C1* und *R* vermittelte Promotor-Aktivität der beiden Chalkonsynthasegene in einem gewissen Umfang hemmt. Weiterführende Untersuchungen auf Proteinebene sind notwendig, um zu zeigen, ob und wie eine Interaktion der drei Regulatoren erfolgt. Dazu sind möglicherweise Experimente mit dem „Two Hybrid“ oder „One Hybrid System“ in Hefe oder Bakterien geeignet. Die Ergebnisse der angesprochenen Experimente können neue Informationen zum Verständnis grundlegender Mechanismen der Genregulation bei Mais liefern und damit auch einen Beitrag zum Verständnis von Genevolution und –diversifizierung leisten.

5. Zusammenfassung

Ein gut geeignetes Modellsystem für die Untersuchung von Genregulation und Genexpression stellt der Anthocyanbiosyntheseweg von Mais dar. Mutationen der daran beteiligten Gene lassen sich phänotypisch gut erkennen und haben einen geringen Einfluss auf die Entwicklung der Pflanze. Obwohl viele der am Anthocyanbiosyntheseweg beteiligten Struktur- und Regulatorgene seit langer Zeit bekannt und gut charakterisiert wurden, sind zahlreiche Fragen bezüglich der komplexen Regulation dieser Gene noch offen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, grundlegende Mechanismen der Genregulation am Beispiel von Genen der Anthocyanbiosynthese zu untersuchen. Dazu wurden zwei Maismutanten verwendet, die auffallende und entgegengesetzte Phänotypen der Kornfärbung aufweisen. Bei der einen handelt es sich um eine Mutation des Chalkonsynthasegens *C2*, die *C2-ldf* genannt wird. Die Körner der *C2-ldf*-Mutante sind farblos, da im Aleuron dieser Linie die Synthese der Anthocyane unterdrückt wird und das Schlüsselenzym der Biosynthese, die *Chalkonsynthase*, nicht vorhanden ist. Die *Chalkonsynthase* wird in Mais durch zwei Gene kodiert, *C2* und *Whp* (*white pollen*). Interessanterweise kann das *C2-ldf*-Allel das Wildtyp-Allel inhibieren, so dass die Kreuzung dieser Pflanzen mit dem Wildtyp zu einer verminderten Pigmentierung in den Körnern führt.

Die *C1^S*-Mutante ist ein Allel des regulatorischen *C1*-Gens und besitzt im Gegensatz zum Wildtyp eine verstärkte Pigmentierung und nahezu schwarze Körner. In beiden Mutanten *C2-ldf* und *C1^S* wurde die Expression verschiedener Struktur- und Regulatorgene der Anthocyanbiosynthese im Aleuron mittels RT-PCR untersucht, um so Rückschlüsse auf veränderte Transkriptionsmuster im Vergleich zum Wildtyp ziehen zu können.

Die Expressionsanalyse der *C2-ldf*-Mutante zeigt, dass in dieser Linie keine oder nur sehr wenig *C2*-spezifischen Transkripte vorliegen, die Expression der anderen Strukturgene aber unverändert ist. Durch Southern-Analyse und Klonierung ist bekannt, dass das *C2*-Allel in der *C2-ldf*-Mutante vermutlich aus drei *C2*-Genkopien besteht und diese veränderte Struktur des Allels Ursache für den Phänotyp ist. Bislang waren jedoch nur Teilsequenzen von zwei der Genkopien aus

C2-Idf (55 und *Qb*) bekannt. Deshalb sollte in dieser Arbeit die Struktur der drei Genkopien weiter vervollständigt werden.

Da aus einer λ -gDNA-Bibliothek ausschließlich Klone isoliert werden konnten, die dem bereits bekannten Klon 55 entsprachen, wurde das *C2-Idf*-Allel mittels PCR untersucht. Dabei konnten bislang unbekannte Teilbereiche, jedoch nicht das vollständige *C2-Idf*-Allel kloniert werden. Aufgrund der in dieser Arbeit erhaltenen Daten und früherer Analysen wird der in Abbildung 5-1 dargestellte Aufbau des Allels vermutet.

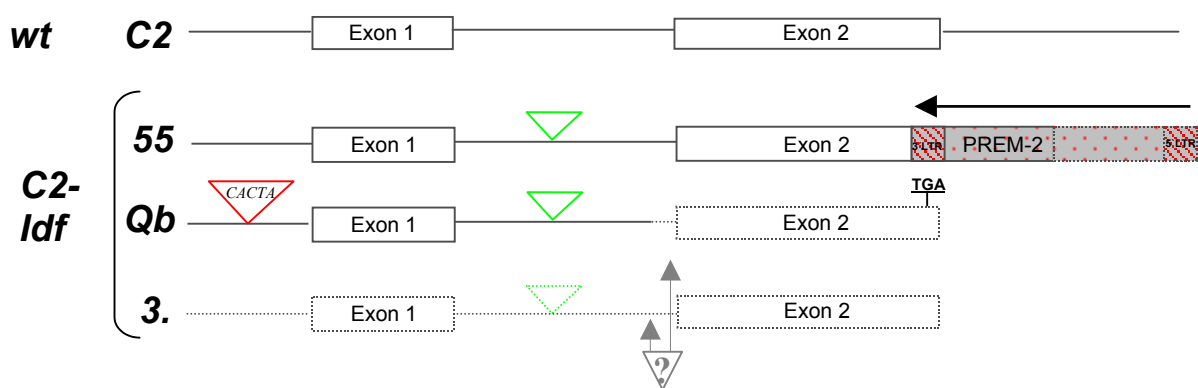


Abb. 5-1: Schematische Darstellung des *C2*-Wildtypgens (*wt*) und der vermuteten Struktur der drei genomischen *C2-Idf*-Kopien des *C2-Idf*-Allels. Die bekannten Genbereiche sind als Balken dargestellt. Die vermutete Genstruktur ist gepunktet. Der Pfeil zeigt die Orientierung eines im Klon 55 inserierten Retroelementes vom Typ *PREM-2*. In Rot ist die Insertion eines Transposons der *CACTA*-Familie gezeigt. Mit Grün ist ein gegenüber dem Wildtyp veränderter Intronbereich gekennzeichnet. Ein graues Dreieck mit Fragezeichen kennzeichnet eine putative Insertion in einer der *C2-Idf*-Kopien. Ob diese Insertion vorhanden ist und in welcher Kopie ist bislang unklar.

Aufgrund verschiedener Insertionen sind die drei Genkopien in *C2-Idf* unterschiedlich stark degeneriert. Die mit Promotor-Reportergen-Konstrukten durchgeführten Studien zeigen, dass der Promotor der *C2-Idf*-Genkopie 55 in transienten Assays funktionell ist und durch die *myc*- und *myb*-homologen Aktivatoren der Anthocyanbiosynthese *C1* und *R* induziert werden kann. Damit konnte erstmals molekular die Induktion eines *C2*-Promotors durch diese Transkriptionsfaktoren gezeigt werden. Basierend auf dem Modell der Allelstruktur werden verschiedene Mechanismen zur Erklärung des dominant inhibitorischen Charakters des *C2-Idf*-Allels diskutiert.

In der anderen untersuchten Mutantenlinie des regulativen Gens *C1*, *C1^S*, wurde unter anderem eine verstärkte Expression des zweiten Chalkonsynthasegens, *Whp*, beobachtet. Um den Grund für diese verstärkte Expression zu finden, wurden zunächst die cDNA und Teile des Promotor-Bereiches des *Whp*-Gens aus der Linie *C1^S* kloniert. Diese wurden dann mit einer funktionellen ebenfalls klonierten *Whp*-cDNA der Linie *inc2Whp* sowie der bislang bekannten genomischen *Whp*-Sequenz aus der Linie *InC2Whp* verglichen. Dabei wurde überraschenderweise bei beiden cDNAs aus *C1^S* und *inc2Whp* im mittleren Sequenzbereich ein Abschnitt mit Ähnlichkeit zum zweiten Chalkonsynthasegen *C2* und nicht zur einzigen bis dahin bekannten genomischen *Whp*-Sequenz gefunden. Mögliche Erklärungsmodelle dieses chimären Sequenzbereiches des *Whp*-Gens in den beiden untersuchten Linien werden angesprochen. Der Sequenzvergleich zeigte außerdem, dass sowohl im 5'-UTR-Bereich der cDNA als auch im klonierten Promotor-Bereich des *Whp*-Gens aus der *C1^S*-Linie deutliche Sequenzunterschiede zu den Wildtypsequenzen vorhanden sind. Um zu untersuchen, ob die gefundenen Unterschiede verantwortlich für die verstärkte Expression in dieser Linie sind, wurden Promotor- und Promotor-5'-UTR-Reporter-gen-Konstrukte hergestellt und in transienten Transformationsassays in Maisembryonen vergleichend mit den Wildtypsequenzen untersucht.

Es konnte gezeigt werden, dass auch der *Whp*-Promotor nur in Gegenwart der Transkriptionsregulatoren *C1* und *R* aktiv ist. Unerwarteterweise ist die Aktivität des klonierten Promotor-5'-UTR-Bereiches aus der Linie *C1^S* im Vergleich mit einem gleichen Konstrukt aus dem Wildtyp signifikant geringer. Möglicherweise sind noch weitere linien- oder gewebespezifisch exprimierte Faktoren für die verstärkte Expression in der *C1^S*-Linie notwendig. Auch andere bislang nicht untersuchte Genbereiche könnten dafür essentiell sein. Um dies zu untersuchen wurden die Experimente mit *Whp*-Promotor-Konstrukten ohne 5'-UTR-Bereich durchgeführt. Dabei konnte eine deutlich reduzierte Reporter-gen-Aktivität, sowohl mit dem Genkonstrukt aus der Linie *C1^S*, als auch mit dem Genkonstrukt aus dem Wildtyp festgestellt werden. Dies deutet auf eine wichtige Funktion des 5'-UTRs bei der *Whp*-Genregulation hin.

Im letzten Abschnitt der Arbeit wurde der Einfluss des Proteins *Intensifier* (*In*) auf die Promotor-Aktivität der beiden Chalkonsynthasegene in transienten Assays untersucht. Das *In*-Genprodukt ist ein *R*-homologes Protein. Die Anwesenheit des *In*-Allels führt zu einer Repression der Anthocyanbiosynthese in der Pflanze. Unter Verwendung des Proteins *InD1* des *Intensifier*-Allels *InD* konnte gezeigt werden, dass bei Cotransformation mit *C1* und *R* die durch *C1* und *R* induzierten Promotor-Aktivitäten um bis zu 70% reduziert werden. Dieses Ergebnis ist damit in Übereinstimmung mit der Annahme, dass das *InD*-Genprodukt einen Repressor der Anthocyanbiosynthese darstellt.

Die in der vorliegenden Arbeit gezeigten Experimenten geben einen Einblick in die komplexen Regulationsmechanismen der Anthocyanbiosynthese und können helfen, das Verständnis von Genregulation und -diversifizierung zu vertiefen.

6. Literaturverzeichnis

- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J. (1997): Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucl. Acids Res.* **25**: 3389-3402.
- Ansaldi, R., Chaboud, A., Dumas, C. (2000): Multiple S gene family members including natural antisense transcripts are differentially expressed during development of maize flowers. *Biol. Chem.* **275**(31): 24146-24155.
- Bass, B.L. (2000): Double-stranded RNA as a template for gene silencing. *Cell* **101**(3): 235-238.
- Bass, B.L. (2001): RNA interference: The short answer. *Nature* **411**: 428-429.
- Baum, K. (1998): Analyse der *cis*-regulatorischen Bereiche und der *trans*-Faktoren des *RBCS2* Promotors aus Tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.). Dissertation, Universität Hamburg.
- Belele, C., Stam, M., Lennertz, P., Ramakrishna, W., Bennetzen, J., Chandler, V. (2001): Cloning and characterisation of a 106 kb region upstream of the B' coding region. 43rd Annual maize genetics conference, USA, Wisconsin.
- Bender, J., Fink, G.R. (1995): Epigenetic control of an endogenous gene family is revealed by a novel blue fluorescent mutant of *Arabidopsis*. *Cell* **83**: 725-734.
- Bennetzen, J.L., Springer, P.S. (1994): The generation of *Mutator* transposable element subfamilies in maize. *Theor. Appl. Genet.* **87**: 657-667.
- Bennetzen, J.L. (2000): Transposable element contributions to plant gene and genome evolution. *Plant Mol. Biol.* **42**: 251-269.
- Bernhardt, J. (1988): Untersuchungen zur Evolution der Chalkon Synthase und der NADP abhängigen Dihydroxyquercetin Reduktase in Pflanzen. Dissertation, Universität Bonn.
- Bernhardt, J., Stich, K., Schwarz-Sommer, Z., Saedler, H., Wienand, U. (1998): Molecular analysis of second functional *A1* gene (*dihydroflavonol 4-reduktase*) in *Zea mays*. *Plant J.* **14**: 483-488.
- Biedenkapp, H., Borgmeyer, U., Sippel, A.E., Klempnauer, K.H. (1988): Viral *myb* oncogene encodes a sequence-specific DNA-binding activity. *Nature* **335**: 835-837.
- Birnboim, J.P., Doly, J. (1979): A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acids Res.* **7**: 1513-1525.
- Bodeau, J.P., Walbot, V. (1992): Regulated transcription of the maize *Bronze 2* promoter in electroporated protoplasts requires the *C1* and *R* gene products. *Genetics* **233**: 379-387.

- Boeke, J.D. (1997): LINEs and Alus-the polyA connection. *Nat. Genet.* **16**: 6-7.
- Bollmann, J., Carpenter, R., Coen, E.S. (1991): Allelic interactions at the *nivea* locus of *Antirrhinum*. *Plant Cell* **3**: 1327-1336.
- Bonas, U., Sommer, H., Saedler, H. (1984): The 17-kb Tam 1 element of *Antirrhinum majus* induces a 3-bp duplication upon integration into the chalcone synthase gene. *EMBO J.* **3**: 1015-1019.
- Bond, U., Schlesinger, M.J. (1986): The chicken ubiquitin gene contains a heatshock promoter and expresses an unstable mRNA in heatshocked cells. *Mol. Cell Biol.* **6**: 4602-4610.
- Borchert, L. (1998): Molekulare Analyse der Chalkonsynthesemutante *C2-Inhibitor Diffuse (C2-Idf)* aus *Zea mays* L. Dissertation, Universität Hamburg.
- Brettschneider, R., Becker, D., Lörz, H. (1997): Efficient transformation of scutellar tissue of immature maize embryos. *Theor. Appl. Genet.* **94**: 737-748.
- Burr, F.A., Burr, B., Scheffler, B.E., Blewitt, M., Wienand, U., Matz, E.C. (1996): The maize repressor-like gene *intensifier 1* shares homology with the *r1/b1* multigene family of transcription factors and exhibits missplicing. *Plant Cell* **8**: 1249-1259.
- Callis, J., Fromm, M., Walbot, V. (1987): Introns increase gene expression in cultured maize cells. *Genes Dev.* **1**: 1183-1200.
- Ceska J., Styles E.D. (1976): Flavonoids in maize seedlings. *Maize Genet. Coop. Newsl.* **50**: 107-108.
- Chandler, V.P., Talbert, L.E., Raymond, F. (1988): Sequence, genomic distribution and DNA modification of a *Mu1* element from non-Mutator maize stocks. *Genetics* **119**: 951-958.
- Chandler, V.L., Eggleston, W.B., Dorweiler, J.K. (2000): Paramutation in maize. *Plant Mol. Biol.* **43**(2-3): 121-145.
- Chandler, V.L., Radicella, J.P., Robbins, T.P., Chen, J., Turks, D. (1989): Two regulatory genes of maize anthocyanin pathway are homologous: isolation of *B* utilizing *R* genomic sequences. *Plant Cell* **1**: 1175-1183.
- Charles, C., Selinger, D., Chandler, V. (2001): The pale aleurone color 1 (*pac1*) locus, which is required for anthocyanin expression in maize seeds, encodes a homolog of the *an11* gene of *Petunia* and the *ttg1* gene of *Arabidopsis*. 43rd Annual maize genetics conference, USA, Wisconsin.
- Chen, J., Greenblatt, I.M., Dellaporta, S.L. (1987): Transposition of *Ac* from the *P* locus of maize into unreplicated chromosomal sites. *Genetics* **117**: 109-116.

- Christensen, A.H., Sharrock, R.A., Quail, P.H. (1992): Maize polyubiquitin genes: structure, thermal perturbation of expression and transcript splicing, and promoter activity following transfer to protoplasts by elektroporation. *Plant Mol. Biol.* **18**: 675-689.
- Cock, J.M., Swarup, R., Dumas, C. (1997): Natural antisense transcripts of the S locus receptor kinase gene and related sequences in *Brassica oleracea*. *Mol. Gen. Genet.* **255**(5): 514-524.
- Coe, E.H. (1968): Heritable repression due to paramutation in maize. *Science* **162**(856): 925.
- Coe, E.H. (1959): A regular and continuing conversion-type phenomenon at the *B* locus in maize. *Genetics* **46**: 707.
- Coe, E.H. (1962): Spontaneous mutation of the aleurone color inhibitor in maize. *Genetics* **47**: 779-783.
- Coe, E.H. (1970): Dominant dilute aleurone color factor on chromosome 7. *Maize Genet. Coop. Newsl.* **44**: 153.
- Coe, E.H., McCormick, S.M., Modena, S.A. (1981): White pollen in maize. *J. Hered.* **72**: 318-320.
- Coe, E.H., Neuffer, M.G. (1977): The genetic of corn. In: Sprague G.F. (ed.): *Corn and Corn improvement*. American Society of Agronomy, Madison, Wisconsin: 111-224.
- Coe, E.H., Neuffer, M.G. (1988): The genetics of corn. In: Sprague, G.F., Dudley, J.W. (ed.): *Corn and Corn improvement*, third edition. American Society of Agronomy, Madison, Wisconsin: 88-258.
- Coen, E.S., Carpenter, R. (1988): A semi-dominant allele, *niv-525*, act *in trans* to inhibit the expression of its wild-type homologue in *Antirrhinum majus*. *EMBO J.* **7**: 877-883.
- Cone, K.C., Burr, F.A., Burr, B. (1986): Molecular analysis of the maize anthocyanin regulatory locus *C1*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**: 9631-9635.
- Cone, K.C., Burr, B. (1989): In Styles, D.E., Gavazzi, G.A. and Racchi, M.L. (ed.): *The Genetics of Flavonoids* Edizioni Unicopli, Milan: 143-145.
- Cone, K.C., Cocciolone, S.M., Burr, F.A., Burr, B. (1993): Maize anthocyanin regulatory gene *PI* is a duplicate of *C1* that functions in the plant. *Plant Cell* **5**: 1795-1805.
- Consonni, G., Geuna, F., Gavazzi, G., Tonelli, C. (1993): Molecular homology among members of the *R* gene family in maize. *Plant J.* **3**: 335-336.
- Dangl, J.L., Schulz-Lefert, P., Becker-Andre, M., Hahlbrock, K., Schulz, W. (1989): Functional complexity of UV-light responsive domains in the parsley chalcone synthase promoter. *J. Cell. Biochem. Suppl.* **13D**: 299. (Abstr.).

- Dellaporta, S.L., Greenblatt, J., Kermicle, J.L., Hicks, J.B., Wessler, S.R. (1988): Molecular cloning of the maize *R-nj* allele by transposon tagging with *Ac*. In: Gustafson, J.P., Appels, R. (ed): Chromosome structure and function: Impact of new concepts. 18th Stadler Genetics Symposium. Plenum Press, New York: 263-282.
- Dellaporta, S.L., Wood, J., Hicks, J.B. (1983): A plant DNA miniprep: version II. *Plant. Mol. Biol. Rep* **1** (4): 19-21.
- D'Halluin, K., Bonne, M., De Beuckeleer, M., Leemans, J. (1992): Transgenic maize plants by tissue electroporation. *Plant Cell* **4**: 1495-1505.
- Doerfler, W. (1984): DNA Methylierung: Genaktivierung durch sequenzspezifische DNA-Methylierungen. *Angewandte Chemie* **96**: 917-929.
- Dooner, H.K., Nelson, O.E. (1979): Interaktion among *C*, *R* and *Vp* in the control of the *Bz* glucosyltransferase during endosperm development in maize. *Genetics* **91**: 309-315.
- Dooner, H.K. (1983): Coordinate genetic regulation of flavonoid biosynthesis enzymes in maize. *Mol. Gen. Genet.* **189**: 136-141.
- Dooner, H.K., Nelsson, O.E. (1977): Genetic control of UDP-glucose: flavonol 3-o-glucosyltransferase in the endosperm of maize. *Biochem. Genet.* **15**(5-6): 509-519.
- Dooner, H.K. (1985): Viviparous-1 mutation in maize conditions pleiotropic enzyme deficiencies in the aleurone. *Plant. Physiol.* **77**: 486-488.
- Dooner, H.K., Robbins, T.P., Jorgensen, R.A. (1991): Genetic and developmental control of anthocyanin biosynthesis. *Annu. Rev. Genet.* **25**: 173-199.
- Dresselhaus, T., Cordts, S., Heuer, S., Sauter, M. (1999): Novel ribosomal genes from maize are differentially expressed in the zygotic and somatic cell cycles. *Mol. Gen. Genet.* **261**: 416-427.
- Durbin, M.L., McCaig, B., Clegg, M.T. (2000): Molecular evolution of the chalcone synthase multigene family in the morning glory genome. *Plant Mol. Biol.* **42**(1): 79-92.
- Epperson, B., Clegg, M.T. (1987): Frequency-dependent variation for outcrossing rate among flower color morphs of *Ipomea purpurea*. *Evolution* **41**: 1302-1311.
- Esnault, C., Maestre, J., Heidmann, T. (2000): Human LINE retrotransposons generate processed pseudogenes. *Nat. Genet.* **24**: 363-367.
- Fedoroff, N.V. (1995): DNA methylation and activity of the maize *Spm* transposable element. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **197**: 143-164.
- Fedoroff, N.V., Furtek, D.B., Nielson, O.E. (1984): Cloning of the *bronze* locus in maize by a simple and generalizable procedure using the transposable element *Activator*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**: 3825-3829.

- Feinberg, A., Vogelstein, B. (1983): A technique for radiolabelling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Biochem.* **132**: 6-13.
- Finley; D., Ozkaynak, E., Varshavsky, A. (1987): The yeast polyubiquitin gene is essential for resistance at high temperatures, starvation and other stresses. *Cell* **48**:1035-1046.
- Fire, A., Xy, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E., Mello, C.C. (1998): Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **391**: 806-811.
- Flavell, A.J., Rearce, S.R., Kumar, A. (1994): Plant transposable elements and the genome. *Curr. Opin. Gene.t Dev.* **4**: 838-844.
- Franken, P., Niesbach-Klösger, U., Weydemann, U., Marechal-Drouard, L., Saedler, H., Wienand, U. (1991): The duplicated chalcone synthase genes *C2* and *Whp* (*white pollen*) of *Zea mays* are independently regulated; evidence for translational control of *Whp* expression by the anthocyanin intensifying gene in. *EMBO J.* **10**: 2605-2612.
- Fraser, A.C. (1924): Heritable characters of maize XVII – Intensified red and purple aleurone color. *J. Hered.* **15**: 119-123.
- Gierl, A., Saedler, H. (1992): Plant-transposable elements and gene tagging. *Plant Mol. Biol.* **19**: 39-49.
- Goettel, W., Messing, J. (2001): Paramutation of the p1 locus in maize. 43rd Annual maize genetics conference, USA, Wisconsin.
- Goff, S.A., Klein, T.M., Roth, B.A., Fromm, M.E., Cone, K.C., Radicella, J.P., Chandler, V.L. (1990): Transactivation of anthocyanin biosynthetic genes following transfer of *b* regulatory genes into maize tissues. *EMBO J.* **9**: 2517-2522.
- Goff, S.A., Cone, K.C., Chandler, V.L. (1992): Functional analysis of the transcriptional activator encoded by the maize *B* gene: Evidence for a direct functional interaction between two classes of regulatory proteins. *Genes Dev.* **6**: 864-875.
- Greenblatt, I.M.(1975): Linkage relations of the diffuse factor on chromosome 4. *Maize Genet. Coop. Newsl.* **49**: 23-25.
- Groteword, E., Peterson T. (1994): Isolation and characterization of maize gene encoding chalcone flavonone isomerase. *Mol. Gen. Genet.* **242**: 1-8.
- Groteword, E., Athma, P., Peterson T. (1994): Alternatively spliced products of the maize *P* gene encode proteins with homology to the DNA binding domain of *myb*-like transcription factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 4587-4591.
- Groteword, E., Sainz, M.B., Tagliani, L., Hernandez, M.J., Bowen, B., Chandler, V. (2000): Identification of the residues in the interaction with the bHLH cofactor R. *Proc. Natl. Acid. Sci. USA* **97**, Issue **25**(5): 13579-13584.

- Hattori, T., Vasil, V., Rosenkrans, L., Hannah, L.C., McCarty, D.R., Vasil, I.K. (1992): The *viviparous-1* gene and abscisic acid activate the *C1* regulatory gene for anthocyanin biosynthesis during seed maturation in maize. *Genes Dev.* **6**: 609-618.
- Heeckeren van, W., Brown, D., Belcher, S., Chandler, V. (1996): The *a3* gene product can affect anthocyanin pigmentation by negatively regulating *b* mRNA levels. 38th Annual maize genetics conference. St. Charles, Illinois.
- Heller, W., Forkmann, G. (1988): Biosynthesis. In: J. B. Harbone (ed.): *The Flavonoids*: 399-425.
- Herrmann, M. (2000): Isolierung und Charakterisierung des *Intensifier*-Allels *in aus Zea mays* L. Diplomarbeit, Universität Hamburg.
- Hollick, J.B., Dorweiler, J.E., Chandler, V.L. (1977): Paramutation and related allelic interactions. *Trends Genet.* **13**(8): 302-308.
- Holmes, D.S., Quigley, M. (1981): A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal. Biochem.* **144**: 193-197.
- Holton, T.A., Cornish, E.C. (1995): Genetics and biochemistry of anthocyanin biosynthesis. *Plant Cell* **7**: 1071-1083.
- Jay, H.B. (2001): Genetic components required for paramutation at the *PI1* locus. 43rd Annual maize genetics conference, USA, Wisconsin.
- Jeffrey L. Bennetzen, (2000): Transposable element contributions to plant gene and genome evolution. *Plant Molecular Biology* **42**: 251-269.
- Jelesko, J.G., Harper, R., Furuya, M., Gruissem, W. (1999): Rare germinal unequal crossing-over leading to recombinant gene formation and gene duplication in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**: 10302-10307.
- Jung-Ha, H., Lee, Y., Kim, D., Song, B.H. (1998): A rearrangement of the *CDD* gene at the 5'UTR produces two types of transcripts that contain a natural antisense region. *Mol. Biol. Rep.*, **25**(4): 205-210.
- Kazazian, H.H., Moran, J.V. (1998); The impact of L1 retrotransposons on the human genome. *Nat. Genet.* **19**: 19-24.
- Kirby, L.T., Styles, E.D. (1970): Flavonoids associated with specific gene action in maize aleurone, and the role of light in substituting for the action of a gene. *Ca. J. Genet. Cytol.* **12**: 934-940.
- Klein, T.M., Roth, B.A., Fromm, M.E. (1989): Regulation of anthocyanin biosynthetic genes introduced into intact maize tissues by microprojectiles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 6681-6685.
- Koes, R.E., Spelt, C.E., Mol, L.N. (1989): The chalcone synthase multigene family of *Petunia hybrida* (V 30): Differential, light-regulated expression during flower development and UV light induction. *Plant Mol. Biol.* **12**: 213-225.

- Kreuzaler, F., Ragg, H., Fautz, E., Kuhn, D.N., Hahlbrock, K. (1983): UV-induction of chalcone synthase mRNA in cell suspension cultures of *Petroselinum hortense*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **80**: 2591-2593.
- Kröger, M., Hobom, G. (1982): Struktural analysis of insertion sequence IS5. Nature **297**: 159-162.
- Larson, R.L., Bussard, J.B., Coe, E.H. (1986): Gene-dependent flavonoid 3'-hydroxylation in maize. Biochem. Genet. **24**: 615-624.
- Larson, R.L. (1989): in Styles, D.E., Gavazzi, G.A., Racchi, M.L. (ed.): The genetics of flavonoids. Edizioni Unicopli, Milan: 71-76.
- Lavin, T., Selinger, D.A., Chandler, V. (2001): Mutants with reduced seed expression have multiple phenotypes and identify two new regulators of the maize anthocyanin pathway. 43rd Annual maize genetics conference, USA, Wisconsin.
- Littek, M. (2001): *In vitro*-Expression von *Mutator*-Elementkonstrukten in Mais. Diplomarbeit, Universität Hamburg.
- Littlewood, T.D., Evan, G.I. (1994): Helix-Loop-Helix. Protein Profile **1**: 639-641.
- Ludwig, S.R., Habera, L.F., Dellaporta, S.L., Wessler, S.R. (1989): *Lc*, a member of the maize *R* gene family responsible for tissue-specific anthocyanin production, encodes a protein similar to transcriptional activators and contains the *myc*-homology region. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **86**: 7092-7096.
- Lüscher, B., Christenson, E., Litchfield, D.W., Krebs, E.G., Eisenman, R.N. (1990): Myb DNA binding inhibited by phosphorylation at a site deleted during oncogenic activation. Nature **344**: 449-450.
- Maas, C., Laufs, J., Grant, S., Korfhage, C., Werr, W. (1991): The combination of a novel stimulatory element in the first exon of the maize *Shrunken-1* gene with the following intron 1 enhances reporter gene expression up to 1000-fold. Plant Mol. Biol. **16**: 199-207.
- Maestre, J., Tchenio, T., Dhellin, O., Heidmann, T. (1995): mRNA retrotransposon in human cells: processed pseudogene formation. EMBO J. **14**: 6333-6338.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F., Sambrook, J. (1982): Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbour Laboratory, Cold Spring Harbour Laboratory Press.
- Marrs, C., Alfenito, M.R., Lloyd, A.M., Walbot, V. (1995): A glutathione-S-Transferase involved in vacuolar transfer encoded by the maize gene *bronze 2*. Nature **375**: 397-400.
- Mascarenhas, D., Mettler, I.J., Pierce, D.A., Lowe, H.W. (1990): Intron-mediated enhancement of heterologous gene expression in maize. Plant Mol. Biol. **15**: 913-920.

- Matzke, M.A., Matzke, A.J., Kooter, J.M. (2001): RNA: guiding gene silencing. *Science* **293**(5532): 1080-1083.
- Matzke, M.A., Matzke, A.J., Pruss, G.J., Vance, V.B. (2001): RNA-based silencing strategies in plants. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **11**(2): 221-227.
- Menssen, A., Höhmann, W.M., Schnable, P.S., Peterson, P.A., Saedler, H. (1990): The *En/Spm* transposable element of *Zea mays* L. contains splice sites at the termini generating a novel intron from a *dSpm* Element in the *A2* gene. *EMBO J.* **9**: 3051-3057.
- McCarty, D.R., Carson, C.B., Simonds, C.S. (1988): The structure of the *viviparous-1* locus. *Maize Genet. Coop. Newsl.* **62**: 60-61.
- McCarty, D.R., Carson, C.B., Stinard, P.S., Robertson, D.S. (1989): Molecular analysis of *viviparous-1*: an abscisic acid insensitive mutant of maize. *Plant Cell* **1**: 523-532.
- McClintock, B. (1948): Mutable loci in maize. *Carnegie Inst. Wash Yearb.* **47**: 155-169.
- McCormick, S. (1978): Pigment synthesis in maize aleurone from precursor fed to anthocyanin mutants. *Biochem. Genet.* **16**: 777-785.
- McDonald, J.F. (1990): Macroevolution and retroviral elements. *Bio-Science* **40**: 183-191.
- McElroy, D., Zhang, W., Cao, J., Wu, R. (1990): Isolation of an efficient actin promoter for use in rice transformation. *Plant Cell* **2**: 163-171.
- Meins, F. (2000): RNA degradation and models for post-transcriptional gene silencing. *Plant Mol. Biol.* **43**(2-3): 261-273.
- Mo, Y., Nagel, C., Taylor, L. (1992): Biochemical complementation of chalcone synthase mutants defines a role for flavonols in functional pollen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 7213-7217.
- Mol, J.H., van der Krol A.R., van Tunen, A.J., van Blokland, R., de Lange, P., Stutje, A.K. (1990): Regulation of plant gene expression by antisense RNA. *FEBS Lett.* **268** (2): 427-430.
- Montgomery, J., Goldman, S., Deikman, J., Margossian, L., Fischer, L.R.L. (1993): Identification of an ethylene-responsive region in the promoter of a fruit-ripening gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 5939-5949.
- Müller-Neumann, M., Yoder, J.I., Starling, P. (1984): The DNA sequence of the transposable element *Ac* of *Zea mays* L. *Mol. Gen. Genet.* **198**: 19-24.
- Muskens, W.M., Vissers, P.A., Mol, N.M., Kooter, J.M. (2000): Role of inverted DNA repeats in transcriptional and post-transcriptional gene silencing. *Plant Mol. Biol.* **43**: 243-260.

- Nawaschin S. (1898): Resultate einer Revision der Befruchtungsvorgänge bei *Lilium martagon* und *Fritillaria tenella*. Bull Acad Sci St Petersburg **9**: 377-382.
- Nicholas, K.B., Nicholas, H.B. (1997): GeneDoc: a tool for editing and annotating multiple sequence alignments. Distributed by the author. <http://www.psc.edu/biomed/genedoc>.
- Niesbach-Klöggen, U., Barzen, E., Berhardt, J., Rohde, W., Schwarz-Sommer, Z., Reif, H.J., Wienand, U., Saedler, H. (1987): Chalcone synthase genes in plants: A tool to study evolutionary relationships. J. Mol. Evol. **26**: 213-225.
- O'Reilly, C., Shepherd, N., Pererira, A., Schwarz-Sommer, Z., Bertram, I. (1985): Molecular cloning of the *a1* locus in *Zea mays* L. using the transposable Element *En* and *Mu1*. EMBO J. **4**: 877-882.
- Ow, D.W., Wood, K.V., de Luca, M., de Wet, J.R., Helinski, D.R., Howell, S.H (1986): Transient and stable expression of the Firefly Luciferase gene in plant cells and transgenic plants. Science **294**: 856-859.
- Paz-Ares, J., Wienand, U., Peterson, P.A., Saedler, H. (1986): Molecular cloning of the *c* locus of *Zea mays* L.: a locus regulating the anthocyanin pathway. EMBO J. **5**: 829-833.
- Paz-Ares, J., Ghosal, D., Wienand, U., Peterson, P.A., Saedler, H. (1987): The regulatory *c1* locus of *Zea mays* L. encodes a protein with homology to *myb* proto-oncogene products and with structural similarities to transcriptional activators. EMBO J. **6**: 3553-3558.
- Paz-Ares, J., Ghosal, D. and Saedler, H. (1990): Molekular analysis of the *C1-l* allele from *Zea mays*: a dominant mutant of the regulatory *C1* locus. The EMBO Journal **9**: 315-321.
- Pereire, A., Schwarz-Sommer, Z., Gierl, A., Bertram, I., Peterson, P.A., Saedler, H. (1985): Genetic and molecular analysis of the Enhancer (*En*) transposable element system of *Zea mays*. EMBO J. **4**: 17-23.
- Pereire, A., Cuypers, H., Gierl, A., Schwarz-Sommer, Z., Saedler, H. (1986): Molecular analysis of the *En/Spm* transposable element system of *Zea mays*. EMBO J. **5**: 835-841.
- Perrot, GH., Cone, K.C. (1989): Nucleotide sequence of the maize *R-S* gene. Nucl. Acids Res. **17**: 8003.
- Pohlmann, R., Fedoroff, N., Messing, J. (1984): The nucleotide sequence of the maize controlling element Activator. Cell **37**: 635-642.
- Ptashne, M. (1988): How eukaryotic transcriptional activators work. Nature **335**: 683-689.
- Pusch, I. (2000): Struktur- und Funktionsanalyse des regulativen Anthocyanogens *Intensifier* aus *Zea mays* L. Dissertation, Universität Hamburg.

- Qin, M., Ellingboe, A.H. (1990): A transcript identified by *MuA* of maize is associated with *mutator* activity. *Mol. Gen. Genet.* **224**: 357-363.
- Reif, H.J., Niesbach, U., Deumling, B., Saedler, H. (1985): Cloning and analysis of two genes for chalcone synthase from *Petunia hybrida*. *Mol. Gen. Genet.* **199**: 208-215.
- Robertson, D.S. (1955): The genetics of vivipary in maize. *Genetics* **40**: 745-760.
- Robertson, D.S. (1965): A dormant allele of *vp1*. *Maize Genet. Coop. Newsl.* **39**: 104-105.
- Rojek, R.B. (1996): Molekulare Analyse des regulativen Farbgens *Intensifier* aus *Zea mays* L. Dissertation, Universität Hamburg.
- Roth, B.A., Goff, S.A., Klein, T.M., Fromm, M.E. (1991): *C1*- and *R*-Dependent Expression of the Maize *Bz1* Gene Requires Sequences with Homology to Mammalian *myb* and *myc* Binding Sites. *Plant Cell* **3**: 317-325.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989): Molecular cloning. A Laboratory Manual. 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
- Sandhu, J.S., Webster, C.I., Gray, J.C. (1998): A/T-rich sequences act as quantitative enhancers of gene expression in transgenic tobacco and potato plants. *Plant Mol. Biol.* **37**: 885-896.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R. (1977): DNA sequencing with chain-terminated inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**: 5463-5467.
- Scheffler, B., Peterson, P.A. (1985): *vpm-451* a mutable allele of *vp1* that responds to Cy. *Maize Genet. Coop. Newsl.* **59**: 4.
- Scheffler, B., Franken, F., Schütt, E., Schrell, A., Saedler, U., Wienand, U (1993): Molecular analysis of *C1* alleles in *Zea mays* defines regions involved in the expression of this regulatory gene. *Mol. Gen. Genet.* **242**: 40-48.
- Schmidt, C. (2000): Analyse von Mutator-Elementkonstrukten in Mais. Diplomarbeit, Universität Hamburg.
- Schneider, P.M., Witzel-Schlömp, K., Rittner, C. (2001): The endogenous retroviral insertion in the human complement C4 gene modulates the expression of homologous genes by antisense inhibition. *Immunogenetics* **53**: 1-9.
- Schrell, A. (1991): Molekulare Untersuchungen zur Regulation der Anthocyanbiosynthese in *Zea mays*: Promotoranalyse des Strukturgens *A1* und des Regulatorgens *C1*. Dissertation, Universität Köln.
- Schulze-Lefert, P., Dangl, J.L., Becker-Andre, M., Hahlbrock, K., Schulz, W. (1989): Inducible *in vivo* DNA footprints define sequences necessary for UV light activation of the parsley chalcone synthase gene. *EMBO J* **8**: 651-656.

- Selinger, D., Chandler, V.L. (1999): A Mutation in the pale aleurone color1 Gene Identifies a Novel Regulator of the Maize Anthocyanin Pathway. *Plant Cell* **11**: 5-14.
- Sen, R., Baltimore, D. (1986): Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequence. *Cell* **46**: 705-716.
- Sharp, P.A. (1999): RNAi and double-strand RNA. *Genes Dev.* **13**: 139-141.
- Sharp, P.A. (2001): RNA interference-2001. *Genes Dev.* **15**(5): 485-490.
- Shieh, M.W., Wessler, S.R., Raikhel, N.V. (1993): Nuclear targeting of the maize *R* protein requires two nuclear localization sequences. *Plant Physiol.* **101**: 353-361.
- Sidorenko, L., Peterson, T. (2001): Transgene-Induced Silencing identifies sequences involved in the establishment of paramutation of the maize *p1* gene. *Plant Cell* **13**: 319-335.
- Sidorenko, L., Chandler, V., Peterson, T. (2001): Transgenic plants allow further dissection of sequences required for paramutation in maize P1-rr gene. 43rd Annual maize genetics conference, USA, Wisconsin.
- Singer, M.F., Krek, V., McMillan, J.P., Swergold, G.D., Thayer, R.E. (1993): LINE-1: a human transposable element. *Gene* **135**: 183-188.
- Southern, E.M. (1975): Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**: 503-541.
- Speek, M. (2001): Antisense Promotor of Human L1 Retrotransposon drives Transcription of adjacent cellular genes. *Mol. Cell. Biol.*:1973-1985.
- Stam, M., Bebele, C., Lennertz, P., Chandler, V.L. (2001): Sequences between -90 and 103 kb upstream of the b1 transcription start site are required for paramutation and for high expression of the b1 gene. 43rd Annual maize genetics conference, USA, Wisconsin.
- Stapleton, A.E. (1992): Ultraviolet radiation and plant: burning questions. *Plant Cell* **4**: 1353-1358.
- Stapleton, A.E., Walbot, V. (1993): Anthocyanins protect DNA from ultraviolet radiation induced damage. *Maize Genet. Coop. Newsl.* **67**: 108.
- Stinard, P.S., Robertson, D.S., Schnable, P.S. (1993): Genetic isolation, cloning, and analysis of a mutator-induced, dominant antimorph of the maize *amylose extender1* locus. *Plant Cell* **5**: 1555-1566.
- Styles, E.D., Ceska, O., Seah, K.T. (1973): Developmental differences in action of *R* und *B* alleles in maize. *Can. J. Genet. Cytol.* **15**:59-72.
- Styles, E.D., Ceska, O., Seah, K.T. (1977): The genetic control of flavonoid synthesis in maize. *Can. J. Genet. Cytol.* **19**: 289-302.

- Styles, E.D., Coe, E.H. (1986): Unstable expression of an *R* allele with *a3* in maize. *J. Hered.* **77**: 389-393.
- Tapp, E. (1989): Molekulare Analyse der Mutante *C1-S* des regulatorischen *C1* Gens in *Zea mays*. Diplomarbeit, Universität Köln.
- Talbert, L.E., Patterson, G.I., Chandler, V.L. (1989). *Mu* transposable elements are structurally diverse and distributed throughout the genus *Zea*. *J. Mol. Evol.* **29**: 28-29.
- Taylor, L.P., Briggs, W.R. (1990): Genetic regulation and photocontrol of anthocyanin accumulation in maize seedlings. *Plant Cell* **2**: 115-127.
- Theres, N., Scheele, T., Starlinger, P. (1987): Cloning of the *bz2* locus of *Zea mays* using the transposable element *Ds* as a gene tag. *Mol. Gen. Genet.* **209**: 193-197.
- Todd, J.J., Vodkin, L.O. (1996): Duplications that suppress and deletions that restore expression from a chalcone synthase multigene family. *Plant Cell* **8**: 687-699.
- Tonelli, C., Consonni, G., Dellaporta, S.L., Viotti, A., Gavazzi, G. (1991): Molecular analysis of the maize anthocyanin regulatory locus *Sn:Bo13*, light independent and tissue specific gene of maize. *Mol. Gen. Genet.* **225**: 401-410.
- Tuerck, J.A., Fromm, M.E. (1994): Elements of the Maize *A1* Promotor Required for Transactivation by the Antocyanin *B/C1* or Phlobaphene *P* Regulatory Genes. *Plant Cell* **6**: 1655-1663.
- Turcich, M.P., Bokhari-Riza, A., Hamilton, D.A., He, C., Messier, W., Stewart, C.B., Mascarenhas, J.P. (1996): PREM-2, copia-type retroelement in maize is expressed preferentially in early microspores. *Sex. Plant Reprod.* **9**: 65-74.
- Vanhee-Brossollet, C., Vaquero, C. (1998): Do natural antisense transcripts make sense in eukaryotes? *Gene* **211**(1): 1-9.
- Vaucheret, H., Beclin, C., Fagard, M. (2001): Post-transcriptional gene silencing in plants. *Cell Science* **114**: 3083-3091.
- Walker, E.L., Panavas, T. (2001): Structural Features and Methylation Patterns Associated with Paramutation at the *r1* locus of *Zea mays*. *Genetics*, **159**(3): 1201-1205.
- Wessler, S.R., Bureau, T.E., White, S.E. (1995): LTR-retrotransposons and MITEs: important players in the evolution of plant genomes. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **5**: 814-821.
- Weisshaar, B., Armstrong, G.A., Block, A., da Costa e Silva, O., Hahlbrock, K. (1991): Light-inducible and constitutively expressed DNA-binding proteins recognizing a plant promoter element with functional relevance light responsiveness. *EMBO J* **7**(10): 1777-1786.

- Wienand, U., Weydemann, U., Niesbach-Klößgen, U., Peterson, P.A., Saedler, H. (1986): Molecular cloning of the *c2* locus of *Zea mays* – the gene coding for the chalcone synthase. *Mol. Gen. Genet.* **203**: 202-207.
- Wienand, U., Saedler, H. (1987): Plant transposable elements: unique structures for gene tagging and gene cloning. In: Hohn, Th., Schell, J. (ed.): *Plant gene research: plant DNA infectious agents*; Springer Verlag Wien, New York : 205-227.
- Yanagisawa, S. (1997): Dof DNA-binding domains of plant transcription factors contribute to multiple protein-protein interactions. *Eur. J. Biochem.* **250**: 403-410.
- Yanagisawa, S., Sheen, J. (1998): Involvement of Maize Dof zinc finger proteins: in tissue-specific and light-regulated gene expression. *Plant Cell* **10**: 75-89.
- Yanagisawa, S. (2001): The transcriptional activation domain of the plant-specific dof1 factor functions in plant, animal, and yeast cells. *Plant Cell Physiol.* **42**(8): 813-822.
- Yanagisawa, S. (1995): A novel DNA-binding domain that may form a single zinc finger motif. *Nucl. Acids Res.* **23**(17): 3403-3410.
- Yamazaki, Y., Suh D.-Y., Sitthithaworn, W., Shibuya, M., Sankawa, U., Ebizuka, Y., Kobayashi, Y., Ishiguro, K. (2001): Diverse chalcone synthase superfamily enzymes from the most primitive vascular plant, *Psilotum nudum*. *Planta* **214**: 75-84.
- Zhang, P., Chopra, S., Peterson, T. (2000): A segmental Gene Duplication Generated Differentially Expressed *myb*-Homologous Genes in Maize. *Plant Cell* **12**: 2311-2322.

7. Anhang

Tabelle 7-1: Mittelwerte des Enzymassays für Luciferase aus allen durchgeführten transienten Transformationen abgeglichen gegen die GUS-Expression

Die verwendeten Promotor-Reportergen-Konstrukte (schwarz) und die Effektorgene (farbig) sind in der ersten Spalte angegeben. Alle Effektorgene sind unter Kontrolle pAct1-Promotors. In den Spalten von I bis XII sind die Mittelwerte der relativen Luc/Gus-Werte prozentual gegenüber der gleich 100% gesetzten Positivkontrolle 35S-Luc-nos (Luc/Gus) dargestellt. MW – der aus allen durchgeführten Experimenten erhaltene Luc/Gus Mittelwert. St/F – der Standardfehler der arithmetischen Mittel ist in der letzten Spalte angegeben.

Gen-Konstrukt	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	MW Luc/Gus(%)	St/F(%)
0.5Whp(LC)-Luc	236	14		0	63	6	442	69	265		32	43	117	46
C1+R	1500	53		21	345	34	4162	169	264		190	776	751	405
C1+R+InD1	114			21	18	7	2957	87	398		184		487	357
C1+InD1		1							157				157	78
R+InD1									124				124	9
InD1	92	6		14	50	11			199				62	30
0.4Whp(LC)-Luc					118	13	22	97	215		11	39	73	28,5
C1+R					64	51	230	109	182		46	116	114	26
C1+R+InD1					145	4	160	222	174		57		127	32,3
InD1					25	3,6			124				51	37
0.5Whp(C1s)-Luc	576	6			54	6	148	131		16		90	134	77
C1+R		38	591		372	45	377	453		43		386	288	76
C1+R+InD1			109		291	15	553	500		51			218	93
C1+InD1		6											6	1,4
InD1		9			41	3,6							18	11
0.4Whp(C1s)-Luc			36		78	5	50	94		14			46	14
C1+R			36		154	17	166	66		17		77	76	23
C1+R+InD1					60	8	269	112		15			92	49
InD1			9		54	6							22	15
C2-Idf-55-Luc	13				27	10	10	45	664		12		112	92
C1+R	9130		291		300	40	2800	187	2199		240		1898	1092
C1+R+InD1	141		64		182	28	1498	156	265		1040		422	191
C1+InD1	106								531				318	215
R+InD1	18								332				175	158
InD1	132				32				481				215	136
C1	41								124				82	42
R	106								423				212	160
A1-Ex/In-Luc	111619												111619	0
C1+R	11467		2072										6769	4745
C1+R+InD1	80157		900										40528	40030
C1+InD1	59326												59326	47888
R+InD1	6473												6473	2802
InD1	18576												18576	16537
C1	5022												5022	2111
R	122250												122250	100861

Tabelle 7-2: Relative Mittelwerte des Enzymassays für Luciferase aus allen durchgeführten transienten Transformationen In der ersten Spalte sind die verwendeten Promotor-Reportergen-Konstrukte (schwarz) und die Effektorgene (farbig) angegeben. In den Spalten von I bis XII sind die relativen Mittelwerte der Luciferase-Aktivität (Luc-Werte) der unabhängigen Transformationsexperimente prozentual gegenüber der gleich 100% gesetzten Positivkontrolle 35S-Luc-nos (Luc) dargestellt. MW – der aus allen durchgeführten Experimenten erhaltene Mittelwert der Luciferase-Aktivität. Der Standardfehler der arithmetischen Mittel (St/F) ist prozentual angegeben.

Gen-Konstrukt	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	MW L uc (%)	ST/F(%)
0.5Whp(LC)-Luc	514	19		8	14	11	51	57	71		22	159	92	49
C1+R	23327	54		21	218	52	480	206	181		185	988	2571	2309
C1+R+InD1	956			23	7	16	341	104	450		109		250	115
C1+InD1		3							68				35	32
R+InD1									85				85	7
InD1	722	13		11	8	13			72				139	114
0.4Whp(LC)-Luc					20	9	2	73	302		9	91	72	62
C1+R					13	13	27	487	152		48	294	148	68
C1+R+InD1					54	13	18	42	100		40		54	12
InD1					11	9			75				65	30
0.5Whp(C1s)-Luc	685	7			0	8	17	146		30		251	143	83
C1+R		120	335		106	68	44	671		72		1417	354	169
C1+R+InD1			90		106	60	64	1354		105			296	207
C1+InD1		5											5	1,4
InD1		4,5			12	27							14	7
0.4Whp(C1s)-Luc					25	12	6	100		31			34	17
C1+R			32		74	15	19	98		31		166	62	20
C1+R+InD1			18		16	10	32	192		29			49	28
InD1			5		15	10							10	2,8
C2-Idf-55-Luc	8				7	23	1		90		12		27	16
C1+R	1540		298		45	68	323		1331		202		543	235
C1+R+InD1	320		185		30	104	173		156		636		229	75
C1+InD1	52								39				46	6
R+InD1	29								77				53	24
InD1	121				21				40				61	30
C1	55								47				55	6
R	196								344				270	75
A1-Ex/In-Luc	10278												10278	3091
C1+R	28430		1740										15085	10909
C1+R+InD1	20752		819										10785	8147
C1+InD1	3101												3101	935
R+InD1	1122												1122	76
InD1	3017												3017	1420
C1	2743												2743	917
R	35657												35657	7481

Danksagung

Diese Arbeit wurde am Institut für Allgemeine Botanik der Universität Hamburg im Arbeitsbereich für Angewandte Molekularbiologie der Pflanzen (AMPI) in der Zeit von September 1998 bis Dezember 2001 angefertigt.

Bei allen, die mich während dieser Zeit unterstützt haben, möchte ich mich bedanken.

Ich möchte mich bei Herrn Prof. Dr. Udo Wienand für die Überlassung des Themas, die Unterstützung meiner Arbeit, die Betreuung und die gute Arbeitsbedingungen bedanken.

Herrn Prof. Dr. W. Schäfer danke ich für seine Bereitschaft das Zweitgutachten zu übernehmen.

Ein besonderer Dank gilt Dr. Renè Lorbiecke für seine stetige Motivierung, die Aufmunterung in den kritischen Phasen, für die Diskussionsbereitschaft, für konstruktive Kritik und sorgfältige Korrekturlesen.

Bei Dr. Reinhold Brettschneider möchte ich mich für praktischen und theoretischen Ratschläge zur Biologischen Transformation bedanken.

Bei den Mitgliedern der Arbeitsgruppe AMPI S. Wahlandt, U. Peters, P. Garg, P. Lauert, M. Waßmann, C. Paul, K. Müller, L. Pokutta, N. Techen, M. Herrmann, M. Dietrich, M. Littek, K. Frenzel möchte ich für die angenehme Zusammenarbeit, Hilfsbereitschaft im Labor und nette Atmosphäre danken.

Bedanken möchte ich mich bei Frau E. Brinkmann und E. Peleikis, die das tägliche Laborleben leichter gemacht haben.

Meiner Familie danke ich für die Ermutigung und ihre moralische Unterstützung während der Arbeit danken.

Hiermit versichere ich, dass ich diese Arbeit mit keinen weiteren als den angegebenen Hilfen selbständig verfasst habe. Ich habe keine anderen als die angeführten Quellen und Hilfsmittel verwendet und die den benutzten Quellen entnommenen Textstellen und Inhalte als solche kenntlich gemacht.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation noch an keiner anderen Universität eingereicht habe, um ein Promotionsverfahren zu eröffnen.

Hamburg, den 22.12.2001

Kirsch