

## 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.

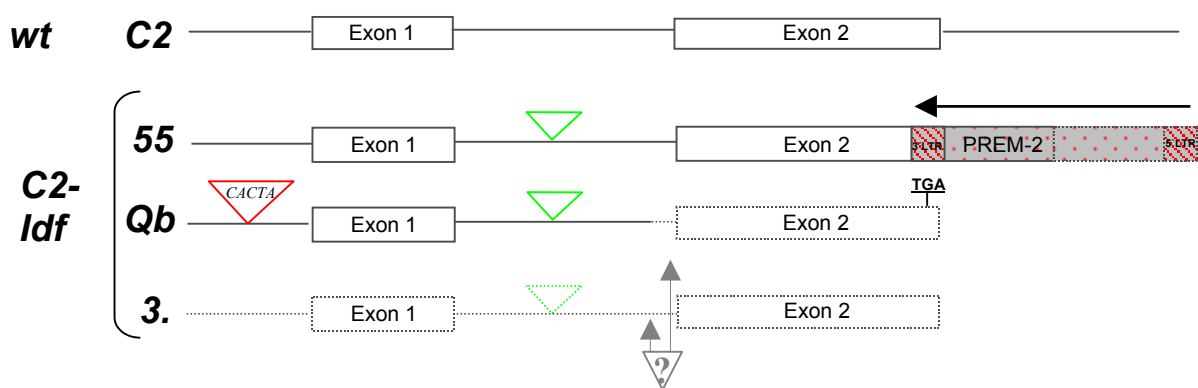
Ziel der vorliegenden Arbeit war es, grundlegende Mechanismen der Genregulation am Beispiel von Genen der Anthocyanbiosynthese zu untersuchen. Dazu wurden zwei Maismutanten verwendet, die auffallende und entgegengesetzte Phänotypen der Kornfärbung aufweisen. Bei der einen handelt es sich um eine Mutation des Chalkonsyntasegens *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<sup>S</sup>*-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<sup>S</sup>* 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  $\lambda$ -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 erhalten 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 Retroelements 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<sup>S</sup>*, 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<sup>S</sup>* 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<sup>S</sup>* 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<sup>S</sup>*-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<sup>S</sup>* 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<sup>S</sup>*-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<sup>S</sup>*, 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.