Molekulare Untersuchungen zur Funktion des regulativen *Intensifier* Gens aus *Zea mays* L.

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften
am Fachbereich Biologie der Universität Hamburg

vorgelegt von
Natascha Techen
aus Hamburg

Hamburg
Januar 2002

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

Weitere Gutachter der Dissertation:
Herr Professor Dr. W. Schäfer

Tag der Disputation: 15. Februar 2002

Hamburg, den 01. Februar 2002

Universität Hamburg
Fachbereich Biologie
14/1

Professor Dr. A. Frühwald
Prodekan

Inhaltsverzeichnis

1 EINLEITUNG 1

1.1 ANTHOCYANE 1

1.2 GENETIK DES ANTHOCYANBIOSYNTHESEWEGES IN ZEA MAYS L. 2

1.2.1 Das Intensifier Gen 5

1.2.2 Das Two Hybrid System 10

1.3 ZIELSETZUNG DER ARBEIT 12

2 MATERIAL UND METHODEN 13

2.1 MATERIAL 13

1.1.1 Größenstandards 13

1.1.2 Primer 13

1.1.3 Puffer und Nährmedien 14

1.1.4 Vektoren für die Klonierung 22

1.1.5 Mikroorganismen 23

1.1.6 Pflanzenmaterial 23

1.2 METHODEN 24

1.2.1 Bakterien 24

1.2.1.1 Anzucht von Bakterienkulturen 24

1.2.1.2 Herstellung kompetenter Zellen mittels TFB-Puffern 24

1.1.1.3 Transformation kompetenter Zellen mittels Hitzeschock 24

1.1.1.4 Ausplattieren von Zellsuspensionen 24

1.1.2 DNA 25

1.1.2.1 Plasmid-DNA-Minipräparation (Boiling Methode) 25

1.1.1.2 Plasmid-DNA-Maxipräparation 25

1.1.1.3 Restriktion von DNA 26

1.1.1.4 Auftrennung von DNA im elektrischen Feld 26

1.1.1.5 Bestimmung der DNA Menge und Fragmentgröße 26

1.1.3 Klonierungen 26

1.1.3.1 Auffüllen von 3´ zurückgesetzten Enden 26

1.1.1.2 Dephosphorylierung von DNA 27

1.1.1.3 Isolierung von Fragmenten aus Agarosegelen 27

1.1.1.4 PCR Amplifikation mittels Taq-DNA Polymerase 27

1.1.1.5 PCR Amplifikation mittels Pfx- oder Pfu- DNA Polymerasen 28
1.1.1.6 Ligation eines DNA-Fragmentes in einen Vektor 29
1.1.4 Sequenzierungen 30
1.1.1.1 Plasmid-DNA-Präparation für die Sequenzierung 30
1.1.1.2 Sequenzreaktion 30
1.1.5 Hefen 31
1.1.5.1 Anzucht von Hefekulturen 31
1.1.1.2 Herstellung kompetenter Hefezellen 31
1.1.1.3 Transformation von kompetenten Hefezellen 32
1.1.1.4 Herstellung einer Two Hybrid cDNA Bank Dauerkultur 32
1.1.1.5 Quantitativer Nachweis der β-Galactosidase Aktivität 32
1.1.1.6 Isolierung von Gesamtproteinen aus Hefe für SDS-PAGE 33
1.1.6 Proteine 34
1.1.6.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) 34
1.1.1.2 Färbung von SDS-Polyacrylamidgelen 34
1.1.1.3 Western Blot 34
1.1.1.4 Immunodetektion 35
1.1.7 Biolistische Transformation 35
1.1.7.1 Goldsuspension für die Transformation von von Tabak- und Maisgewebe 36
1.1.1.2 Goldsuspension für die Transformation von epidermalen Zwiebelzellen 37
1.1.1.3 Isolierung von Gesamtproteinen aus Pflanzenmaterial 37
1.1.8 Fluoreszensmikroskopie 38

3 ERGEBNISSE 39

3.1 UNTERSUCHUNGEN ZUR IN VIVO INTERAKTION DER *INTENSIFIER* PROTEINE 39
3.2 HERSTELLUNG DER TWO HYBRID EXPRESSIONSPLASMIDE 40
3.2.1 Herstellung der *R* Expressionsplasmide 40
3.2.2 Herstellung der *R* Deletions Expressionsplasmide 41
3.2.3 Herstellung der *C1* Expressionsplasmide 44
3.2.4 Herstellung der *C1-I* Expressionsplasmide 44
3.2.5 Herstellung der *InD1* Expressionsplasmide 47
3.2.6 Herstellung der *InXS* Expressionsplasmide 47
3.2.7 Herstellung der *In* Expressionsplasmide 50
3.2.7.1 Herstellung des Fusionsklons aus In und InD1 50
3.3 VORVERSUCHE 56

3.3.1 Der Hefestamm YRG-2 56
3.3.2 Western Blot Analysen 56
3.4 DAS TWO HYBRID SYSTEM 57
3.5 KONTROLLEN 58
3.5.1 Test der AD-und BD-Fusionsproteine auf Hintergrundaktivität 62
3.5.2 Test der Fusionsproteine auf Interaktion mit der BD oder AD von Gal4 69
3.6 TEST AUF IN VIVO INTERAKTION DER FUSIONSPROTEINE 72
3.6.1 Transformanten mit dem BD-*C1* Fusionsprotein und diversen AD-Fusionsproteinen 74
3.6.2 Transformanten mit dem BD-*C1-I* Fusionsprotein und verschiedenen AD-Fusionsproteinen 78
3.6.3 Transformanten mit dem BD-*InXS* Fusionsprotein und verschiedenen AD-Fusionsproteinen 82
3.6.4 Transformanten mit dem BD-*InFus* Fusionsprotein und verschiedenen AD-Fusionsproteinen 86
3.6.5 Transformanten mit dem BD-*InD1* Fusionsprotein und verschiedenen AD-Fusionsproteinen 90
3.6.6 Transformanten mit dem BD-*R* oder dem BD-*Rdel* Fusionsprotein und verschiedenen AD-Fusionsproteinen 95
3.6.7 Transformanten mit drei Fusionsproteinen 100
3.6.7.1 Expressionsplasmide 103
3.6.8 Zusammenfassung der *in vivo* Interaktion 107
3.6.9 Two Hybrid cDNA Bank 112
3.7 UNTERSUCHUNGEN ZUR *IN VIVO* LOKALISATION DES *INTENSIFIER* GENPRODUKTES 113
3.7.1 Herstellung der Expressionsplasmide 114
3.7.2 Nachweis der GFP Fusionsproteine in transient transformiertem Maisscutellumgewebe durch Fluoreszenzmikroskopie 119
3.7.3 Nachweis der GFP Fusionsproteine in transient transformierten Geweben durch Fluoreszenzmikroskopie 122
3.7.4 Bestimmung der Parameter für die biolistische Transformation von epidermalen Zwiebelzellen 126
3.7.5 Nachweis der GFP Fusionsproteine in transient transformierten Epidermiszellen der Zwiebel durch Fluoreszenzmikroskopie 126

3.7.6 Herstellung von Deletionsplasmiden 131
3.7.7 Herstellung des *In*-am-GFP Expressionsplasmids 131
3.7.8 Herstellung des *InD*-carb-GFP Expressionsplasmids 131
3.7.9 Herstellung des *InD*-am-GFP Expressionsplasmids 134
3.7.10 Nachweis der Deletionsproteine in transient transformierten Epidermiszellen der Zwiebel durch Fluoreszenzmikroskopie 137
3.7.11 Zusammenfassung der *in vivo* Lokalisation 139

4 DISKUSSION 141

4.1 VORBEMERKUNG 141
4.2 UNTERSUCHUNGEN MIT DEM TWO HYBRID SYSTEM 142
4.2.1 Transkriptionsaktivierende Domäne in den myc-homologen Proteinen 145
4.2.2 Die *Intensifier* Proteine als mögliche Interaktionspartner des myc-homologen Proteins *R* 146
4.2.3 Die *Intensifier* Proteine als mögliche Interaktionspartner der myb-homologen Proteine *C1 und C1-I* 147
4.2.4 Homo- und Heterodimerisierung 148
4.2.5 Die *Intensifier* Proteine als möglicher Interaktionspartner des gebildeten Komplexes von *R+C1* 149
4.3 KORRELATION ZWISCHEN DER STÄRKE DER REPORTERGENEXPRESSION UND DER STÄRKE DER INTERAKTION 149
4.4 LOKALISATION DER *INTENSIFIER* PROTEINE *IND1* UND *INFUS* 153
4.5 MÖGLICHE FUNKTION DES *INTENSIFIER* GENPRODUKTES 155
4.6 AUSBLICK 158

5 ZUSAMMENFASSUNG 161

6 LITERATUR 163

7 ANHANG 169

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Ac	Acetat (in chemischen Formeln)
AD	Aktivierungsdomäne von Gal4
ADH	Alkohol-Dehydrogenase
Amp	Ampicillin
AS	Aminosäure
A.t.	Arabidopsis thaliana
3-AT	3-Aminotriazol
ATP	Adenosin-5'Triphosphat
BD	Bindedomäne von Gal4
BSA	Bovine Serum Albumin (Rinderserumalbumin)
ca.	circa
CaMV	Cauliflower Mosaic Virus
cDNA	complementary DNA
CSPD	Disodium3-(4-methoxyspiro{1,2-dioxetane-3,2'-(5'-chloro) tricyclo [3.3.1.13,7] decan}-4-yl) phenyl-phosohat
DAP	Tage nach Bestäubung
dATP	Desoxyadenosintripohosphat
dCTP	Desoxycytidintripohosphat
del.	deletiert
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIG	Digoxygenin
dGTP	Desoxyguanosintripohosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleic Acid
dNTPs	Desoxynukleotide
dTTp	Desoxythymidintripohosphat
dUTP	Desoxyuridinriphosphat
DTT	Dithiothreitol
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Gal4	β-Galaktosidase
GFP	grün floureszierendes Protein
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-(2-ethansulfonsäure)
Hg	Quecksilber
HIS3	Histidin-Gen
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
Kan	Kanamycin
lacZ	β-Galaktosidase-Gen
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
mRNA	messenger RNA
N	Kern
NLS	Kernlokalisierungssequenz
NTP	Nukleosid
OD	optische Dichte
ORF	offener Leserahmen
ONPG	o-Nitrophenyl-β-D-galactopyranosid
P	Promoter
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerase-Kettenreaktion)

PEG	Polyethylenglycol
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RNA	Ribonucleic Acid (Ribonukleinsäure)
RNAse	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
s.	siehe
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SSC	Natriumchlorid-Natriumcitrat
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TE	Tris-EDTA
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
UAS	upstream activating sequence
ÜNK	über-Nacht-Kultur
UpM	Umdrehungen pro Minute
UTR	untranslatierter Bereich
UV	Ultraviolettes Licht
Vol	Volumen
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-2-indolyl-β-D-galactopyranosid
z.B.	zum Beispiel

Einheiten

µg	Mikrogramm	mol	Mol
µl	Mikroliter	ng	Nanogramm
µm	Mikrometer	nm	Nanometer
AS	Aminosäure(n)	nM	nanomolar
bp	Basenpaare	OD	optische Dichte
cm	Zentimeter	%	Prozent
g	Gramm	psi	pounds per sqare inch
kb	Kilobasen	RLU	relative Lichteinheiten
kDa	Kilo Dalton	sec	Sekunde(n)
l	Liter	Std.	Stunde(n)
M	molar	UpM	Umdrehungen pro Minute
mg	Milligramm	µm	Mikrometer
min.	Minute(n)	V	Volt
ml	Milliliter	v/v	Volumen pro Volumen
mm	Millimeter	w/v	Gewicht pro Volumen
mM	millimolar		

Aminosäuren

A	Ala	Alanin	M	Met	Methionin
C	Cys	Cystein	N	Asn	Asparagin
D	Asp	Asparaginsäure	P	Pro	Prolin
E	Glu	Glutaminsäure	Q	Gln	Glutaminsäure
F	Phe	Phenylalanin	R	Arg	Arginin
G	Gly	Glycin	S	Ser	Serin
H	His	Histidin	T	Thr	Threonin
I	Ile	Isoleucin	V	Val	Valin
K	Lys	Lysin	W	Trp	Tryptophan
L	Leu	Leucin	Y	Tyr	Tyrosin

1 Einleitung

1.1 Anthocyane

Die Pigmentierung von Blüten, Samen und anderen Pflanzenteilen dient dazu, pollenverbreitende und samenverbreitende Tiere anzulocken (Weiss, 1991; Willson *et al*., 1990). Die Pigmentierung wird unter anderem durch die Ansammlung von den orange bis gelben Carotinoiden und den roten, violetten oder blau gefärbten Anthocyanen verursacht.
Die Anthocyane gehören zu den Flavonoiden. Nicht alle Vertreter der Flavonoide dienen nur der Pigmentierung, sondern haben auch andere Funktionen. Sie spielen z.B. eine wichtige Rolle in der Pathogenabwehr (Koes, *et al*., 1994), als Schutz vor Schädigungen durch UV-Licht (Kootstra, 1994), bei der Reproduktion (Coe *et al*., 1981) und bei der Symbiose mit Pilzen (Harrison *et al*., 1994) und Bakterien (Clarke *et al*., 1992). Der Ablauf der Flavonoidbiosynthese bzw. des Anthocyanbiosyntheseweges konnte mit Hilfe von radioaktiv markierten Vorstufen weitgehend aufgeklärt werden (Grisebach, 1965).

Der zentrale Schritt der Flavonoidbiosynthese ist die Kondensation von drei Molekülen Malonyl-CoA mit einem Molekül Coumaroyl-CoA zum gelblichen Chalkon, welcher durch die Chalkonsynthase (CHS) katalysiert wird. Durch weitere Isomerisierung, Hydroxylierung und Reduktion entstehen Leucoanthocyanidine. Die enzymatische Umwandlung der Leucoanthocyanidine zu den farbigen Anthocyanen ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Heller und Forkman vermuten (1988), daß hierbei eine Oxidation und eine Dehydrierung erfolgt. Die entstandenen Anthocyane Pelargonidin (rot), Cyanidin (violett) und Delphinidin (blau) können durch Glykosylierung, Methylierung und Acetylierung weiter modifiziert werden (Harborne, 1988).
Die Ansammlung der Anthocyane erfolgt in der Vakuole. Der dafür verantwortliche Mechanismus ist noch nicht aufgeklärt. Marrs *et al*. (1995) postulieren, daß die zu transportierenden Anthocyanmoleküle mit einem Glutathion verknüpft werden. Dadurch würden sie von den an der Vakuole membrangebundenen Glutathionpumpen erkannt und in die Vakuole transportiert.

Der Anthocyanbiosyntheseweg steht unter der Kontrolle regulativer Gene. Viele der an der Synthese beteiligten Strukturgene und regulierenden Gene wurden unter anderem durch „differential screening“, heterologe Sonden, „Transposon tagging“ oder Mutationen identifiziert. Die an dem Syntheseweg beiteiligten Gene scheinen nicht essentiell für das

Überleben der Pflanze zu sein, so daß Mutationen meist toleriert werden. Die mutierten Gene sind relativ leicht zu identifizieren, da sie oftmals zu einer veränderten Pigmentierung der Pflanze führen. Diese Aspekte haben dazu geführt, daß der Anthocyanbiosyntheseweg zu einem Modellsystem für die Untersuchung der Genregulation in Pflanzen geworden ist.
Als Untersuchungsobjekte dienten hierbei *Antirrhinum majus* (Anthirrhinum), *Arabidopsis thaliana* (Arabidopsis), *Petroselinum hortense* (Petersilie), *Petunia hybrida* (Petunie) und *Zea mays* (Mais). Die Untersuchungen haben gezeigt, das der Anthocyanbiosyntheseweg in den unterschiedlichen Pflanzen nur wenige Unterschiede aufweist. Ein wichtiger Unterschied ist hierbei, daß in Petunien kein Pelargonidin (rot) produziert wird. Des weiteren wird in *Anthirrhinum* und Mais kein Delphinidin (blau) hergestellt.

1.2 Genetik des Anthocyanbiosyntheseweges in Zea mays L.

An der Anhäufung von Anthocyanen in Mais sind unter anderem die Strukturgene *C2*, *Whp*, *A1*, *A2*, *Bz1* und *Bz2* involviert (Coe *et al*., 1988). Wienand *et al*. (1986) und Franken *et al*. (1991) isolierten und charakterisierten die duplizierten Strukturgene *C2* und *Whp*, die für das Schlüsselenzym Chalkonsynthase kodieren.
Die Strukturgene stehen unter der Kontrolle der charakterisierten regulierenden Gene *R*, *B*, *C1*, *Pl*, *P*, *Vp1* und *In*. Ihre, zum Teil gewebespezifische, Expression wirkt sich auf die Intensität und die Verteilung der Pigmentierung in der Pflanze aus (Holton *et al*., 1995). Molekulare Analysen dieser regulierenden Gene zeigten, daß sie zu verschiedenen Transkriptionsfaktoren homolog sind.
Chandler *et al*. (1989) zeigten, daß es sich bei *B* und *R* um duplizierte Gene handelt. In den meisten Pflanzenteilen wird das *B* Gen für die Anthocyanbiosynthese benötigt. Dagegen wird *R* für die Pigmentierung des Aleurons, der Antheren und der Coleoptile benötigt (Styles *et al*., 1973). Ihre putativen Proteine besitzen eine aminoterminal gelegene saure Domäne, die typisch für diese Klasse von Transkriptionsfaktoren ist. Des weiteren besitzen sie einen carboxyterminal gelegenen Bereich mit einer basischen Helix-Loop-Helix Region, die eine Homologie zu den **myc**-Onkogen Transkriptionsfaktoren aufweist (Lüscher *et al*., 1990). Weiterhin besitzen sie direkt am carboxyterminalen Ende, eine Region mit noch unbekannter Funktion.

Shieh *et al*. (1993) konnten anhand zellulärer Lokalisationsstudien zeigen, daß das *R* Protein im Zellkern lokalisiert ist. Da das Protein mit 67 kDa zu groß ist, um passiv durch den Kernporenkomplex in den Zellkern zu gelangen, wird es durch einen energieverbrauchenden

Mechanismus aktiv importiert. Für den Im- und Export von Proteinen werden spezielle Carrier-Proteine benötigt, die als Importin bezeichnet werden (Smith *et al*., 1997).

Alle bekannten Importin Protein besitzen die Fähigkeit bestimmte Sequenzen der zu importierende Proteine zu erkennen. Diese Sequenzen werden als Kernlokalisierungssignale (nuclear localisation signal = NLS) bezeichnet (Hicks und Raikhel, 1995). Proteine mit Molekularmassen kleiner als 40-60 kDa können passiv in den Kern diffundieren, Proteine ab 60 kDa benötigen mindestens eine NLS für den aktiven Transport. Obwohl es keine Konsensussequenz für eukaryotische NLS gibt, zeigen sie dennoch Gemeinsamkeiten. Typische NLS enthalten meist positive Aminosäuren wie Lysin (K), Argenin (R) und Prolin (P), die nach dem Import nicht proteolytisch entfernt werden.

Es werden 3 Klassen von NLS unterschieden. Die NLS vom Typ SV40 bestehen aus mehreren basischen Aminosäuren z.B. PKKKRKV. Die NLS vom Typ MAT α-2 bestehen aus kurzen hydrophoben Regionen, welche eine oder mehrere basische Aminosäuren enthalten z.B. KIPIK. Die bipartiten NLS bestehen aus einer Kombination aus zwei Regionen basischer Aminosäuren, die durch mindestens vier andere Aminosäuren voneinander getrennt sind z.B. (SPPKAVKRPAATDDAGQA KKKKLDKEDES). Zusätzlich gibt es jedoch noch NLS die in keine der drei Klassen gehören und die charakteristisch für einige virale Kernproteine sind (Raikhel, 1992; Hicks and Raikhel, 1995).

Shieh *et al*. (1993) konnten im *R* Protein drei NLS experimentell bestätigen. Am carboxyterminalen Ende des *R* Proteins liegt die NLS „C“, die dem MAT α-2 Typ entspricht (MISEALRKAIGKR). Die mediale NLS „M“ ist in der basischen Helix-Loop-Helix Region lokalisiert und entspricht dem SV40 Typ (MSERKRREKL). Die aminoterminale NLS ist eher ungewöhnlich, da sie mehrere Arginine enthält, die sonst so nur in wenigen viralen Proteinen zu finden sind (GDRAAPARP) (Abbildung 1). Shieh *et al.* (1993) konnten zeigen, daß jedes Signal unabhängig voneinander funktioniert, jedoch weniger effektiv als wenn zwei oder drei Signale vorhanden sind.

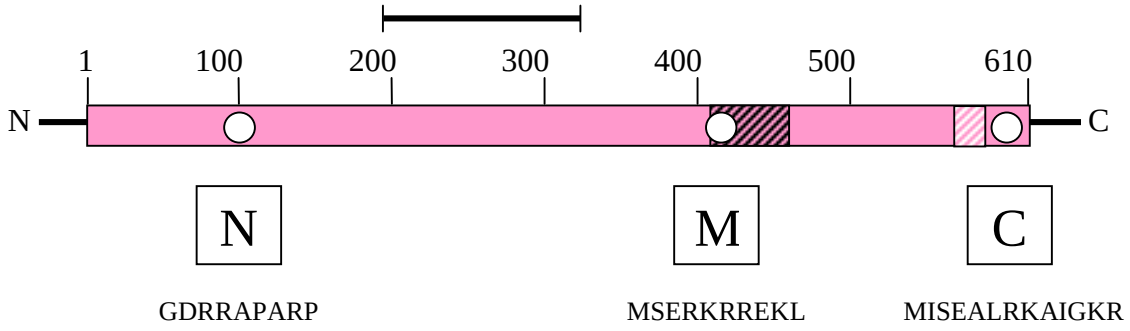

Abbildung 1: Schematische Darstellung der Kernlokalisationsequenzen (NLS) N, M und C innerhalb der *R* Aminosäuresequenz

Im *R* Protein sind drei NLS (weiße Punkte) näher charakterisiert worden (Shieh *et al*., 1993). Die carboxyterminale NLS „C“ ist dem MAT α-2 Typ ähnlich. Die mediale NLS „M“ , die in der basischen Helix-Loop-Helix Region liegt (schwarz-rosa schraffierte Box), ist vom Typ SV40. Die aminoterminale NLS ist eher ungewöhnlich, da sie mehrere Arginine enthält, die sonst so nur in wenigen viralen Proteinen zu finden ist.
Am aminoterminalen Ende befindet sich die saure Domäne (Balken über dem Protein) (Ludwig *et al.*, 1989), die typisch für diese Klasse von Transkriptionsfaktoren ist. Am carboxyterminalen Ende befindet sich eine Region mit noch unbekannter Funktion (weiß-rosa schraffiert).
Die Zahlen geben die Position in der Aminosäuresequenz an. (N) aminoterminales Ende, (C) carboxyterminales Ende.

Studien in tierischen Systemen über die basische Helix-Loop-Helix Region zeigten, daß die basische Region für die DNA Bindung und der Helix-Loop-Helix Bereich für die Dimerisierung der Untereinheiten verantwortlich ist (Murre *et al*., 1989; Davis *et al*, 1990). Die bekannten Allele von *R* (*R-Sn, R-S, R-Lc*) und *B* (*B-Peru, B-I*) sind jedoch allein nicht ausreichend für die Produktion von Anthocyanen. Zusätzlich werden noch die Genprodukte *C1* bzw. *Pl* benötigt.

Die einander homologen Gene *Pl* und *C1* kodieren für Proteine mit einer aminoterminalen basischen Region und einer carboxyterminal gelegenen sauren Domäne, die charakteristisch für **myb**-Onkogen Transkriptionsfaktoren sind. Von *C1* sind die Allele *C1* (Paz-Ares *et al*., 1987) und *C1-I* (Paz-Ares *et al*., 1990) bekannt (Abbildung 2). Sequenzanalysen zeigten, daß sich das putative *C1-I* Protein in einigen Positionen von dem Wildtyp *C1* unterscheidet. Der Hauptunterschied liegt hierbei am carboxyterminalen Ende: dem *C1-I* fehlt die funktionierende, transkriptionsaktivierende Domäne (Sequenzvergleich siehe Anhang, Abbildung 77 Seite 171). Paz-Ares *et al*. (1990) postulieren, daß im Gegensatz zu *C1*, das *C1-I* Protein hierdurch eine Repressorfunktion ausübt. Die Beobachtung, daß Maiskörner mit *C1-I* Allel farblos sind, unterstützt diese These.

Damit eine Anthocyanbiosynthese in den verschieden Geweben erfolgt, ist eine koordinierte Expression der regulierenden Gene nötig. In der Aleuronschicht, in den Antheren und in der Coleoptile wirken *R* und *C1* zusammen, in den restlichen Pflanzenteilen *B* und *Pl* (Coe *et al*., 1988). Mit dem Two Hybrid System wurde die direkte Interaktion von der *C1* myb-Domäne (AS 1-117) mit der aminoterminalen Region von *B* (AS 1-244) und *R* (AS 1-252) nachgewiesen (Goff *et al*, 1992; Grotewold *et al*. 2000).

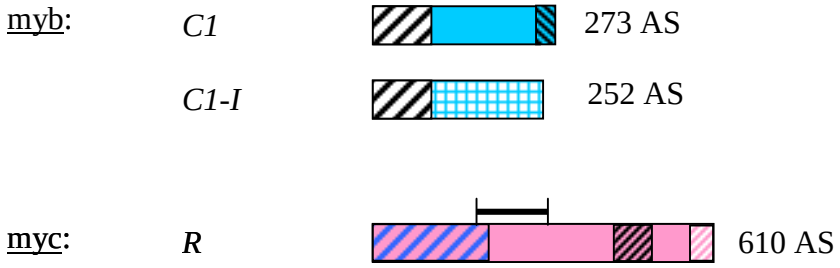

Abbildung 2: myb- und myc- homologe Proteine

Die Aktivierung der Anthocyanbiosynthese in der Aleuronschicht erfolgt durch das Zusammenwirken der myb- und myc-homologen Proteine *C1* (blau) und *R* (rosa). In transienten Assays wurde die direkte Interaktion der *C1* myb-Domäne (schwarz/ weiß schraffiert) mit aminoterminalen Bereich von *R* (rosa/ blau schraffiert) nachgewiesen (Grotewold *et al*., 2000). Das *R* Protein enthält einen Bereich mit einer myc-homologen basischen Helix-loop-Helix Region (schwarz/ rosa schraffiert), die für die DNA-Bindung und Dimerisierung benötigt wird und es enthält eine carboxyterminale Region mit noch unbekannter Funktion (rosa/ weiß schraffiert). Der Balken über dem R Protein markiert die saure Domäne, die typisch für diese Klasse von Transkriptionsfaktoren ist.
Die transkriptionsaktivierende saure Domäne in *C1* (schwarz/ blau schraffiert) fehlt in der Mutante *C1-I*.
Die Anzahl der Aminosäuren (AS) der Proteine ist angegeben.

Das *P* Gen codiert ebenfalls für ein myb-homologes Protein. Es reguliert einen parallelen Anthocyanbiosyntheseweg, der zur Bildung von farbigen Phlobaphenen in den Blütenorganen führt. Im Gegensatz zu *C1* und *Pl* wird jedoch kein Partner benötigt und *P* ist alleine in der Lage, die Akkumulation der Transkripte verschiedener Strukturgene zu beeinflussen (Grotewold *et al*.,1994).
Vp1 steht in der Hierarchie einen Schritt über den anderen regulierenden Genen. Kao *et al*. (1996) konnten in transienten Expressionsanalysen zeigen, daß es direkt die Expression des *C1* Gens in den Körnern beeinflusst.

1.2.1 *Das Intensifier* Gen

Das *Intensifier* Gen wurde von Burr *et al*. (1996) mittels „Transposon tagging“ kloniert und näher charakterisiert. Es wird, wie *R* und *C1*, in dem einschichtigen Aleuron-Gewebe der Maiskörner exprimiert. Von *In* sind bislang drei Allele aus Mais näher charakterisiert worden. Das sind neben *In* (Burr *et al*., 1996), die Allele *in* (Herrmann, 2000) und *InD*. Hierbei konnte gezeigt werden, daß das *InD* Allel aus zwei veränderten *Intensifier* Genkopien besteht: *InD1*

(Rojek, 1996) und *InD2* (Pusch, 2000). Das *Intensifier* Gen, aus einem wilden Vorfahren von Mais, Teosinte (Zea spp.), wurde erst vor kurzem isoliert und näher charakterisiert (Weber, 2001).

Alle *Intensifier* Allele aus Mais, sowie das identifizierte Gen aus Teosinte, weisen mit neun Exons und acht Introns die gleiche Exon- und Intronstruktur auf. Der Vergleich der Exonsequenzen zwischen den *Intensifier* Allelen aus Mais und dem *Intensifier* Gen aus Teosinte weist eine Homologie von 96-100 % (Weber, 2001) auf. Die einzige Ausnahme stellt eine Transposon-Insertion (BEB) in Exon 6 der *InD2* Kopie dar, welche nicht in den anderen *Intensifier* Allelen aus Mais und ebenfalls nicht im *Intensifier* Gen aus Teosinte enthalten ist. Durch diese Insertion wurde ein zusätzliches Stopp Codon eingeführt, wodurch die *InD2* Kopie nicht für ein vollständiges Protein kodiert.

Es konnte gezeigt werden, daß die meisten Transkripte der Mais Allele *In* und *InD*, sowie des *In* Gens aus Teosinte, noch Intronsequenzen enthalten (Burr *et al*., 1996; Rojek, 1996; Pusch, 2000; Weber, 2001). Durch diese Intronsequenzen können Verschiebungen im Leserahmen oder es kann sogar der Abbruch der Translation erfolgen. Die Folge sind veränderte oder verkürzte Proteine, die dadurch eine andere Funktion haben könnten. Das Fehlspleißen betrifft die Introns 2, 5 und 7. Von dem *In* Allel werden nur etwa 0.2 % der Transkripte korrekt gespleißt (Burr *et al*., 1996). Von dem *in* Allel sollen nur Transkripte vorliegen, die zu einem stark verkürzten Protein führen Herrman (2000).

Die vollständigen putativen Proteine *In* und *InD1* zeigen eine starke Homologie zu den verschiedenen myc-homologen Proteinen, zu denen auch *B* und *R* gehören. Diese Homologie betrifft folgende Bereiche: den aminoterminalen gelegenen Bereich, der für die Interaktion mit *C1* benötigt wird und der die saure Domäne enthält; des weiteren die basische Helix-Loop-Helix Region, die für die DNA Bindung und Dimerisierung benötigt wird, sowie einen Bereich ohne bisher definierte Funktion am carboxyterminalen Ende (Abbildung 3).

```
In          : MA-----------AGGR---GEAAQKALQSVAQSTGWTYSLLWRLCPRQ--GALVWAEGYYNGAIRTRKTTMTTVRQPAGAEDAG :  69
InD         : MA-----------AGGGGGGGEAAQKALQSVAQSTGWTYSLLWRLCPRQ--GALVWAEGYYNGAIRTRKTTMTTVRQPAGAEDAG :  72
B-Peru      : MALSAS---PAQEELLQPAGRP-LRKQLAAAARSINWSYALFWSISSTQRPRVLTWTDGFYNGEVKTRKISHSVELTAD------ :  75
DEL         : MA---------TGIQNQKIVPENLRKQLAIAVRSIQWSYAIFWSNSVAQ-PGVLEWGDGFYNGDIKTRKTVQSVELNQD------ :  69
bHLH        : MA---------TG--ENRTVPDNLKKQLAVSVRNIQWSYGIFWSVSASQ-PGVLEWGDGYYNGDIKTRKTIQAAEVKID------ :  67
putative    : MA---------TG--ENRTVPDNLKKQLAVSVRNIQWSYGIFWSVSASQ-PGVLEWGDGYYNGDIKTRKTIQAAEVKID------ :  67
MYC-GP      : MA---------T--ANQKGVTDNLRNQLALAVRSIQWSYAVFWSFSAKQ-SGSLEWGEGYYNGDIKTRKTVQAVELNSD------ :  67
JAF13       : MA---------MGCKDHNGVPDNLREQLAFAVRGIQWSYAILWSTDVSQ-PGELEWSDSNYNGDIKTRKTVQAGEVDED------ :  69
GMYC1       : M--------------------ENLRPKLAMAVRSIQWSYAIFWSIST-V-PGVLAWCDGYYNGDIKTRKTIQAEEINDDDNDDY- :  62
transcript  : MALSASRVQQAEELLQRPAERQLMRSQLAAAARSINWSYALFWSISDTQ-PGVLTWTDGFYNGEVKTRKISNSVELTSD------ :  78
Ra          : M-----------EETPLPSGKN-FRSQLAAAARSINWTYAIFWSISTSR-PGVLTWKDGFYNGEIKTRKITNSMNLTAD------ :  66
LC-R        : MALSASRVQQAEELLQRPAERQLMRSQLAAAARSINWSYALFWSISDTQ-PGVLTWTDGFYNGEVKTRKISNSVELTSD------ :  78

In          : DEETAPRRSRQLKELYDSLAAGEAAYDGGGGVGGPQQQQ---QAAVVPPPRRPAAALAPEDLTETEWFYLMCASYCFPPAVGLPG : 151
InD         : DEETALRRSRQLKELYDSLAAGEAAYDGGGGVGDPQQQQHQQQVAVVPPPRRPAAALAPEDLTETEWFYLLCASYCFPPAVGLPG : 157
B-Peru      : --QLLMQRSEQLRELYEALRSGECDR---------------------RGA--RPVGSLSPEDLGTEWYYVICMTYAFLPGQGLPG : 136
DEL         : --QLGLQRSDQLRELYESLSLGETN----------------------TQAKRPTAALSPEDLTDAEWFFLVCMSFIFNIGQGLPG : 130
bHLH        : --QLGLERSEQLRELYESLSLAESSASG----------------SSQVTRRASAAALSPEDLTDTEWYYLVCMSFVFNIGEGIPG : 134
putative    : --QLGLERSEQLRELYESLSLAESSASG----------------SSQVTRRASAAALSPEDLTDTEWYYLVCMSFVFNIGEGIPG : 134
MYC-GP      : --PLGLQRSDQLRELEESLSLGETS----------------------PQPKRPTAALSPEDLTDTEWYFLVCMSFVFNVGQGLPG : 128
JAF13       : --QLGLQRTEQLRDLYSSLLIGEGEE------------------DLQPQAKRPSAALSPEDLTDTVWYFLVCMSFVFNVGQGLPG : 134
GMYC1       : --EVGLQRTEQLRQLYESLSSASETHPY----------------SYEQQTRRPAAALSPEDLTDTEWYFLVCMTEEFTKGQGLPG : 129
transcript  : --QLVMQRSDQLRELYEALLSGE--------------------GDRRAAPVRPAGSLSPEDLGDTEWYYVVSMTYAFRPGQGLPG : 141
Ra          : --ELVLQRSEQLRELYDSLLSGECGH-------------------RAR--RPVAALLPEDLGDTEWYYVVCMTYAFGPGQGLPG : 127
LC-R        : --QLVMQRSDQLRELYEALLSGE--------------------GDRRAAPARPAGSLSPEDLGDTEWYYVVSMTYAFRPGQGLPG : 141

In          : EAFVRRAHVWLCGANKADSKVFSRAILARSAGIQTVACIP-VDDGVLEIGTTEKVEEDIFLIQHVRNIPVDQHG-------AHIM : 228
InD         : EAFVRRAHVWLCGANKADSKVFSRAILARSAGIQTVACIP-VDDGVLEIGTTEKVEEDIFLIQHVRNIPVDQHG-------AHIM : 234
B-Peru      : RSSASNEHVWLCNAHLAGSKDFPRALLAKSASIQTIVCIP-LMGGVLELGTTDKVPEDPDLVSRATVAFWEPQCPTYSKEPSSNP : 220
DEL         : RTLARNQAVWLCNAHRADTKVFSRSLLAKSASIQTVVCFP-YSEGVVELGATELVPEDLNLIQHIKTSPLDSPATVPKIPNYVSN : 214
bHLH        : GALSNGEPIWLCNAETADSKVFTRSLLAKSASLQTVVCFP-FLGGVLEIGTTEHIKEDMNVIQSVKTLPLEAPP-------YTTI : 211
putative    : GALSNGEPIWLCNAETADSKVFTRSLLAKSASLQTVVCFP-FLGGVLEIGTTEHIKEDMNVIQSVKTLPLEAPP-------YTTI : 211
MYC-GP      : RSFSKNDTIWLRNAHLADTKLFSRSLLAKSASLQTVVCFP-HLGGVVELGTTELVAEDRNLIQHIKTSPLESSS---------DT : 203
JAF13       : KSLARHETIWLCNAHQAESSVFSRSLIAKSASIQTVVCFP-YLGGVIELGVTELVVEDPNLIQQIKISILKVDHSIIPKRPNYVS : 218
GMYC1       : RTLAKNTASWLCNAHFADSKVFSRSLLAKSASIQTVVCFP-YLEGIVEFGITEKVLEEQNIIKQIKASIFDTPS----------K : 203
transcript  : RSFASDEHVWLCNAHLAGSKAFPRALLAKSASIQSILCIP-VMGGVLELGTTDTVPEAPDLVSRATAGFWEPQCPTYSEEPSSSP : 225
Ra          : KSFASNEFVWLTNAQSADRKLFHRALIAKSASIKTIVCVPFIMHGVLEIGTTDPISEDPALVDRIAASFWD------------TP : 200
LC-R        : RSFASDEHVWLCNAHLAGSKAFPRALLAKSASIQSILCIP-VMGGVLELGTTDTVPEAPDLVSRATAAFWEPQCP------SSSP : 219

In          : PTTLSGYSTSTPTTQLNHQPFQTKTGISLNLGDERNSEMEDDDDDGRIDLENNTENDSTRRHLPQDASAGNELETLNAESSGPML : 313
InD         : PTTLSGYSTSTPTTQLNHHQPFQTKTGISLNLGDERNSEMEDDDDDGRIDLENNTENDSTRRHLPQDASVGNELETLNAESSGPML : 319
B-Peru      : S--AYETGEAAY---IVVLEDLDHN-AMDMETVTAAAGRHGTGQELG--EVESPSN-ASLEHITKGIDEFYSLCEEMDVQ----P : 292
DEL         : SITNNNDLICEALEHANIPENDLDQLLNCPDTNICSPDNSLDDFADNLLIDESNLAEGINGEVPQTQSWPFMDDAISNCLNSSMN : 299
bHLH        : STRSDYQEIFDPLSDDKYTPVFIT---------EAFPTTSTSGFEYEPEDHDSFIND---GGASQVQSWQFVGEEISNCIHQSLN : 284
putative    : STRSDYQEIFDPLSDDKYTPVFIT---------EAFPTTSTSGFEQEPEDHDSFIND---GGASQVQSWQFVGEEISNCIHQSLN : 284
MYC-GP      : VINPNHDLVYQVLDHANDPENNLD------DVEVCSPDTSSDDFADNVLIEGSSLADGADGEASQLQNWQFKDDAISNGLNNSTS : 282
JAF13       : SDAKNDAIGLCPKPDHNVLENDAYT----VEINNSSPHDSSNGFGANQEVEVSLMVVGVIGETSQAQSWKFTDDNMSNGVHNSLN : 299
GMYC1       : RFLETPLESCSAMLDHDDLDMILEC-----ETIKNRNNSPKNSLNCSREQSLQFLDDEEDGDVSFFN-------------NNSVG : 270
transcript  : SGRANETGEAAADDGTFAFEELDHNNGMD-IEAMTAAGGHGQEEELRLREAEALSDDASLEHITKEIEEFYSLCEEMDLQALPLP : 309
Ra          : PRAAFSS--EAGDADIVVFEDLDHGNAAVEATTTTVPGEPHAVAGGEVAECEPNADNDLEQITMDDIGELYSLCEELDVVRPLDD : 283
LC-R        : SGRANETGEAAADDGTFAFEELDHNNGMDDIEAMTAAGGHGQEEELRLREAEALSDDASLEHITKEIEEFYSLCDEMDLQALPLP : 304

In          : IANLTAQDEYGQLHRFLSVDLS------SKYLQSPGAEDQAAVAENAHYIETVLRILRFNACRQTQAASSNIAKTYLALSKNSPF : 392
InD         : IANLTAQDEYGPLHRFLSVDLS------SKYLQSPGAEGQAAVAENAHYIETVLRILRSNACRQTRAAS-NVVKTYLALSKNSPF : 397
B-Peru      : LEDAWIMDG--SNFEVPSS-------------------------------------ALPVDGSSAPADGS--------RATSF : 328
DEL         : SSDCISQTHENLESFAPLSDGKGPPETNNCMHSTQKCNQ-QIENTGVQGDEVHYQGVLSNLLKSSHQLVLGPYFRNGN--FESSF : 381
bHLH        : SSDCVSQTFVGTTGRLACDPRK-----SRIQRLGQIQEQ---SNHVNMDDDVHYQGVISTIFKTTHQLILGPQFQNFD--KRSSF : 359
putative    : SSDCVSQTFVGTTGRLACDPRK-----SRIQRLGQIQEQ---SNHVNMDDDVHYQGVISTIFKTTHQLILGPQFQNFD--KRSSF : 359
MYC-GP      : SSDCVSQTQGNPVTVVQQLDGK--KTSDNCMPVNQECNQ-QKSPPGFNGSDVHYQSVLSSLLKSSHQLMLGP-NRNGK--QESSF : 361
JAF13       : SSDCTSQNYANCEKLSPLSSGE--KETKPAPLDHQEHNQRKLHLLDHQGDETQYQSVLSTLLKSSDQLTLGPYFRNTN--KRSCF : 380
GMYC1       : SSDCISQN---------LISGP-----ND----------------LWSDDDSRYQCVLSTIFKNTRRLILGPHFTQCNG-KESGF : 324
transcript  : LEEGWTVDA--SNFEVPCSSPQ-------------------------PAPPPVDRATANVAADASRAPVYGS--------RATSF : 359
Ra          : DSSSWAVADPWSSFQLVLTSS-------------------------PAPDQAPAAEATDVDDVVVAALDGSSIDGSCRPSPSSF : 342
LC-R        : LEDGWTVDA--SNFEVPCSSPQ-------------------------PAPPPVDRATANVAADASRAPVYGS--------RATSF : 354
```

Fortsetzung folgt

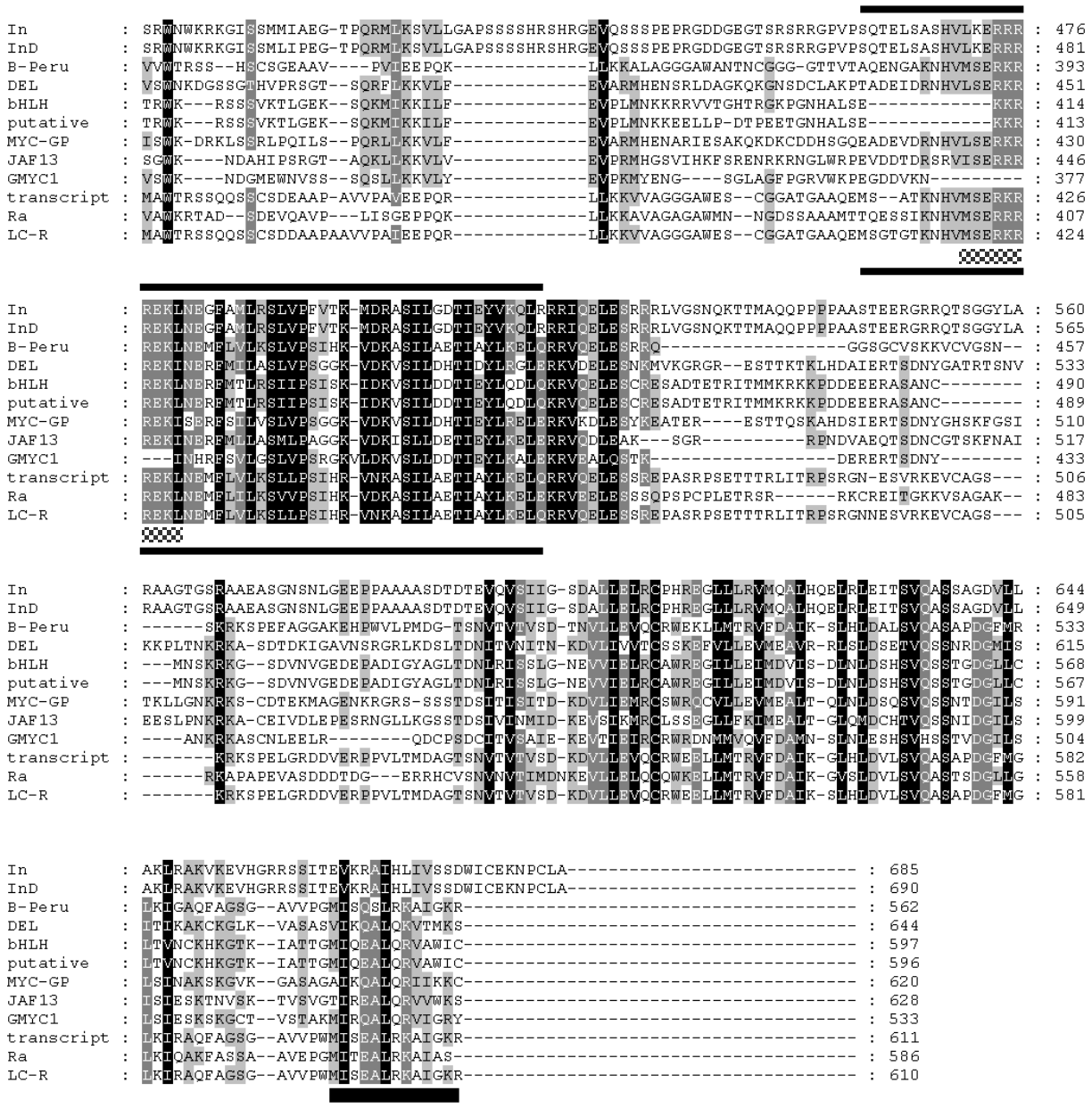

Abbildung 3: Vergleich der *In* und *InD1* Aminosäuresequenzen mit myc-homologen Proteinen

Die putativen Proteine *In* (erste Zeile) und *InD1* (zweite Zeile) zeigen Homologien zu anderen myc-homologen Proteinen (grau oder schwarz unterlegt). Unter anderem zu dem *R* Protein (LC-R, letzte Zeile) und dem *B* Protein (B-Peru, dritte Zeile).
Die charakteristische basische Helix-Loop-Helix Region ist oberhalb und unterhalb des Sequenzvergleiches mit Querbalken gekennzeichnet. Hier befindet sich eine der drei charakterisierten Kernlokalisierungssequenzen des *R* Proteins (gemusterte Linie). Die beiden anderen NLS (fette schwarze Linien) befinden sich am aminoterminalen und carboxyterminalen Ende von *R* und zeigen keine hohe Homologie zu der *In* oder *InD1* Sequenz.
In repressor-like protein [Zea mays] (U57899); *InD1* (Rojek, 1996); B-Peru regulatory protein– [maize] (S16594); DEL helix-loop-helix protein - [garden snapdragon] (A42220); bHLH protein [Arabidopsis thaliana] (AAB72192); putative transcription factor [Arabidopsis thaliana] (AAF09158); MYC-GP [Perilla frutescens] (BAA75514); JAF13 bHLH transcription factor [Petunia x hybrida] (AAC39455); GMYC1 protein [Gerbera hybrida] (CAA07615); transcription factor [Zea mays] (CAB92300); Ra transcription activator - [rice] (S65802); LC-*R* regulatory protein [Zea mays] (P13526)

Liegt das *Intensifier* Gen homozygot rezessiv vor (*in*), kann eine stärkere Ansammlung von Anthocyanen in der Aleuronschicht beobachtet werden. Die Körner haben eine tiefrote bis schwarze Färbung. Die Körner mit dem dominanten *Intensifier* Allel (*In*) sind, im Vergleich zu *in*, weniger stark gefärbt. Liegt das *Intensifier* Allel *InD* homozygot vor, ist das Aleuron weniger stark gefärbt als bei *In*, die Körner haben eine blaßrote Färbung (Abbildung 4).

C2/ in/ Whp **C2/ In/ Whp** **C2/ InD/ Whp**

Abbildung 4: Phänotyp von Körnern der drei Mais Allele *In*, *in* und *InD*

Einfluß der verschiedenen *In* Allele (*in*, *In* und *InD*) auf die Pigmentierung der Aleuronschicht bei Maiskörnern. Die Abbildung wurde übernommen aus Rojek (1996). Alle aufgelisteten Allele liegen in den Genotypen homozygot vor.

Coe und Neuffer (1977) und Franken *et al*. (1991) konnten zeigen, daß diese unterschiedliche Anhäufung von Anthocyanen auf unterschiedliche Mengen an gebildeter Chalkonsynthase zurückzuführen ist, welche durch die Strukturgene *C2* und *Whp* kodiert wird. Die Produkte der verschiedenen *Intensifier* Allele scheinen einen negativ regulierenden Einfluss auf dieses Schlüsselenzym der Anthocyanbiosynthese zu haben. Franken *et al*. (1991) fanden Hinweise, daß die Regulierung von *Whp* durch *In* auf der Ebene der Translation stattfinden könnte. Burr *et al.* (1996) vermuten dagegen, daß es sich bei dem *Intensifier* Genprodukt, aufgrund der Homologie zu den myc-homologen Proteinen *R* und *B*, um einen negativ regulierenden Transkriptionsfaktor handelt.

Falls es sich bei dem *Intensifier* Genprodukt um einen Transkriptionsfaktor handelt, könnte der inhibitorische Effekt dadurch entstehen, daß es die Bildung von funktionellen, transkriptionsaktivierenden myc-myb Komplexen aus *R* und *C1* behindert. Dieser Komplex wird für die Aktivierung der Strukturgene *C2* und *Whp* benötigt (Abbildung 5,). Die Inhibierung könnte enstehen, wenn das myc-homologe *Intensifier* Genprodukt mit dem myb-homologen Genprodukt *C1* funktionsunfähige myc-myb Komplexe bildet (Abbildung 6, b). Eine andere Möglichkeit wäre die Interaktion mit dem myc-homologen Genprodukt von *R*,

die zur Bildung von funktionsunfähigen Heterodimeren führen könnte (Abbildung 6, c). Als dritte Möglichkeit wäre die Interaktion mit bereits bestehenden Komplexen aus *C1* und *R* denkbar (Abbildung 6, d). Durch diese Interaktionen könnte eine Reduktion funktioneller Komplexe aus *R* und *C1* erfolgen und somit auch eine Reduktion der Pigmentierung.

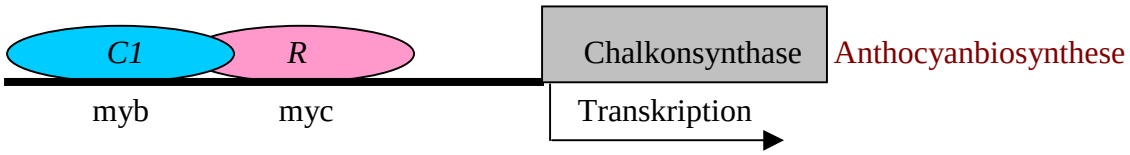

Abbildung 5: Schematische Darstellung der Interaktion von *R* und *C1*

Durch die Interaktion des myb-homologen Genproduktes *C1* mit dem myc-homologen Genprodukt *R* und durch die Bindung in der Promotorregion responsiver Gene (fette Linie), wird die Anthocyanbiosynthese in den Körnern initiiert. *C1* und *R* beeinflussen unter anderem die Expression der Strukturgene *C2* und *Whp*, welche für das Schlüsselenzym Chalkonsynthase (graue Box) kodieren.

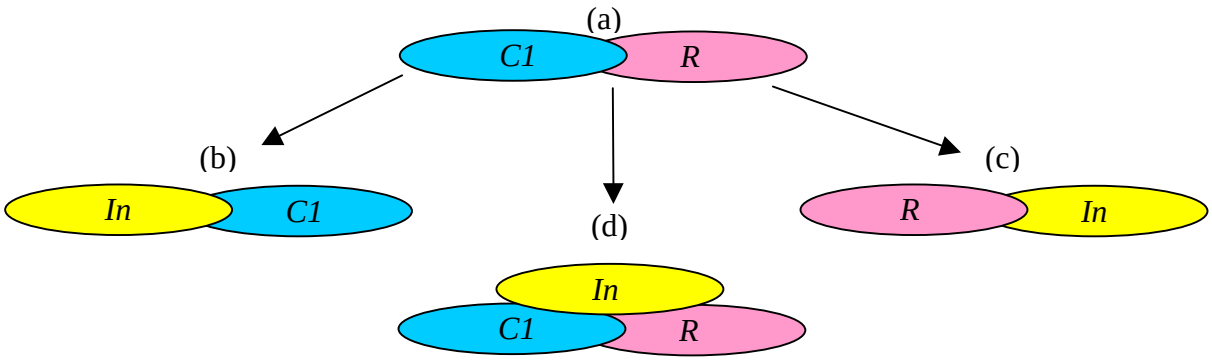

Abbildung 6: Schematische Darstellung der möglichen Interaktion von *In* mit *R* und *C1*

Das myc-homologe *Intensifier* Genprodukt (*In*) ist ein negativer Regulator der Anthocyanbiosynthese. Aufgrund der Homologie zu dem myc-homologen Genprodukt *R* könnte es sowohl mit *C1* als auch mit *R* interagieren und so für eine Reduktion funktioneller Komplexe aus *C1* und *R* (a) sorgen. Diese Interaktion könnte ausschließlich mit *C1* (b) oder mit *R* (c) erfolgen. Des weiteren wäre eine Interaktion mit dem gebildeten Komplex aus *C1* und *R* (d) möglich.

1.2.2 Das Two Hybrid System

Das Two Hybrid System ist ein eukaryotisches System um die Interaktion von Protein X mit Protein Y *in vivo* zu detektieren. In diesem System wird das Gal4 Protein aus Hefe verwendet. Das native Gal4 Protein (AS 1-881) ist ein Transkriptionsaktivator, der für den Galaktose Katabolismus benötigt wird. Er besteht unter anderem aus zwei Aktivierungsdomänen (AS 148-196; AS 768-881) und einer N-terminalen DNA-Bindedomäne (AS 1-147), die an die

„upstream activating sequence“ (UAS) diverser Gene des Galaktose Katabolismus bindet (z.B. UAS_{Gal1} und UAS_{Gal4}) (Ma und Ptashne, 1987).

Die DNA-Bindedomäne (AS 1-147) und Aktivierungsdomäne (AS 761-881) können separiert werden, um Hybridproteine herzustellen (Abbildung 7). Bei der Interaktion des Proteins Y mit dem an die DNA gebundenen Protein X wird die Funktion des Gal4 weitgehend restauriert. Es folgt die Transkription von Reportergenen unter der Kontrolle von UAS_{Gal}. Weder das BD-Hybridprotein noch das AD-Hybridprotein sollten in der Lage sein, in Abwesenheit des Interaktionpartners, die Reportergene zu aktivieren.

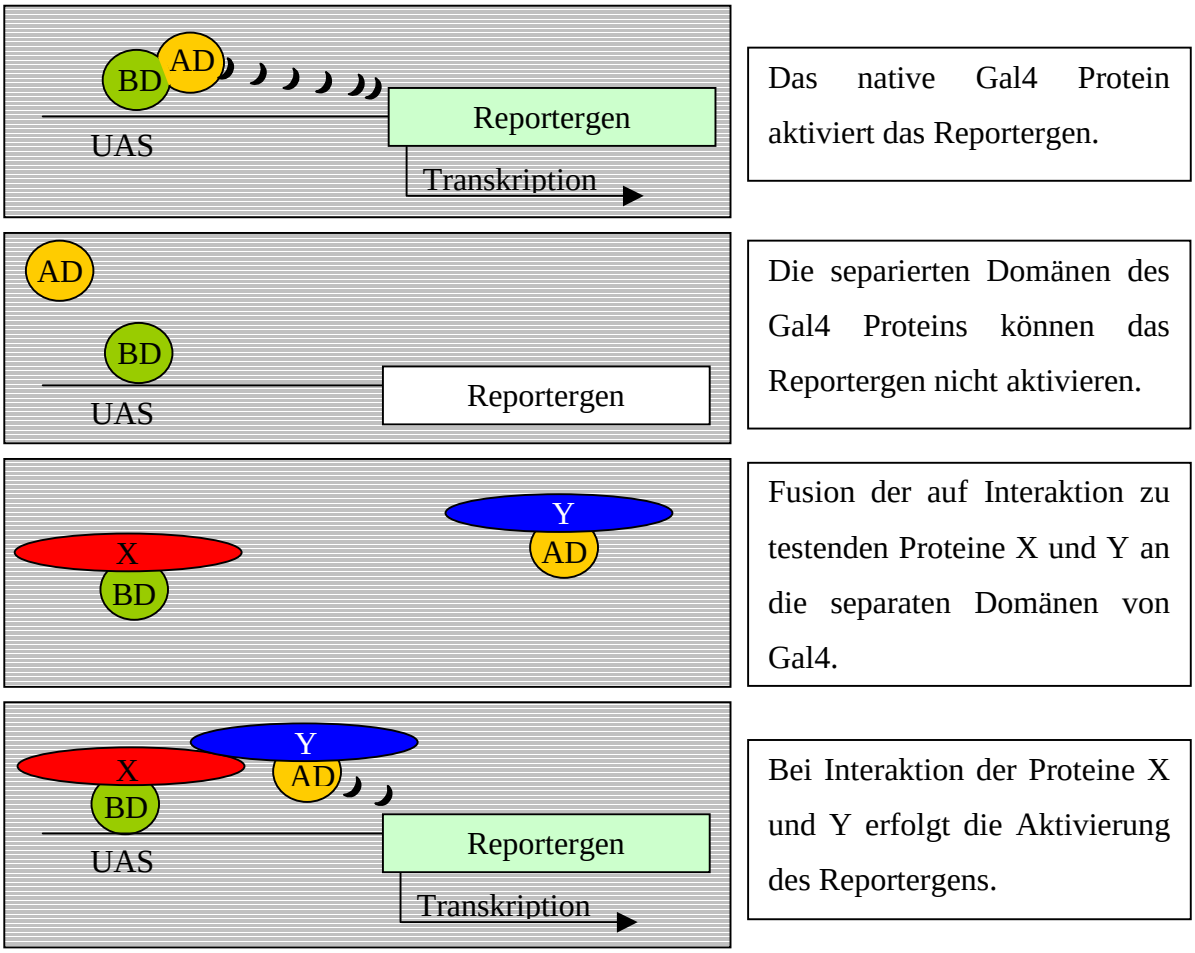

Abbildung 7: Schematische Darstellung des Two Hybrid Systems

X und Y stehen für die Proteine, die auf eine mögliche Interaktion getestetet werden sollen, sie sind mit der AD (Aktivierungsdomäne von Gal4) oder BD (DNA Bindedomäne von Gal4) fusioniert, UAS (upstream activating sequence = DNA Bindestelle der Gal4 DNA Bindedomäne)

1.3 Zielsetzung der Arbeit

Die Funktion des *Intensifier* Genproduktes ist noch nicht geklärt. Burr *et al.* (1996) vermuten, daß es sich um einen negativ regulierenden Transkriptionsfaktor (Repressor) handelt, der die Bildung von transkriptionsaktivierenden Komplexen aus den Transkriptionsfaktoren *R* und *C1* behindert. Hierbei stellt sich die Frage, ob und wenn ja, wie das *Intensifier* Gen mit den Genen *C1* und *R* interagiert. Dabei wäre zu klären, ob das *Intensifier* Genprodukt mit dem Genprodukt *C1* interagiert (Abbildung 6, b) oder mit dem Genprodukt von *R* interagiert (Abbildung 6, c) oder mit bereits bestehende Komplexe aus *C1* und *R* interagiert (Abbildung 6, d).
Um Hinweise auf die Wirkungsweise des *Intensifier* Genproduktes zu erhalten sollte untersucht werden, ob es mit einem (*C1*, *R*) oder mit beiden Proteinen (*C1*+*R*) interagieren kann. Dazu sollten Untersuchungen mit dem Two Hybrid System (Field und Song, 1989) durchgeführt werden. Hierbei sollten die Produkte verschiedener *Intensifier* Allele einbezogen und hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur Interaktion verglichen werden.

Goff *et al*. (1992) konnten eine Interaktion zwischen dem *C1* Protein und dem *R*-homologen *B* Protein (mit einem deletierten *B* Protein) nachweisen. Sie verwendeten ein *B* Protein, aus welchem der Bereich mit der basischen Helix-Loop-Helix-Region entfernt wurde. Sie konnten dabei die für die Interaktion wichtigen Bereiche definieren. Ebensolche Versuche sollten unter Einbeziehung des *Intensifier* Gens (Proteins) durchgeführt werden.

Der Vergleich der Aminosäuresequenzen der putativen Proteine der *Intensifier* Allele *In* und *InD* mit *R* und anderen basischen myc-homologen Proteinen zeigt u.a. eine starke Homologie im Bereich der basischen Helix-Loop-Helix Region (Abbildung 3), in der sich die mediale Kernlokalisierungssequenz (NLS) des *R* Proteins befindet (Shieh *et al*., 1993). Die anderen zwei NLS des *R* Proteins sind dagegen weder in der Aminosäuresequenz des *In* Proteins noch in der Aminosäuresequenz des *InD1* Proteins konserviert. Aufgrund der Homologie zu der medialen NLS wurde vermutet, daß die entsprechende Sequenz in dem *Intensifier* Genprodukt ebenfalls eine Funktion als NLS aufweisen könnte.
Das Vorhandensein einer möglichen NLS in dem *Intensifier* Genprodukt deutet darauf hin, daß dieses ebenfalls im Zellkern lokalisiert sein könnte. Um festzustellen, ob diese NLS funktionsfähig ist war deshalb die zweite Zielsetzung der vorliegenden Arbeit festzustellen, ob das *Intensifier* Genprodukt in den Zellkern transportiert wird. Dazu sollten *in vivo* Lokalisationsstudien mit dem grünen fluoreszierenden Protein (GFP) als Reporterprotein durchgeführt werden. Die Lokalisation und Funktion einer NLS des *Intensifier* Genproduktes sollte damit auch helfen, die noch offene Frage zu klären, ob das *Intensifier* Genprodukt im Kern oder eventuell posttranskriptional im Cytoplasma wirkt.

2 Material und Methoden

2.1 Material

Die für Puffer und Lösungen verwendeten Chemikalien (Reinheitsgrad: zur Analyse) wurden von den Firmen Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg), Biomol (Hamburg), Biozym (Oldenburg) Roche (Mannheim), Duchefa (Harlem, Niederlande), Merck (Darmstadt), Perkin Elmer Applied Biosystems (Weiterstadt), Promega (Madison, WI), Qiagen (Hilden), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg), Sigma (Deisenhofen), Stratagene (Heidelberg) und USB (Cleveland, USA) bezogen.

Die verwendeten Enzyme und Größenstandards wurden von den Firmen Life Technologies/ Gibco BRL (Karlsruhe), Roche (Mannheim), Eurogentec (Seraing, Belgien) und MBI Fermentas (St. Leon Roth) bezogen.

Die in dieser Arbeit verwendeten Kits (Concert™ Rapid Plasmid Miniprep, GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit) stammen von den Firmen Life Technologies/ Gibco BRL (Karlsruhe), Stratagene (Heidelberg) und Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg).

2.1.1 Größenstandards

Die in dieser Arbeit verwendeten DNA Größenstandards waren der Marker „Smart Ladder“ (Firma Eurogentech; Seraing, Belgien) und der „DNA Molekular Weight Marker X“ (Boehringer Mannheim). Als Größenstandard für die Proteinanalysen wurde der „Protein Color Marker, Wide Range“ der Firma Sigma (Deisenhofen) verwendet.

2.1.2 Primer

Die verwendeten Primer für Sequenzierungsreaktionen und PCR wurden von der Firma Life Technologies/ Gibco BRL (Karlsruhe) bezogen. Die Liste der in dieser Arbeit verwendeten Primer kann dem Anhang entnommen werden.

2.1.3 Puffer und Nährmedien

Die Puffer und Nährmedien werden, falls nicht anders vermerkt, mit aqua bidest angesetzt.

Antibiotikum Stammlösung

50 mg/ ml	Ampicillin
50 mg/ ml	Kanamycin
5 mg/ ml	Tetracyclin in Wasser/ Ethanol (1:1)

Die Lösungen werden sterilfiltriert und in Aliquots zu 1 ml bei –20°C gelagert.

Bjierum-Schaefer-Nilson-Puffer (Transfer-Puffer)

48 mM	Tris base
39 mM	Glycine
20 %	Methanol
0,037 %	SDS

Blockierungspuffer I

4 %	Magermilchpulver

Das Substrat wird in 1x TBST gelöst.

2M $CaCl_2$

3,68 g/ 10 ml

Die Lösung wird sterilfiltriert und in 1 ml Aliquots bei -20°C gelagert.

Coomassie-Färbelösung

0,25 g	Coomassie Brilliant Blue R 250
45 ml	Methanol
45 ml	Wasser
10 ml	Essigsäure (96 %ig)

Detektionslösung I

2.5 M	Luminol (3-aminophtalhydrazide)
400 M	p-Coumarsäure
0,1 M	Tris-HCl pH 8.0

Detektionslösung II

5,4 mM	H2O2
0,1M	Tris-HCl pH 8.5

DNA-Probenpuffer

0,25 %	Bromophenol Blau
30 %	Glycerol

10x Dropout-Lösung

300 mg/ l	L-Isoleucin
1500 mg/ l	L-Valin
200 mg/ l	L-Adenin Hemisulfat
200 mg/ l	L-Argenin HCL
300 mg/ l	L-Lysin HCL
200 mg/ l	L-Methionin
500 mg/ l	L-Phenylalanin
2000 mg/ l	L-Threonin
300 mg/ l	L-Tyrosin
200 mg/ l	L-Uracil

1000 mg/ l	L-Leucin
200 mg/ l	L-Tryptophan
200 mg/ l	L-Histidin HCL Monohydrat

Je nach Bedarf werden Leucin, Tryptophan oder Histidin dem 10x Dropout nicht zugesetzt. Die Lösung wird autoklaviert.

1 M DTT (Dithiothreitol)

1,55 g	DTT

Das Substrat wird in 10 ml 10 mM Natrium Acetat (pH 5.2) gelöst und nach dem Sterilfiltrieren bei –20°C gelagert.

0.5M EDTA (Ethylendiamintetraacetat)

186,1 g/ l	EDTA

pH 8,0

EGL Puffer

0,1 M	KPO4
1 mM	EDTA
5 %	Glycerol
10 mM	DTT

Entfärbelösung

10 %	Methanol
10 %	Essigsäure (96 %ig)

Ethidiumbromid

1 g/ 100 ml	Ethidiumbromid

Hefe-Lysispuffer

2 %	Triton X-100
1 %	SDS
100 mM	NaCl
100 mM	Tris-HCl pH 8.0
1 mM	EDTA

Hefe-Probenpuffer für SDS PAGE

0.006M	Tris-HCl ph 6.8
10 %	Glycerol
2 %	SDS
5 %	β-Mercaptoethanol

Bromphenol Blau

Die Lösung wird in Aliquots von 1 ml bei –20°C gelagert.

0.1 M IPTG (Isopropylthio-β-D-galactoside)

2 g/ 10 ml	IPTG

Die Lösung wird sterilfiltriert und in 1 ml Aliquots bei –20°C gelagert.

10x Laemmli

144 g/ l	Glycine
30 g/ l	Tris-base
0,1 %	SDS

LB-Medium

10 g/ l	Tryptone
5 g/ l	Yeast Extract
10 g/ l	NaCl
0,8 %	Agar (für Festmedien)

pH 7,5

Die Lösung wird autoklaviert. Für die Plasmid- oder Bakterienstammselektion wird das LB-Medium mit 80 µg/ ml Ampicillin, 50 µg/ ml Kanamycin oder 30 µg/ ml Tetrazyklin versetzt.

Lösung A

10 mM	Bicine (N,N -bis-(2-Hydroxyethylglycine)) pH 8,35
1 M	Sorbitol
3 %	Ethylenglycol

Die Lösung wird sterilfiltriert und anschließend bei -20°C gelagert.

Lösung B

200 mM	Bicine (N,N -bis-(2-Hydroxyethylglycine)) pH 8,35
40 %	PEG 1000

Die Lösung wird sterilfiltriert.

Lösung C

10 mM	Bicine (N,N -bis-(2-Hydroxyethylglycine)) pH 8,35
150 mM	NaCl

Die Lösung wird sterilfiltriert.

Lysozymlösung

10 mg / ml in Telt-Puffer

1M $MgCl_2$

203,3 g/ l $MgCl_2$ x 6 H_2O

Die Lösung wird autoklaviert.

MS-Medium

MS Fertigmedium (Duchefa, #0222)

3 % Saccharose

0,8 % Agarose

pH 5,9

Die Lösung wird autoklaviert.

3M Natriumacetat

408,1g/ l Natriumacetat x 3 H2O

pH 5,2

Die Lösung wird autoklaviert.

ONPG (o-nitrophenyl β-D-galactopyranoside)

4 mg/ ml ONPG

Das Substrat wird in Z-Puffer gelöst.

Phenol - Chloroform

1 Vol. Phenol (Tris ph 7,8 – 8,0 stabilisiert)

1 Vol. Chloroform

Ponceau S

20 ml Ponceau S Konzentrat (Sigma p7767)

180 ml Wasser

Sequenzprobenpuffer

Formamid

25 mM EDTA ph 8.0

Blue Dextran

SDS-Probenpuffer

0.25 %	Bromophenol Blau
3 %	SDS
0,4 M	β-Mercapthoethanol
20 %	Glycerol

20x SSC

175,3 g/ l	NaCl
88,2 g/ l	Natriumcitrat
pH 7,0	

20x SSPE

175,3 g/ l	NaCl
27,6 g/ l	NaH_2PO_4
7,4 g/ l	EDTA
pH 7,4	

1M Na2CO3

106 g/ l	Na_2CO_3

50 x TAE

242 g/ l	Tris base
57,1 ml	Essigsäure (96 %ig)
100 ml	0.5 M EDTA pH 8.0

10x TBE

108 g/l	Tris base
55 g/ l	Borsäure
7,4 g/ l	EDTA

10x TBST

12,1 g/ l	Tris base
87,66 g/l	NaCl
5 g/ l	TWEEN 20

pH 8,0

TE

10 mM	Tris-HCl (pH 8,0)
1 mM	EDTA (pH 8,0)

Die Lösung wird aus sterilen Stammlösungen angesetzt.

TELT-Puffer

50 mM	Tris (pH 8,0)
2,5 M	LiCl
62,5 mM	EDTA
0,4 %	Triton X

TFB-Puffer I

30 mM	Kaliumacetate (pH 5,8)
50 mM	$MnCl_2$
100 mM	RbCl
10 mM	$CaCl_2$
15 %	Glycerol

Die Lösung wird aus sterilen Stammlösungen angesetzt.

TFB-Puffer II

10 mM	MOPS
75 mM	$CaCl_2$
10 mM	NaCl
15 %	Glycerol

Die Lösung wird aus sterilen Stammlösungen angesetzt.

1 M Tris-HCl

121,1 g/l	Tris base

pH einstellen (7,4/ 7,6/ 8,0)

SD-Medium (Selektionsmedium)

6,7 g/ l	Difco nitrogen base ohne Aminosäuren
182,2 g	D-Sorbitol
0,8 %	Agar (für Festmedien)
pH 5,8	

Die Komponenten werden in 860 ml Wasser gelöst und autoklaviert. Nach dem Autoklavieren wird 40 ml sterilfiltrierte 50 %ige Glucose (=Dextrose) und 100 ml der 10x Dropout-Lösung zugegeben.

YPD-Medium (Vollmedium)

20 g/ l	Difco Peptone
10 g/ l	Yeast extract
40 mg/ l	L-Adenin Hemisulfat
0,8 %	Agar (für Festmedien)
pH 5,8	

Die Komponenten werden in 960 ml Wasser gelöst und nach dem Autoklavieren mit 40 ml sterilfiltrierter 50 %iger Glucose (=Dextrose) versetzt.

Z-Puffer

16,1g/ l	Na_2HPO_4 x $7H_2O$
5,5g/ l	NaH_2PO_4 x $7H_2O$
0,75g/ l	KCl
0,246g/ l	$MgSO_4$ x $7H_2O$
pH 7,0	

Die Lösung wird nach dem Autoklavieren bei 4°C gelagert.

Z-Puffer (mit β-Mercaptoethanol)

100 ml	Z-Puffer
0,27 ml	β-Mercaptoethanol

2.1.4 Vektoren für die Klonierung

Die in Tabelle 1 und Tabelle 2 aufgelisteten Plasmide wurden im Verlauf der Arbeit zur Klonierung und Expression verwendet.

Tabelle 1: Klonierungs- und Expressionsvektoren

Vektor	Firma/ Referenz	Selektionsmarker
pMon30049-GFP	Monsanto; Pang *et al*.(1996)	Kan^R
pBluescript II SK+	Stratagene	Amp^R
pAD-Gal4	Stratagene	Amp^R; LEU2
pBD-Gal4	Stratagene	Amp^R; TRP1
pSV40	Stratagene	Amp^R; LEU2
p53	Stratagene	Amp^R; TRP1
pLamin C	Stratagene	Amp^R; TRP1
pGal4	Stratagene	Amp^R; LEU2

Tabelle 2: Verwendete cDNAs und Fragmente

Plasmid	Bezugsquelle/ Referenz	Fragment-größe in kbp	Selektionsmarker
pC1cLC 28.1 (P1)	Paz-Ares *et al*., 1987	ca. 2,1	Amp^R
pC1cC-I 53 (P10)	Paz-Ares *et al*., 1990	ca. 1,1	Amp^R
pC2LCc46 (P37)	Wienand *et al*., 1986	ca. 1,5	Amp^R
pRLC 2.5kb (P39)	Ludwig *et al.*, 1989	ca. 2,5	Amp^R
InD cDNA 2.1	Rojek, R., 1996	ca. 2,5	Amp^R
pBC-BNL 139 RI	Scheffler, B.*	ca. 2,3	Amp^R
pBC-277A #7	Scheffler, B.*	ca. 2,5	Amp^R

* Universität Hamburg, AMP1

2.1.5 Mikroorganismen

Die Bakterien- und Hefestämme wurden von der Firma Stratagene (Heidelberg) bezogen.

Tabelle 3: Verwendete Mikoorganismen

Stamm	Organismus	Genotyp
XL1Blue	Bakterienstamm	*recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hasdR17 supE44 relA1 lac* [F‘ *proAB lacl*^{q} *ZΔM15* Tn*10* (Tet^{r})]
YRG-2	Hefestamm	Matα *ura3-52 his3-200 lys2-801 ade2-101 trp1-901 leu2-3 112 gal4-542 gal80-538* LYS2::UAS$_{GAL1}$-TATA$_{GAL1}$-HIS3 URA3::UASGAL4 $_{17mers(3x)}$-TATA$_{CYC1}$-*lacZ*

2.1.6 Pflanzenmaterial

Die Verwendeten Maispflanzen wurden im Gewächshaus unter kontrollierten Bedingungen bei 16 Std. Licht (24.000-25.000 Lux), 8 Std. Dunkelheit, 24°C und 55-95% Luftfeuchte angezogen. Es wurden Pflanzen der Linien H99 (D‘Halluin, 1992), A188 (Green and Philips, 1975), Q2 (Walbot, V., Stanford University, CA) und der Wildtyplinie Line C (color converted *W 22*) verwendet.

Für die transiente Transformation von Zwiebeln wurde die Sorte der Firma Füllhorn verwendet. Sie wurden nach dem Kauf maximal 3 Wochen verwendet. Während diesem Zeitraum wurden sie im Dunkeln bei RT gelagert.

2.2 Methoden

2.2.1 Bakterien

2.2.1.1 Anzucht von Bakterienkulturen

nach Sambrook at al. (1989)

Mit einem sterilen Zahnstocher werden Zellen einer Einzelkolonie entnommen und auf einer LB-Festmediumplatte und/ oder in 3 - 10 ml LB-Flüssigmedium überführt. Zur Selektion enthält das Medium das entsprechende Antibiotikum (Tetracyclin, Kanamycin oder Ampicillin). Die Inkubation erfolgt über Nacht bei 37°C im Wärmeschrank (für Platten) und bei 180 UpM im Inkubationsschüttler (für Flüssigmedium).

2.2.1.2 Herstellung kompetenter Zellen mittels TFB-Puffern

Mit 2 ml einer 5 ml Vorkultur (2.2.1.1) werden 100 ml Medium angeimpft und bis zum Erreichen einer OD_{600} von 0.3 - 0.5 wachsen gelassen. Nach dem Zentrifugieren in 50 ml Falcongefäßen für 10 min. bei 4°C mit 3000 UpM wird das 100 ml Pellet in 10 ml TFBI-Puffer I vorsichtig resuspendiert und 10 min. auf Eis inkubiert. Alle nachfolgenden Schritte erfolgen auf Eis und mit vorgekühlten Lösungen.

Nach einer Zentrifugation für 10 min. bei 4°C wird das Pellet in 4 ml TFB-Puffer II vorsichtig resuspendiert und in Aliquots zu 100 µl in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei - 70°C gelagert.

2.2.1.3 Transformation kompetenter Zellen mittels Hitzeschock

Ein Aliquot der auf Eis aufgetauten kompetenten Zellen (2.2.1.2) wird mit 0,1 - 1 µg DNA oder einem Ligationsansatz versetzt und für 30 min. auf Eis inkubiert. Nach 2 min. Hitzeschock bei 42°C wird 1 ml Medium zugegeben. Bei einer Antibiotikaresistenz ist eine Vorinkubation für 1 Std. bei 37°C und 180 UpM im Inkubationsschüttler zu empfehlen. Die Zellsuspension wird anschließend auf Platten ausgestrichen (2.2.1.4).

2.2.1.4 Ausplattieren von Zellsuspensionen

Von der Zellsuspension können 1/ 10 Vol. direkt mit dem Drygalsky-Spatel ausplattiert werden. Die restliche Zellsuspension besitzt ein zu großes Volumen und wird daher aufkonzentriert. Nach 5 min. Zentrifugation bei 15000 UpM wird der Überstand bis auf 100 - 150 µl entfernt. Das Pellet wird im restlichen Medium resuspendiert, vollständig auf Medium ausplattiert und wie unter 2.2.1.1 beschrieben inkubiert.

Für die Indikation der *lacZ*-Komplementation, werden vor dem Ausstreichen der Zellsuspension je 40 µl IPTG und X-Gal auf dem Selektionsmedium verteilt.

2.2.2 DNA

2.2.2.1 Plasmid-DNA-Minipräparation (Boiling Methode)

nach Holmes und Quigley (1981)

Aus einer (2.2.1.1) Bakterienvorkultur werden 1,5 ml in ein Eppendorfgefäß überführt und bei Raumtemperatur 5 min. mit 13000 UpM zentrifugiert. Der Überstand wird sorgfältig entfernt und das Pellet in 200 µl TELT-Puffer und 20 µl frisch angesetzter Lysozymlösung resuspendiert. Für die Inaktivierung von DNAsen wird der Ansatz sofort für 3 min. auf 95°C im Heizblock erhitzt. Anschließend wird der Ansatz für 5 min. im Eiswasserbad abgekühlt. Für die weitere Bearbeitung wird das Eppendorfgefäß ständig auf Eis gehalten.

Die lysierten Zellen werden 15 min. bei 4°C mit 13000 UpM zentrifugiert und die Zelltrümmer mit einem Zahnstocher entfernt. Die Präzipitation der DNA erfolgt bei RT mit dem gleichen Volumen Isopropanol, gefolgt von 20 min. Zentrifugation bei 4°C. Die gefällte DNA wird mit 70% igem Ethanol gewaschen und anschließend in 100 µl Wasser oder TE aufgenommen.

2.2.2.2 Plasmid-DNA-Maxipräparation

Die DNA Präparation wird nach dem Prinzip der alkalischen Lyse nach dem Protokoll von Birnboim and Doly (1979) durchgeführt. Abweichend vom Protokoll wird nach der Zentrifugation im GS3 Rotor das Pellet in 3 ml TE gelöst. Die Fällung der RNA erfolgt mit 3 ml 5 M LiCl für 15 min. auf Eis. Nach 15 min. Zentrifugation in einem SS-34 Rotor bei 13000 UpM erfolgt eine DNA Fällung mit Isopropanol. Dazu wird der wässrigen Lösung 1/ 10 Vol. 3 M Na-Acetat pH 5,2 und je nach Volumengröße 2,5 Vol. 96 %igen Ethanol oder 1 Vol. Isopropanol zugefügt. Die DNA wird 30 min. bei -20°C gefällt und anschließend 15 bis 30 min. bei 15000 UpM und 4°C pelletiert. Nach der Entfernung des Überstandes erfolgt das Waschen des Pellets mit 70 %igem Ethanol. Das 5-10 min. getrocknete Pellet wird in 500 µl TE gelöst und 30 min. mit 20 µg RNAse bei 37°C inkubiert.

Um Proteinverunreinigungen zu entfernen wird der zu Ansatz phenolisiert. Hierzu wird er auf ein Volumen von 0.5 - 1 ml gebracht, mit dem gleichen Volumen Phenol - Chloroform (1:1) versetzt und bis zur Bildung einer Emulsion vermischt. Nach einer Zentrifugation von 3 - 5 min. bei 15000 UpM und RT wird der wässrige Überstand ohne Interphase abgenommen und der Vorgang wiederholt. Anschließend wird das Phenol durch Extraktion mit Chloroform

entfernt und aus dem wässrigen Überstand die DNA erneut mit Isopropanol gefällt (siehe oben).

2.2.2.3 Restriktion von DNA

Die verwendeten Restriktionsenzyme werden laut Herstellerangaben mit den entsprechenden Puffern in einem Volumen von 20-50 µl eingesetzt. Die Konzentration des verwendeten Enzymes beträgt maximal 0,1 Vol. des Ansatzes, damit die Aktivität nicht durch hohe Konzentrationen an Glycerol inhibiert wird. 0,5 –1 µg Plasmid-DNA wird 1 - 2 Std. bei den geforderten Temperaturen inkubiert. Eine Restriktion mit zwei Enzymen wird durch einen Querstrich gekennzeichnet z.B. *Eco*RI/*Mlu*I.
Nach der Restriktion erfolgt die Auftrennung im elektrischen Feld (2.2.2.4)

2.2.2.4 Auftrennung von DNA im elektrischen Feld

Für die Herstellung eines Agarosegels wird 1 x TAE Puffer mit Agarose aufgekocht. Nach dem Aufkochen wird die Lösung mit 5 µg/ ml Ethidiumbromid versetzt und in ein vorbereitetes Gelbett gegossen. Nachdem das Gel erhärtet ist wird es in eine mit 1 x TAE Puffer gefüllte Gelkammer gelegt. Die DNA-Probenlösung wird mit 1/ 10 Probenpuffer versetzt und in die Geltaschen pipettiert.
Für die Größenauftrennung von DNA wird je nach Gelgröße für 1 - 2 Std. eine Spannung von 80 - 120 Volt angelegt.

2.2.2.5 Bestimmung der DNA Menge und Fragmentgröße

Ein Aliquot einer DNA-Lösung wird mittels eines Agarosegels im elektrischen Feld aufgetrennt (2.2.2.4). Anhand des mitlaufenden Standards lassen sich die Mengen und Fragmentgrößen, durch Vergleich der Intensität der Banden mit Hilfe der computergestützten Kamera und dem Computerprogramm E.A.S.Y. plus Rev 3.24, abschätzen.

2.2.3 Klonierungen

2.2.3.1 Auffüllen von 3´ zurückgesetzten Enden

Nicht-überhängende, "glatte" Enden können durch die Restriktion mit entsprechenden Enzymen oder nachträglich mit einer Auffüll-Reaktion, durch eine DNA-Polymerase, erzeugt werden. Mit dieser Methode wird erreicht, daß DNA-Moleküle mit ursprünglich nicht zueinander passenden Enden verknüpft werden können.

In einem Ansatz von 20 – 30 µl erfolgt die Reaktion, mit 1/ 10 Klenow Puffer, 0,05 mM dNTPs und 1–2 Einheiten Klenow-Fragment für 30 min. bei RT.
Nach dem Auffüllen erfolgt die Auftrennung im elektrischen Feld (2.2.2.4) und die Isolierung aus dem Agarosegel (2.2.3.3)

2.2.3.2 Dephosphorylierung von DNA

Durch die Entfernung von Phosphat-Resten an den 5´ -Enden von geschnittener DNA (2.2.2.3) wird verhindert, daß die DNA-Ligase eine Selbst-Ligation oder Concatemerisierung des linearisierten Vektors oder Fragmentes katalysiert. Mit dieser Behandlung wird der Einbau von Fremd-DNA in einen linearisierten Klonierungsvektor begünstigt und damit die Klonierungseffiziens erhöht.
Für die Behandlung werden 1-2 Einheiten der alkalischen Phosphatase CIP direkt nach einer Restriktion (2.2.2.3) in den Ansatz gegeben. Die Inkubation erfolgt für 30 min. bei 37°C mit anschließender gelektrophoretischen Auftrennung und Fragmentisolierung.
Die Dephosphorylierung bereits isolierter DNA wird in einem Volumen von 20-50 µl mit 1/ 10 Vol. CIP-Puffer, 1-2 Einheiten CIP für 30 min. bei 37°C durchgeführt. Die Reaktion wird anschließend mittels GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg) aufgereinigt.

2.2.3.3 Isolierung von Fragmenten aus Agarosegelen

Die zu isolierende DNA Bande wird aus dem Agarosegel ausgeschnitten und laut Herstellerangaben mit dem GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg) aufgereinigt.

2.2.3.4 PCR Amplifikation mittels Taq-DNA Polymerase

Mit der thermostabilen Taq DNA-Polymerase können DNA-Bereiche selektiv aus einem Gemisch von DNA-Molekülen *in vitro* angereichert werden. Unter geeigneten Bedingungen wird die DNA einzelsträngig gemacht und mit einem Überschuß an strangspezifisch bindenden Oligonukleotiden aus dem Randbereich der zu amplifizierenden Sequenz versetzt. Diese Oligonukleotide binden an die Einzelstränge und dienen der Polymerase als Primer (#1 und #2) für die Neusynthese zum Doppelstrang. Die neu synthetisierten Doppelstränge werden erneut in Einzelstränge zerlegt und dienen wieder als Matrize für die Polymerase. Durch ständige Wiederholung von DNA-Denaturierung, Anhybridisierung der Primer und Auffüllreaktion kommt es nach jeder Polymerasereaktion zu einer Verdopplung der DNA und damit in einer Kettenreaktion zu einer exponentiellen Anreicherung der Sequenz. Nach

gelelektrophoretischer Auftrennung des Reaktionsgemisches ist der amplifizierte Bereich als Bande deutlich vor dem Hintergrund der nichtamplifizierten DNA zu erkennen.

Standardansatz für eine PCR-Reaktion:
10-40 ng Plasmid DNA (2.2.4.1)
10 pmol Primer #1
10 pmol Primer #2
mM dNTP-Mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
1/ 10 Vol. PCR-Puffer
5-10 % DMSO
2 Einheiten Taq DNA Polymerase
1,5 mM MgCl2

Der Reaktionsansatz wird in einem Volumen von 50 µl angesetzt und mit einem Tropfen Mineralöl überschichtet. Im Trio-Thermozykler der Firma Biometra (Göttingen) wird folgendes Programm verwendet:

96°C, 4 min	Denaturierung	
96°C, 45 sec.	Denaturierung	25-30 Zyklen
50-65°C, 45 sec.	Anhybridisierung der Primer	
72°C, 2 min	Auffüllreaktion	
72°C, 10 min.	Abschluß	
4°C, endlos		

Nach der Amplifikation erfolgt die gelelektrophoretische Trennung (2.2.2.4) und Isolierung (2.2.3.3) der Bande.

2.2.3.5 PCR Amplifikation mittels Pfx- oder Pfu- DNA Polymerasen

In der Regel wird für eine PCR Reaktion die *Taq*-DNA Polymerase verwendet. Ihr fehlt jedoch eine 3‘ Exonukleaseaktivität („proofreading“), wodurch falsch eingebaute Nukleotide nicht ausgetauscht werden. Ihre Fehlerquote liegt damit höher als die der *Pfx*- oder *Pfu*- DNA

Polymerasen mit 3‘ Exonukleaseaktivität. Die *Pfx*- oder *Pfu*- DNA Polymerasen werden verwendet, wenn Fragmente mit niedriger Fehlerquote hergestellt werden sollen.

Standardansatz für eine PCR-Reaktion mit der *Pfx* DNA Polymerase:

10-40 ng Plasmid DNA (2.2.4.1)

20 mM Primer #1

20 mM Primer #2

20 mM dNTP-Mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)

1/ 10 Vol. PCR-Puffer

1/ 10 Vol. Enhancer Solution

2,5 Einheiten *Pfx* DNA Polymerase

37 mM $MgSO_4$

Standardansatz für eine PCR-Reaktion mit der *Pfu* DNA Polymerase:

10-40 ng Plasmid DNA (2.2.4.1)

20 mM Primer #1

20 mM Primer #2

20 mM dNTP-Mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)

1/ 10 Vol. PCR-Puffer

2,5-5 Einheiten *Pfu* DNA Polymerase

Der Reaktionsansatz wird in einem Volumen von 100 µl angesetzt und mit einem Tropfen Mineralöl überschichtet. Im Trio-Thermozykler der Firma Biometra (Göttingen) wird das unter (2.2.3.4) aufgeführte Programm verwendet.

Das PCR-Produktes wird dem GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit nach Angaben des Herstellers aufgereinigt und anschließend in den Vektor ligiert (2.2.3.6).

2.2.3.6 Ligation eines DNA-Fragmentes in einen Vektor

Für die Ligation von 100 ng dephosphorylierter Vektor-DNA (2.2.3.2) mit der Fragment DNA wird die zu verwendende Menge an Fragment-DNA wie folgt berechnet:

$$\frac{100 \text{ ng x dreifache Länge des Fragmentes}}{\text{Länge des Vektors}} = \text{X ng Fragment}$$

Die Ligation erfolgt in einem 20 - 60 µl Ansatz mit 1/ 10 Vol. Ligationspuffer, 5 Einheiten T4-DNA-Ligase und Inkubation bei RT für 4 Std. oder bei 16°C über Nacht. Anschließend wird der Reaktionsansatz in kompetente Bakterienzellen transformiert (2.2.1.3).

2.2.4 Sequenzierungen

2.2.4.1 Plasmid-DNA-Präparation für die Sequenzierung

Die Präparation von Plasmid-DNA erfolgt aus einer 3-5 ml Flüssigkultur 2.2.1.1 nach Angaben des Herstellers mit dem Concert™ Rapid Plasmid Miniprep Kit der Firma Life Technologies/ Gibco BRL (Karlsruhe). Die DNA wird in 65 µl Wasser eluiert.

2.2.4.2 Sequenzreaktion

Die Sequenzierungen erfolgen nicht-radioaktiv nach der Methode von Sanger *et al*. (1977).
Standardansatz einer Sequenzreaktion:
4 µl Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit mit Amply-Taq® DNA Polymerase
500 - 800 ng doppelsträngige DNA (2.2.4.1)
1,5 µl Primer (10 pmol/ µl)
5 - 10 % DMSO

Der Reaktionsansatz wird in einem Volumen von 20 µl angesetzt und mit einem Tropfen Mineralöl überschichtet. Die Sequenzreaktionen werden im Trio-Thermozykler der Firma Biometra (Göttingen) bei folgendem Programm durchgeführt.

3 min, 95° C	Denaturierung
45 sec. , 98° C ⎫	1 Zyklus
15 sec. , 50° C ⎬	
4 min, 60° C ⎭	
30 sec. , 98° C ⎫	
15 sec. , 50° C ⎬	24 Zyklen
4 min, 60° C ⎭	

Anschließend wird dem Reaktionsansatz 35 µl 96 %igem Ethanol zugegeben und die DNA für 15 min. auf Eiswasser gefällt. Nach 25 min. Zentrifugation bei 15000 UpM und RT wird der Überstand entfernt und das Pellet bei RT getrocknet. Bis zum Gellauf werden die Proben bei –20°C gelagert.

Die Sequenzierungsprodukte werden nach Herstellerangaben auf 4,5 %igen Acrylamidgelen auf dem DNA-Sequenzierer 311 der Firma Perkin Elmer/ Applied Biosystems bei 2500 Volt in 1 x TBE für 4 Std. analysiert.

Die Analysen und Vergleiche von DNA- und Aminosäuresequenzen erfolgte durch die Programme Seqman und MegAlign (DNASTAR 3.5 Inc., USA), MacVector™ 4.1.4 (Scientific Imaging Systems, USA), GeneDoc 2.6.001 (Nicholas *et al*., 1997) und Blast 2.x (Altschul *et al*., 1997).

2.2.5 Hefen

2.2.5.1 Anzucht von Hefekulturen

Mit einer Hefekolonie werden 5-10 ml Selektionsmedium in einem 50 ml Falconfäß angeimpft. Die Inkubation erfolgt 2-3 Tage bei 30°C bei 180 UpM im Inkubationsschüttler. Aus dieser Vorkultur werden Zellen mittels einer sterilen Impföse auf Festmedium übertragen (z.B. Histidinmangelmedium).

2.2.5.2 Herstellung kompetenter Hefezellen

verändert nach Ito *et al*., 1983

Transformanten des Hefestammes YRG-2, wachsen in SD-Medium (Selektionsmedium) langsamer, als nicht transformierte YRG-2 Zellen im YPD-Medium (Vollmedium), daher gibe es zwei verschiedene Vorschriften für die Herstellung der Kulturen.

<u>YRG-2 Stamm</u>

Mit einer YRG-2 Hefekolonie werden 5 ml YPD-Medium angeimpft und über Nacht bei 30°C wachsen gelassen. Am nächsten Tag werden 100 ml YPD-Medium mit 1 ml der Vorkultur angeimpft und bei 30°C bis zu einer OD600 = 0,6 wachsen gelassen.

<u>YRG-2 Transformanten</u>

Mit einer Kolonie werden 5 ml SD-Medium angeimpft und 2 Tage bei 30°C wachsen gelassen. Von dieser Vorkultur werden 100 ml SD-Medium mit 1 ml der Vorkultur angeimpft und über Nacht bei 30°C bis zu einer OD600 = 0,6 wachsen gelassen.

Die Zellen werden 5 min bei 3000 UpM in der Hareaus Zentrifuge pelletiert und 20 ml Lösung A gewaschen. Anschließend werden sie in 2 ml Lösung A aufgenommen und in 2 ml Eppis zu 200 µl aliquotiert. Die Zellen werden nachfolgend bei -70°C gelagert.

2.2.5.3 Transformation von kompetenten Hefezellen

verändert nach Ito *et al*., 1983

Für die Transformation werden 1-2 µg Plasmid-DNA (2.2.4.1) mit 50 µg (10 µg/ µl) denaturierter Lachssperma-DNA gemischt und zu einem gefrorenen 200 µl Aliquot kompetenter Hefezellen (2.2.5.2) gegeben. Die Zellen werden 5 min. unter starkem Schütteln bei 37°C im Thermoschüttler aufgetaut. Nach Zugabe von 1 ml Lösung B wird der Ansatz für 60 min. bei 30°C in den Schüttelinkubator (120 UpM) gegeben. Anschließend werden die Zellen 1 min. bei 3000UpM pelletiert und mit 800 µl Lösung C gewaschen. Die erneut pelletierten Zellen werden in 100 µl Lösung C resuspendiert und auf Selektionsmedium ausplattiert. Die Platten werden anschließend bei 30°C für 3-7 Tage inkubiert, bis Kolonien sichtbar werden.

2.2.5.4 Herstellung einer Two Hybrid cDNA Bank Dauerkultur

nach ”DupLEX-A Yeast Two Hybrid System Manual Version 2.7“ OriGene Technologies

Von der cDNA werden insgesamt 40 µg in 30 Aliquots kompetente Hefezellen (2.2.5.2) transformiert und auf 30 Platten ausplattiert. Die Platten werden anschließend bei 30°C inkubiert bis Kolonien sichtbar sind. Zum Abschwemmen der Platten wird auf jede der 30 Festmediumplatten 5 ml steriles Wasser gegeben, die Kolonien mit einem sterilen Mikroskop-Objektträger abgekratzt und in 50 ml Falcongefäße überführt. Die Zellen werden 5 min bei 3000 UpM in einer Hareus Zentrifuge pelletiert und mit der gleichen Menge Wasser gewaschen. Die Pellets werden in einem Gesamtvolumen von 50 ml Wasser aufgenommen und mit 75 %igem Glycerol bis zu einer Endkonzentration von 25 % versetzt. Die Suspension wird in 1 ml Aliquots bei –70°C gelagert.

Anschließend erfolgt die Titerbestimmung eines Aliquots und das Ausplattieren einer ausreichenden Anzahl an Transformanten auf Selektionsmedium (z.B. Histidin).

2.2.5.5 Quantitativer Nachweis der β-Galactosidase Aktivität

verändert nach Clontech Yeast Protocols Handbook

Die β-Galactosidase spaltet β-D-Galactoside (z.B. Lactose) in Galactose und die entsprechende Alkohol-Verbindung. Unphysiologische Substrate sind z.B. X-Gal (5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-β-D-Galactosid) und ONPG (o-Nitrophenyl-β-D-galactosid). Sie ergeben

nach der Hydrolyse farbige Reaktionsprodukte, die photometrisch nachzuweisen sind. Durch die Spaltung von ONPG erfolgt, je nach Stärke der β-Galactosidaseaktivität, eine mehr oder weniger starke Gelbfärbung der Lösung.

Für diesen Assay werden 5-10 ml Selektionsmedium in einem 50 ml Falconfäß mit einer Hefekolonie angeimpft und bei 30°C bis zu einer OD600 von 1 ml = 0.5-0.8 wachsen gelassen. Die genaue OD600 wird ermittelt. Die Zellen werden bei RT 5min bei 3000 UpM in einer Hareaus Zentrifuge pelletiert, in 500 µl Z-Puffer (incl. β-Mercaptoethanol) resuspendiert und anschließend zu 500 µl Glassbeads (acid washed Glassbeads 425-600 µm, Sigma) gegeben. Die Hefezellen werden mechanisch aufgeschlossen durch 2 x 3 min. vortexen auf maximaler Stufe. Dazwischen werden die Proben für 3 min. auf Eis abgekühlt. Nach dem zweiten Vortexen wird das Volumen erhöht durch Zugabe von 500 µl Z-Puffer (incl. β-Mercaptoethanol). Ab jetzt wird der Proteinextrakt stets auf Eis gelagert.Die Proben werden bei 4°C für 10min bei 15000 UpM zentrifugiert. 900 µl des Gesamtprotein-Extrakts werden in ein neues Eppi überführt.

Um den Assay gegebenenfalls zu wiederholen werden von den 900 µl Gesamtproteinextraktes (2.2.5.5) nur 400 µl eingesetzt. Zu 400 µl Gesamtproteinextrakt werden 400 µl Z-Puffer (incl. β-Mercaptoethanol) gegeben, mit 160 µl ONPG-Lösung versetzt und bei 30°C inkubiert. Ist eine gelbe Färbung sichtbar (positiv Kontrolle nach ca. 3-5min), wird die Substratumsetzung durch Zugabe von 400 µl 1 M Na_2CO_3 gestoppt. Die Inkubationszeit wird in min. notiert. Da Zelltrümmer die anschließende photometrische Messung stören, werden die Proben 10 min bei RT und 14.000 UpM zentrifugiert und 1 ml des Überstandes in Küvetten überführt. Die photometrische Messung erfolgt bei 420 nm, die Werte sollten zwischen 0.02-1.0 sein um im linearen Bereich der Messung zu liegen.

Die Aktivität des Enzyms wird in relativen Einheiten gemessen, sie ergibt sich aus der Formel:

$$\text{relative Einheiten} = \frac{[\text{OD 420 nm}] \times 1000}{[\text{OD 600 nm}] \times \text{Volumen} \times \text{Zeit der Inkubation in Minuten}}$$

2.2.5.6 Isolierung von Gesamtproteinen aus Hefe für SDS-PAGE

Horvath and Riezman (1994)

Abhängig vom Hefestamm werden 5 ml Voll- oder Selektionsmedium angeimpft und bei 30°C bis zu einer OD600 = 0.7 wachsen gelassen. Von dieser Kultur werden 1.5 ml pelletiert und mit 1 ml Wasser gewaschen. Die Zellen werden erneut pelletiert, in 100 µl

Hefe-Probenpuffer aufgenommen und für 5 min. bei 96°C aufgekocht. Nach einer Zentrifugation bei 4°C für 5 min und 14.000 UpM wird der Überstand für die SDS-PAGE (2.2.6.1) verwendet.

2.2.6 Proteine

2.2.6.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

In Gegenwart des Detergenz SDS werden die Proteine denaturiert und wandern im elektrischen Feld entsprechend ihrer Molekülmasse. Bei der Methode nach Laemmli (1970) werden die Proben in einem großporigen Sammelgel konzentriert und anschließend im engporigen Trenngel aufgetrennt.

Das 10 %ige Trenngel und 5 %ige Sammelgel werden nach Sambrook *et al*. (1989) hergestellt und vertikal in die Gelelektrophorese-Apparatur gegossen. Pro Spur werden 15 µl Protein im SDS-Probenpuffer geladen. Zur Abschätzung der Molekularmasse wird ein Molekulargewichtsstandard mitgeladen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgt in 1 x Laemmli-Puffer für 30 min. bei 80 Volt und anschließend bei 120 Volt, bis die Lauffront der Proben am unteren Rand aus dem Gel tritt.

2.2.6.2 Färbung von SDS-Polyacrylamidgelen

Für die Färbung wird das Gel 30 - 60 min. unter leichtem Schwenken in Coomassie Brillant Blue G-250 Lösung inkubiert. Anschließend wird für mehrere Stunden mit der Entfärbelösung entfärbt, bis die Proteinbanden deutlich zu sehen sind.

Um das Gel leicht zu entwässern wird der Entfärbelösung 1 ml 75 %iges Glycerol zugegeben und für weitere 10 min. inkubiert. Die vollständige Trocknung des Gels erfolgt in einem Rahmen zwischen zwei Lagen aufgespannter "Einmach-Folie".

2.2.6.3 Western Blot

Für den Western Blot werden die Acrylamidgele nach der Elektrophorese 30 min. unter leichtem Schwenken in Bjierum-Schaefer-Nilson-Puffer inkubiert und anschließend mittels des Trans-Blot auf Nitrocellulosemembranen (Hybond C) übertragen. Für den Blot werden 2 x 3 Lagen 3 MM Whatman-Papier und die Nitrocellulosemembran in Bjierum-Schaefer-Nilson-Puffer angefeuchtet.

Die Anordnung auf der Anode erfolgt in der Reihenfolge von Whatmanpapier, Nitrocellulosemembran, Acrylamidgel und Whatman-Papier. Abschließend wird die Kathode angeschlossen und bei 15 Volt 15 bis 60 min. geblottet.

Durch eine Färbung mit Ponceau S für 10 min läßt sich der Transfer der Proteine auf die Nitrocellulosemembran kontrollieren. Für die Immuno-Detektion werden die Membranen mit aqua dest. entfärbt.

2.2.6.4 Immunodetektion

Mit dieser Technik ist es möglich ein Protein auf einem Western Blot durch die Reaktion mit seinem spezifischen Antikörpers nachzuweisen.

Um unspezifische Bindung der Antikörper zu vermeiden, wird die Membran des Western Blots 1 Std. oder über Nacht in 1 x TBST bei 4°C gelagert. (Für eine Inkubation über mehrere Tage, kann 0,5 % sodium azide zugegeben werden). Vor Inkubation mit dem ersten Antikörper wird die Membran mit1 x TBST gewaschen. Alle Waschschritte werden in der Reihenfolge von 2 x kurz spülen, 1 x 15 min. und 2 x 5 min. bei RT in jeweils 100 ml durchgeführt. Die Inkubation mit dem 1: 10.000 verdünnten Antikörper I erfolgt 1 Std. bei Raumtemperatur. Nach dem Waschen wird mit dem 1: 3.000 verdünnten Antikörper II (gegen den Antikörper I gerichtet, mit gekoppelter Peroxydase) für 40 min. bei RT inkubiert. Bei den anschließenden Waschschritten wird 4 x 5 min., statt 2 x 5 min. gewaschen. Die gekoppelte Peroxidase katalysiert unter Anwesenheit von H_2O_2 die Spaltung des Substrates Luminol wodurch Chemilumineszens entsteht.

Für die Detektion werden je 1 ml der Detektionslösungen I und II unmittelbar vor Gebrauch vermischt und sofort verwendet. Die Membran wird mit der Proteinseite 1 min. in dem Gemisch inkubiert und anschließend luftdicht in Klarsichtfolie verpackt. Für die Exposition werden Filme zwischen 30 sec. und 10 min. aufgelegt.

2.2.7 Biolistische Transformation

Die hergestellten Plasmide müssen zur Expression in Pflanzenmaterial eingebracht werden. Dazu wurde die Methode der biolistischen (biologisch; balistisch) Transformation verwendet, die auch als particle bombardment bezeichnet wird. Es ist eine physische Methode um DNA in Zellen einzubringen. Hierbei wird Plasmid DNA an Goldpartikel gebunden, die unter hohem Heliumdruck beschleunigt werden (2.2.7.1 oder 2.2.7.2). Im Idealfall treffen sie auf das Gewebe, durchdringen das Protoplasma und gelangen so in die Zelle ohne sie zu zerstören. Anschließend kann die an den Partikeln befindliche DNA exprimiert werden. Im Gegensatz zu anderen Methoden (Elektroporation, Lipid vermittelten Transformation) müssen die zu transformierenden Gewebe nicht vorbehandelt werden.

Mittels biolistischer Transformation wurde bereits ein weites Spektrum an pflanzlichem und tierischem Gewebe transient und stabil transformiert. Des weiteren wurde diese Technik zur Transformation von Bakterien, Pilzen und und Zellorganellen eingesetzt.

Der erfolgreichen Transformation dieser verschiedenen Zelltypen geht eine Optimierung der physischen Parameter der Bombardierung voraus (Sanford *et al*., 1993). Die Parameter mit der größten Auswirkung auf die Transformationsrate sind die Partikelgröße und Partikeldichte, das Vakuum in der Kammer und die Distanz die von den Partikeln zurücklegt werden muss, bevor sie das Gewebe treffen.

Die isolierten Maisembryonen wurden, um die Transformationsrate zu erhöhen, vor der Transformation einer osmotischen Vorbehandlung unterzogen. Durch die *In*kubation auf einem osmotischem Medium findet in der Zelle eine Plasmolyse statt, wodurch das Protoplasma von der Zellwand gelöst wird. Es wird angenommen, das hierdurch die Zelle „elastischer“ wird und nicht platzt, wenn sie mit Goldpartikeln verletzt wird (Vain *et al*., 1993).

2.2.7.1 Goldsuspension für die Transformation von von Tabak- und Maisgewebe

nach Montgomery *et al*. (1993)

40 mg Goldpartikel (Goldpowder Hereus 0.3-3um) werden in 1 ml Ethanol abs. aufgenommen und für 1-2 sec. gevortext. Nach einer kurzen Zentrifugation für 10 sec. bei 10.000 Upm werden die Goldpartikel mit 1 ml Wasser, wie oben erwähnt, gewaschen. Anschließend wird das Goldpellet wieder in 1 ml Wasser aufgenommen, für 1-2 min gevortext und in 50 µl (ca. 0.4 mg Gold/ 10 µl) Aliquots bei -20°C gelagert.

Von der Goldsuspension werden 50 µl mit 2,5 µg Reporter Plasmid DNA (1µg/ µl) oder einer 1:1 Mischung aus Reporter und Referenzplasmid versetzt und 30 sec. gevortext. Nach Zugabe von 50 µl 2,5 M $CaCl_2$ und 10 µl 0.1 M Spermidin wird die Suspension 10 min. gevortext. Anschließend wird die Goldsuspension für 10 sec. bei 10.000Upm pelletiert und die Goldpartikel mit 250 µl 96 %igem Ethanol gewaschen. Das Goldpellet wird in 120 µl 96 %igem Ethanol (ca 0,4 µg DNA/ 10 µl) resuspendiert (Goldpartikel).

Für die transiente Transformation von Tabak- und Maisgewebe werden die Goldpartikel durch kurzes vortexen resuspendiert und 10 µl/ Schuß homogen auf dem Macrocarrier verteilt. Die biolistische Transformation erfolgte mit der PDS 1000/ He (BioRad, München) unter folgenden Bedingungen:

Macrocarrier: Etage 2

Zielgewebe: Etage 4

Gasdruck: 1550 psi (Tabakblätter) oder 1350 psi (Maisembryonen)

Vakuum: 28 inch Hg

Nach dem Beschuss wurden die Proben mind. 18 Std. bei RT inkubiert.

2.2.7.2 Goldsuspension für die Transformation von epidermalen Zwiebelzellen

nach Unseld *et al.*, (2001)

60 mg Goldpartikel (Goldpowder Hereus 1,6 um) werden in 1 ml 70 %igem Ethanol aufgenommen und für 10 sec. gevortext. Nach einer kurzen Zentrifugation für 1 sec. bei 10.000Upm werden die Goldpartikel 3x mit 1 ml Wasser, wie oben erwähnt, gewaschen. Anschließend wird das Goldpellet wieder in 1 ml 50 %igem Glycerol aufgenommen (ca. 0.6 mg Gold/ 10 ul) und bei -20°C gelagert.

Von der Goldsuspension werden 10 ul/ Schuss mit 5ug Plasmid DNA (1ug/ ul) 4min im 2 ml Eppi gevortext. Nach Zugabe von 10 ul 2.5M $CaCl_2$ und 2 ul 0.1M Spermidin wird die Suspension 3 min. gevortext. Anschließend werden die pelletierten Goldpartikel 2x mit 500 ul 70 %igem Ethanol gewaschen. Das Goldpellet wird in 10 ul 96 %igem Ethanol (ca 5ug DNA/ 10ul) resuspendiert (Goldpartikel) und bis zum Verbrauch bei -20°C gelagert.

Für die transiente Transformation von epidermalen Zwiebelzellen werden die Goldpartikel durch kurzes vortexen resuspendiert und 10 ul/ Schuß homogen auf dem Macrocarrier verteilt.

Die biolistische Transformation erfolgte mit der PDS 1000/ He (BioRad, München) unter folgenden Bedingungen:

Macrocarrier: Etage 2

Zielgewebe: Etage 5

Gasdruck: 1100psi

Vakuum: 28inch Hg

Zwiebeln der Firma Füllhorn (4-6 cm Durchmesser) werden der Länge nach halbiert, die Wurzel- und Sproßansätze und die innersten Schalen verworfen. Nach der Transformation der konkaven Seite wird die Schale mit der Schnittfläche auf 0.5% Wasseragar gelegt und 18-48 Std. bei RT im Dunkeln inkubiert.

2.2.7.3 Isolierung von Gesamtproteinen aus Pflanzenmaterial

Die Proben stets auf Eis halten. Das Pflanzenmaterial wurde mittels Schwingmühle Reetsch MM300 pulverisiert und in 200 ul EGL Extraktionspuffer aufgenommen. Anschließend

wurde der Extrakt durch zweimaliges Zentrifugieren für 10 sec. bei 2°C und 15.000 UpM von Gewebeteilen getrennt und bei –70°C gelagert.

2.2.8 Fluoreszensmikroskopie

Die Maisembryonen wurden direkt auf der Mediumplatte untersucht. Alle anderen Präparate wurden auf einem Objekträger mit einem Tropfen Wasser eingebettet und mit einem Deckglas abgedeckt. Die Präparate wurden zunächst bei kleinster Vergrößerung betrachtet und geeignete Stellen anschließende bei höheren Vergrößerung.

Die Präparate wurden unter dem Floureszenzmikroskop (Zeiss Axioskop) bei 50-, 100-, 200- und 400-facher Vergrößerung untersucht. Zur Anregung wurde UV-Licht mit einer Quecksilberdampf-Kurzbogenlampe HBO 50 W (Osram) erzeugt. Die Visualisierung erfolgte mit dem Zeiss Filtersatz 09 (Anregung 450-490 nm, Emission 470nm). Die Bilder wurden mit Diafilmen (Ektacrom 400, Kodak) oder mit einer CCD Kamera (Sony) und dem Bildverarbeitungsprogramm Image-Pro Plus (Media Cybernetics) dokumentiert. Die Diaaufnahmen wurden mit dem Programm Umax Magic Scan D.A 3.1.3 digitalisiert. Die Bilder wurden mit Adobe Photoshop 3.0 (Adobe Systems, Inc.) oder Microsoft Photo Editor 3.0 (Microsoft Inc.) weiterverarbeitet.

3 Ergebnisse

3.1 Untersuchungen zur in vivo Interaktion der *Intensifier* Proteine

Das Zusammenwirken der regulierenden Gene *R*, *B*, *C1* und *Pl* beeinflußt unter anderem die Expression der Strukturgene *C2* und W*h*p, die für das Schlüsselenzym Chalkonsynthase der Anthocyanbiosynthese kodieren. Aufgrund der Interaktion eines myc-homologen Genproduktes (*R*, *B*) mit einem myb-homologen Genproduktes (*C1*, *Pl*) entstehen Dimere, welche die Expression gewebespezifisch beeinflussen. Durch die Interaktion von *R* und *C1* wird die Anthocyanbiosynthese in den Körnern reguliert (Abbildung 5). Dagegen regulieren die Genprodukte von *B* und *Pl* die Anthocyanbiosynthese in den restlichen Pflanzenteilen.

Das putative Protein des Mais Gens *Intensifier* (Burr *et al.* 1996) zeigt Homologien zu dem myc-homologen Genprodukt *R*. Liegt das *Intensifier* Allel *In* homozygot vor, so zeigen die Maiskörner eine leuchtend rote Farbe. In Maiskörnern mit homozygotem *Intensifier* Allel *in* werden verstärkt Anthocyane gebildet, wodurch sie eine tiefrote bis schwarze Färbung zeigen. Der Phänotyp, der durch das homozygote *Intensifier* Allel *InD* ausgeprägt ist zeigt gegenüber dem *In* Phänotyp eine blaßrote Färbung. Das *Intensifier* Genprodukt ist demzufolge in der Lage, die Anthocyanbiosynthese negativ zu beeinflussen.
Aufgrund der Homologie des *Intensifier* Genproduktes zu den myc-homologen Genprodukten (R, B), stellte sich die Frage, ob es mit dem myb-homologen Genprodukt *C1* interagieren kann und so für eine Reduktion funktioneller *R* + *C1* Komplexe sorgt und somit auch für eine Reduktion der Pigmentierung. Da bekannt ist, daß die myc-homologe Genprodukte sowohl Homo- als auch Heterodimere bilden können, kann eine mögliche Interaktion des *Intensifier* Genproduktes mit *R* anstatt *C1*, nicht ausgeschlossen werden. Möglicherweise erfolgt sogar eine Interaktion mit dem gesamten Komplex aus *R* und *C1* (Abbildung 6, Seite 10).

Um zu untersuchen, ob eine Interaktion des *Intensifier* Genproduktes mit *C1* oder *R* erfolgt, wurden Two Hybrid Experimente mit den Produkten von drei verschiedenen *Intensifier* Allelen durchgeführt.
Burr *et al*. (1996) konnten zeigen, daß die Transkripte des *In* Alles nur zu etwa 0,2 % korrekt gespleißt werden. Alternative Spleißstellen sind für die Introns 2, 5 und 7 beschrieben worden. Herrman (2000) postuliert, daß von dem *in* Allel nur Transkripte vorliegen, die zu einem verkürzten Protein führen. Aus diesen Gründen wurde das vollständige Protein (*In*) und ein verkürztes Protein (*InXS*) untersucht.

Das *InD* Allel liegt in zwei veränderten *Intensifier* Genkopien vor: *InD1* (Rojek, 1996) und *InD2* (Pusch, 2000). Von der *InD2* Kopie war bei Beginn dieser Arbeit noch kein entsprechender cDNA Klon verfügbar, so daß nur das Protein der *InD1* Kopie untersucht werden konnte.

Es wurde vermutet, daß die endogene transkriptionsaktivierende Domäne von *C1* eine hohe Hintergrundaktivität der Reportergene verursachen würde. Daher wurde beschlossen, zusätzlich zu *C1* eine Mutante zu verwenden, die keine transkriptionsaktivierende Domäne besitzt. Es wurde erwartet, daß mit dieser Mutante, *C1-I* (Paz-Ares *et al*., 1990), keine Hintergrundaktivität festzustellen ist. Der Sequenzvergleich von *C1* und *C1-I* befindet sich im Anhang (Abbildung 77, Seite 171).

Goff *et al*. (1992) konnten eine Interaktion zwischen dem *C1* Protein und dem *R*-homologen *B* Protein nur mit einem deletierten *B* Protein nachweisen. Sie verwendeten ein *B* Protein, aus welchem der Bereich mit der basischen Helix-Loop-Helix-Region entfernt wurde. Aus diesem Grund wurde, für die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen, ebenfalls ein Deletionsprotein von R verwendet (*Rdel*.).

3.2 Herstellung der Two Hybrid Expressionsplasmide

3.2.1 Herstellung der *R* Expressionsplasmide

(siehe Abbildung 8)

In der 5‘ Leader Sequenz der cDNA von *R* befindet sich in ein Stopp-Codon im Leserahmen. Bei der Subklonierung der vollständigen cDNA in die Expressionsvektoren pAD und pBD, wäre durch dieses Stopp-Codon kein Fusionsprotein entstanden. Um dieses Stopp-Codon zu entfernen, wurde aus dem *R* cDNA Plasmid pRLC 2.5kb ausschließlich der codierende Bereich mittels PCR und Pfx-DNA Polymerase amplifiziert (2.2.3.5). Hierfür wurden der 5‘ Primer Ol-14 und der 3‘ Primer Ol-22 verwendet, die eine zusätzliche *Eco*RI und *Sal*I Schnittstelle enthalten.

Das 2,2 kb lange PCR-Produkt wurde in die *Eco*RV geschnittene (2.2.2.3) Plasmid DNA (2.2.2.2) des Vektors pZErO-2 ligiert und vollständig sequenziert (2.2.4). Diese Klonierung in den Vektor pZErO-2 wurde einer direkten Klonierung in die Vektoren pAD und pBD vorgezogen. Wären bei dem amplifizierten Fragment Fehler in der Sequenz festgestellt worden, so hätte dieser Bereich des DNA Fragmentes entfernt und durch DNA des Plasmids pRLC 2.5kb ausgetauscht werden können. Dafür wären Schnittstellen benötigt worden, die nicht in den pAD und pBD Vektoren vorkommen dürfen, sondern ausschließlich in der *R* cDNA. Daher war eine direkte Subklonierung des PCR Fragmentes in die pAD und pBD

Vektoren nicht möglich. In der Sequenz des PCR Fragmentes wurden keine Fehler festgestellt und es konnte subkloniert werden.

Ursprünglich sollte das Fragment mit den Enzymen *Eco*RI und *Sal*I aus der DNA des pZErO-2 Klons ausgeschnitten werden und gerichtet in die *Eco*RI/*Sal*I Schnittstelle der pAD und pBD Vektoren einkloniert werden. Die 3‘ gelegene *Sal*I Schnittstelle des Fragmentes ließ sich jedoch, vermutlich aufgrund funktionsloser denaturierter *Sal*I Enzyme in der verwendeten Enzymcharge, nicht schneiden. Damit trotzdem weitergearbeitet werden konnte, wurde beschlossen das PCR Fragment nur als *Eco*RI Fragment aus der Plasmid DNA (2.2.2.1) des Vektor auszuschneiden (2.2.2.3) und zu isolieren (2.2.3.3). Die 3‘ gelegene *Eco*RI Schnittstelle stammt hierbei aus dem Vektor pZErO-2. Nach der Bestimmung der DNA Menge (2.2.2.5) erfolgte die Ligation (2.2.3.6) in die *Eco*RI (2.2.2.3) geschnittene Plasmid DNA (2.2.2.2) der Expressionsvektoren pAD und pBD.

Aufgrund der ungerichteten Klonierung in die *Eco*RI Schnittstelle der pAD und pBD Expressionsvektoren ergaben sich zwei mögliche Orientierungen des Fragmentes im Vektor. Um die Orientierung festzustellen wurde aus 24 unabhängigen Bakterientransformanten die Plasmid DNA isoliert (2.2.2.1) und mit *Bgl*II restringiert (2.2.2.3). Die Restriktionsfragmente wurden anschließen elektorphoretisch aufgetrennt (2.2.2.4) und anhand des verwendeten Standards bestimmt (2.2.2.5).

Positive Bakterientransformanten enthalten das subklonierte PCR Fragment, welches für das vollständige *R* Protein kodiert. Dieses *R* Protein besteht aus den Aminosäuren 1-610. Die Fusionsproteine mit der Aktivierungs- und Bindedomäne von Gal4 wurden als AD-*R* und BD-*R* bezeichnet und die korrespondierenden Expressionsplasmide als:

pAD-*R* Plasmid # 356

pBD-*R* Plasmid # 367

3.2.2 Herstellung der *R* Deletions Expressionsplasmide

siehe (Abbildung 8)

Für die Expression eines deletierten *R* Proteins, wurde der korrespondierende Bereich aus dem *R* cDNA Plasmid pRLC 2.5kb per PCR und Pfx-DNA Polymerase amplifiziert (2.2.3.5). Hierfür wurden der 5‘ Primer Ol-14 und der 3‘ Primer Ol-23 verwendet, die eine zusätzliche *Eco*RI und *Sal*I Schnittstelle enthalten.

Das 1,2 kb lange PCR-Produkt wurde, wie das des 2,2 kb langen PCR Fragmentes (3.2.1), in die *Eco*RV Schnittstelle des Vektors pZErO-2 einkloniert und vollständig sequenziert. In der Sequenz des 1,2 kb langen PCR Fragmentes wurden keine Fehler festgestellt und es konnte

subkloniert werden. Die Subklonierung erfolgte, aus den gleichen Gründen, wie bei dem 2,2 kb langen PCR Fragment (3.2.1), als *Eco*RI Fragment.

Aufgrund der ungerichteten Klonierung in die *Eco*RI Schnittstelle der pAD und pBD Expressionsvektoren ergaben sich zwei mögliche Orientierungen des Fragmentes im Vektor. Um die Orientierung festzustellen wurde aus 24 unabhängigen Bakterientransformanten die Plasmid DNA isoliert (2.2.2.1) und mit *Bgl*II restringiert (2.2.2.3). Die Restriktionsfragmente wurden anschließen elektorphoretisch aufgetrennt (2.2.2.4) und anhand des verwendeten Standards bestimmt (2.2.2.5).

Positive Bakterientransformanten enthalten das subklonierte 1,2 kb PCR Fragment, welches für das deletierte *R* Protein kodiert und keine basisches Helix-Loop-Helix Region enthält. Dieses *R* Protein besteht aus den Aminosäuren 1-388 von *R*.

Die Fusionsproteine mit der Aktivierungs- und Bindedomäne von Gal4 wurden als AD-*Rdel* und BD-*Rdel* bezeichnet und die korrespondierenden Expressionsplasmide als:

pAD-*Rdel* Plasmid # 378

pBD-*Rdel* Plasmid # 392

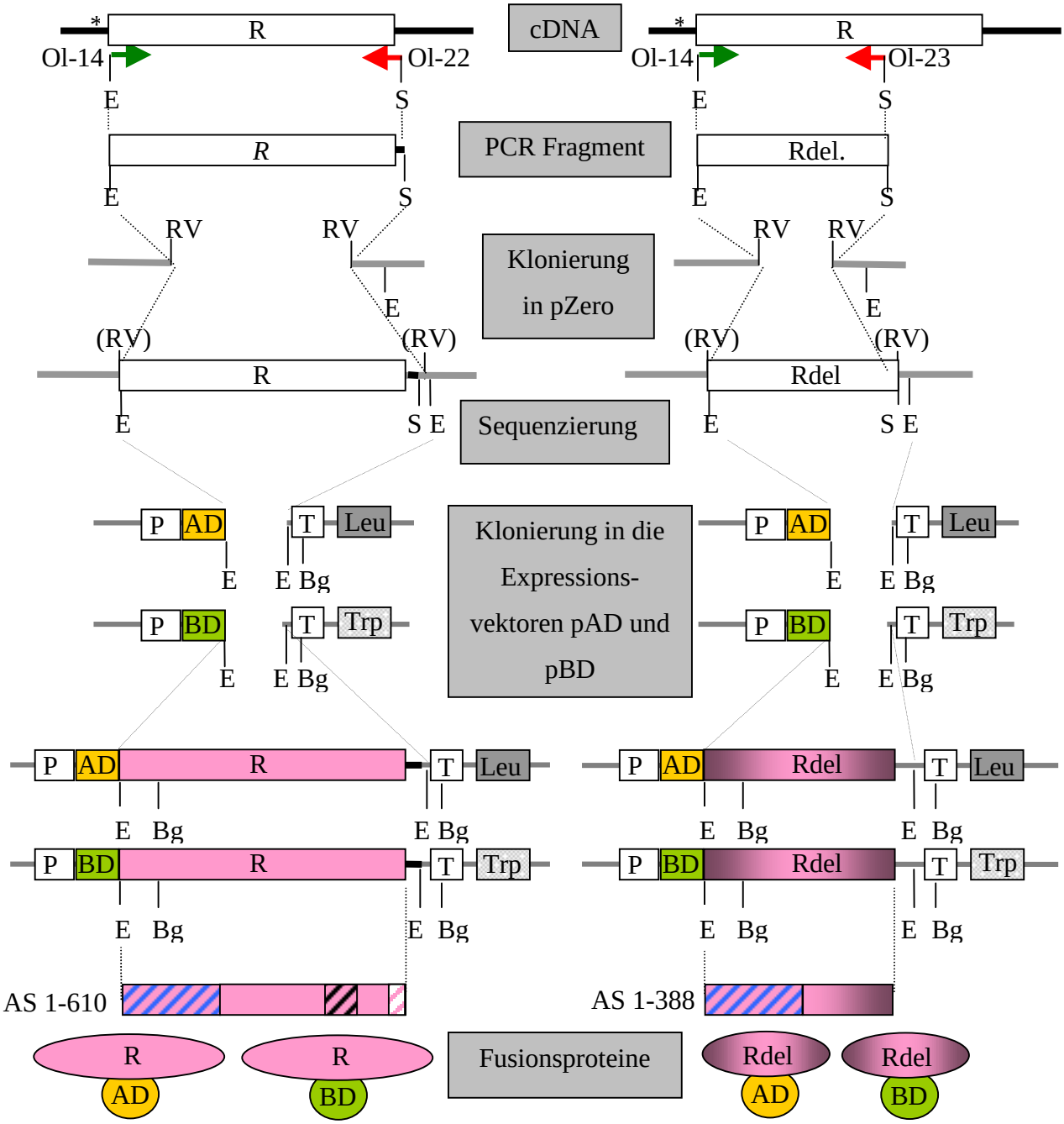

Abbildung 8: Schematische Darstellung der Herstellung der *R* Expressionsplasmide

Eine direkte Subklonierung der cDNA von *R* war nicht möglich, da sich im 5' UTR ein Stop Codon (*) im Leserahmen befindet. Der kodierende Bereich von *R* wurde aus dem cDNA Klon pRLC2.5kb per PCR amplifiziert und die amplifizierten Fragmente wurden in die *Eco*RV Schnittstelle von pZero kloniert. Die Primer Ol-14, Ol-22 und Ol-24 (grüne und rote Pfeile) enthielten zusätzliche *Eco*RI (E) und *Sal*I (S) Schnittstellen. Die *Sal*I Schnittstelle ließ sich nicht schneiden, daher wurden die Fragmente nach der Sequenzierung nur als *Eco*RI Fragmente isoliert. Sie wurden ungerichtet in die *Eco*RI Schnittstelle der Expressionsvektoren (pAD, pBD) kloniert. Die Orientierung der Fragmente in den Expressionsvektoren wurde durch eine Restriktion mit *Bgl*II (Bg) festgestellt. *R* (hellrosa) kodiert für die vollständige Aminosäuresequenz (AS 1-610). *Rdel* (dunkelrosa) ist ein Deletionsprodukt von *R* und kodiert für die Aminosäuren 1-388. Das Protein enhält keine basische-Helix-Loop Helix Region (rosa/ schwarz gestreift), aber den Bereich, der für die Interaktion mit *C1* benötigt wird (rosa/blau gestreift). Die Fusionsproteine wurden als AD-*R*, BD-*R*, AD-*Rdel* und BD-*Rdel* bezeichnet und enthalten die AD (Aktivierungsdomäne, gelb) oder BD (Bindedomäne, grün) von Gal4. Die BD und AD Expressionsvektoren enthalten den ADH1 Promotor (P) und den ADH1 Terminator (T), des weiteren die auxotrophen Markergene LEU2 (Leu, grau) und TRP1 (Trp, hellgrau).

3.2.3 Herstellung der *C1* Expressionsplasmide

(siehe Abbildung 9)

Die ca. 2 kb große *C1*-cDNA wurde mittels *Eco*RI Restriktion (2.2.2.3) aus der Plasmid DNA (2.2.2.2) p*C1*cLC28 ausgeschnitten und isoliert (2.2.3.3). Nach der Bestimmung der DNA Menge (2.2.2.5) erfolgte die Ligation (2.2.3.6) in die *Eco*RI (2.2.2.3) geschnittene Plasmid DNA (2.2.2.2) der Expressionsvektoren pAD und pBD.

Aufgrund der ungerichteten Klonierung ergaben sich zwei mögliche Orientierungen des Fragmentes im Vektor. Um die Orientierung festzustellen wurde aus 24 unabhängigen Bakterientransformanten die Plasmid DNA isoliert (2.2.2.1) und mit *Pst*I restringiert (2.2.2.3). Die Restriktionsfragmente wurden anschließen elektorphoretisch aufgetrennt (2.2.2.4) und anhand des verwendeten Standards bestimmt (2.2.2.5).

Positive Bakterientransformanten enthalten die subklonierte cDNA, welche für das vollständige *C1* Protein kodiert. Dieses *C1* Protein besteht aus den Aminosäuren 1-273. Die Fusionsproteine mit der Aktivierungs- und Bindedomäne von Gal4 wurden als AD-*C1* und BD-*C1* bezeichnet und die korrespondierenden Expressionsplasmide als:

pAD-*C1* Plasmid # 33

pBD-*C1* Plasmid # 54

3.2.4 Herstellung der *C1-I* Expressionsplasmide

(siehe Abbildung 9)

Die ca. 1.1 kb große *C1-I* cDNA wurde mittels *Eco*RI Restriktion (2.2.2.3) aus der Plasmid DNA (2.2.2.2) p*C1*cCI53 ausgeschnitten und isoliert (2.2.3.3). Nach der Bestimmung der DNA Menge (2.2.2.5) erfolgte die Ligation (2.2.3.6) in die *Eco*RI (2.2.2.3) geschnittene Plasmid DNA (2.2.2.2) der Expressionsvektoren pAD und pBD.

Aufgrund der ungerichteten Klonierung ergaben sich zwei mögliche Orientierungen des Fragmentes im Vektor. Um die Orientierung festzustellen wurde aus 24 unabhängigen Bakterientransformanten die Plasmid DNA isoliert (2.2.2.1) und mit *Pst*I restringiert (2.2.2.3). Die Restriktionsfragmente wurden anschließen elektorphoretisch aufgetrennt (2.2.2.4) und anhand des verwendeten Standards bestimmt (2.2.2.5).

Positive Bakterientransformanten enthalten die subklonierte cDNA, welche für das für das mutierte *C1* Protein kodiert. Dieses *C1–I* Protein besteht aus den Aminosäuren 1-252 und enthält, im Gegensatz zu *C1*, keine funktionierende Aktivierungsdomäne. Des weiteren hat es

ausgetauschte und deletierte Aminosäuren. Die basischen Domäne, die für die Interaktion mit *R* benötigt wird, ist davon nicht betroffen.

Die Fusionsproteine mit der Aktivierungs- und Bindedomäne von Gal4 wurden als AD-*C1–I* und BD-*C1–I* bezeichnet und die korrespondierenden Expressionsplasmide als:

pAD-*C1-I* Plasmid # 143

pBD-*C1-I* Plasmid # 168

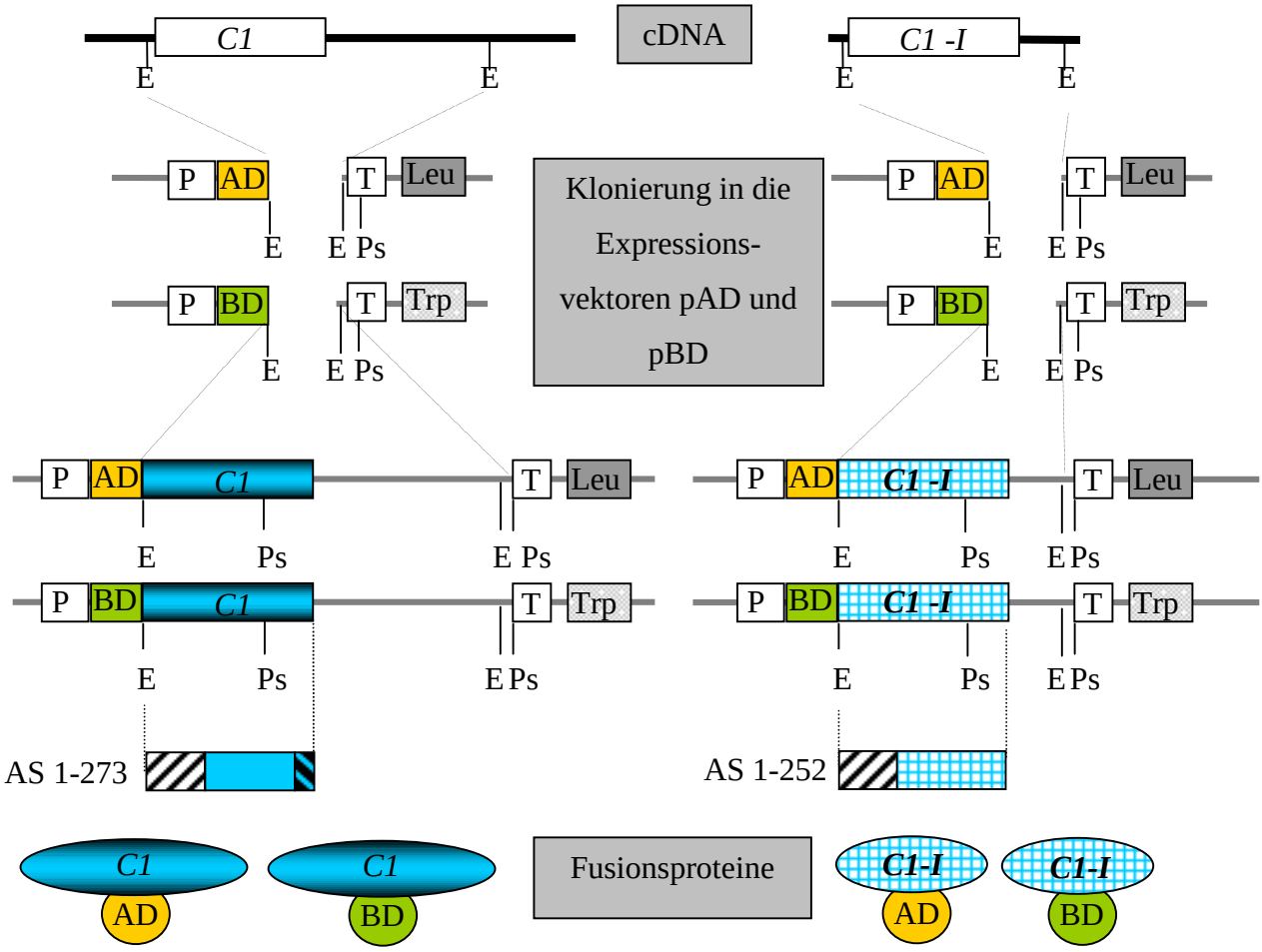

Abbildung 9: Schematische Darstellung der Herstellung der *C1* und *C1–I* Expressionsplasmide

Die cDNAs von *C1* (p*C1*cLC28) und *C1–I* (p*C1*cCI53) wurden als *Eco*RI Fragmente isoliert und ungerichtet in die *Eco*RI Schnittstelle der Expressionsvektoren (pAD, pBD) kloniert. Die Orientierung der Fragmente in den Expressionsvektoren wurde durch eine Restriktion mit *Pst*I (Ps) festgestellt. *C1* (blau) codiert für den funktionsfähigen Transkriptionsaktivator (AS 1-273). *C1-I* (blau kariert) ist eine Mutante von *C1* (AS 1-252), die im Gegensatz zu *C1* keine transkriptionsaktivierende Domäne (blau/schwarz gestreift) enthält. Der Bereich der für die Interaktion mit *R* ist sowohl in *C1* als auch in *C1–I* (schwarz/weiß gestreift) vorhanden.
Die Fusionsproteine wurden als AD-*C1*, BD-*C1*, AD-*C1-I* und BD-*C1-I* bezeichnet und enthalten die AD (Aktivierungsdomäne, gelb) oder BD (Bindedomäne, grün) von Gal4. Die BD und AD Expressionsvektoren enthalten den ADH1Promotor (P) und den ADH1 Terminator (T), des weiteren die auxotrophen Markergene LEU2 (Leu, grau) und TRP1 (Trp, hellgrau).

3.2.5 Herstellung der *InD1* Expressionsplasmide

(siehe Abbildung 10)

Die ca 2,2 kb *InD* cDNA wurde mittels *Eco*RI/ *Xho*I Restriktion (2.2.2.3) aus der Plasmid DNA *InD* 2.1 (2.2.2.2) ausgeschnitten und die Enden des Fragmentes anschließend aufgefüllt (2.2.3.1), damit sie kompatibel zu den Enden des Vektors sind. Nach der Isolierung des Fragmentes erfolgte die Bestimmung der DNA Menge und die Ligation (2.2.3.6) in die *Sma*I (2.2.2.3) geschnittene Plasmid DNA (2.2.2.2) der Expressionsvektoren pAD und pBD.

Aufgrund der ungerichteten Klonierung ergaben sich zwei mögliche Orientierungen des Fragmentes im Vektor. Um die Orientierung festzustellen wurde aus 24 unabhängigen Bakterientransformanten die Plasmid DNA isoliert (2.2.2.1) und mit *Sal*I restringiert (2.2.2.3). Die Restriktionsfragmente wurden anschließen elektorphoretisch aufgetrennt (2.2.2.4) und anhand des verwendeten Standards bestimmt (2.2.2.5).

Positive Bakterientransformanten enthalten die subklonierte cDNA, welche für das vollständige *InD1* Protein kodiert. Dieses *InD1* Protein besteht aus den Aminosäuren 1-690. Die Fusionsproteine mit der Aktivierungs- und Bindedomäne von Gal4 wurden als AD-*InD1* und BD-*InD1* bezeichnet und die korrespondierenden Expressionsplasmide als:

pAD-*InD*1 Plasmid # 7

pBD-*InD*1 Plasmid # 28

3.2.6 Herstellung der *InXS* Expressionsplasmide

(siehe Abbildung 10)

Die ca 2,2 kb große *In* cDNA wurde mittels *Nco*I/ *Eco*RI Restriktion aus der Plasmid DNA pBC277A#7 (2.2.2.2) ausgeschnitten und die Enden des Fragmentes anschließend aufgefüllt (2.2.3.1), damit sie kompatibel zu den Enden des Vektors sind. Nach der Isolierung des Fragmentes erfolgte die Bestimmung der DNA Menge und die Ligation (2.2.3.6) in die *Eco*RI (2.2.2.3) geschnittene Plasmid DNA (2.2.2.2) der Expressionsvektoren pAD und pBD, dessen Enden ebenfalls aufgefüllt wurden.

Aufgrund der ungerichteten Klonierung ergaben sich zwei mögliche Orientierungen des Fragmentes im Vektor. Um die Orientierung festzustellen wurde aus 24 unabhängigen Bakterientransformanten die Plasmid DNA isoliert (2.2.2.1) und mit *Sal*I restringiert (2.2.2.3). Die Restriktionsfragmente wurden anschließen elektorphoretisch aufgetrennt (2.2.2.4) und anhand des verwendeten Standards bestimmt (2.2.2.5).

Positive Bakterientransformanten enthalten die subklonierte cDNA eines missgespleißten Transkriptes des *Intensifier* Allels *In*. Sie enthält u.a. Intron 2 Sequenzen, wodurch ein Stopp Codon im Leserahmen eingefügt wird. Das putative Protein dieser cDNA wird daher nur von den Exon 1 und 2 korresponierenden Sequenzen kodiert und besteht daher nur aus den Aminosäuren 1-147, anstatt der 685 AS des vollständigen *In* Proteins.

Die Fusionsproteine mit der Aktivierungs- und Bindedomäne von Gal4 wurden als AD-*InXS* und BD-*InXS* bezeichnet und die korrespondierenden Expressionsplasmide als:

pAD-*InXS* Plasmid # 484

pBD-*InXS* Plasmid # 489

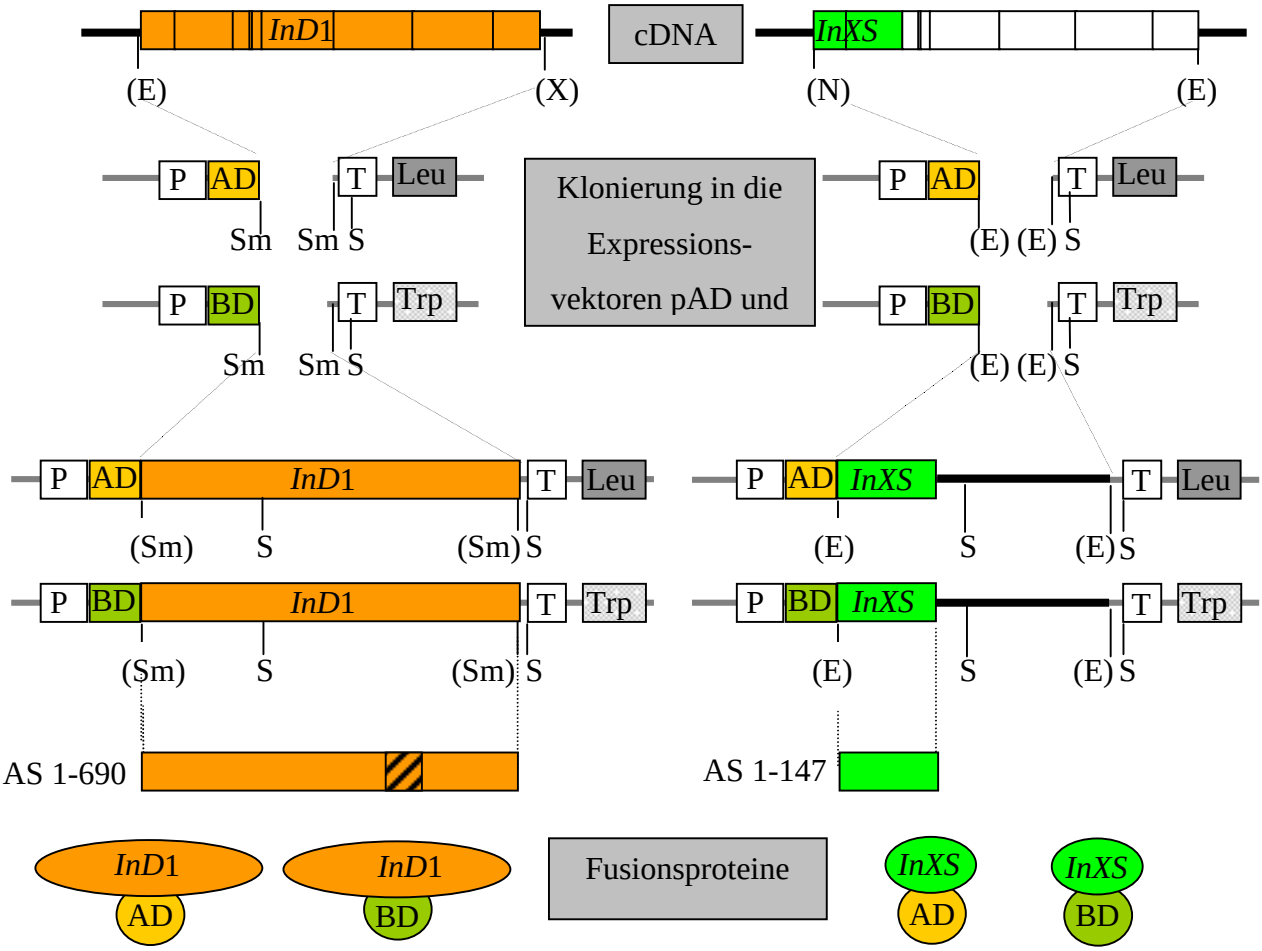

Abbildung 10: Schematische Darstellung der Herstellung der *InD1* und *InXS* Expressionsplasmide

Die cDNA von *InD1* (InD 2.1) wurde mit *Eco*RI (E)/*Xho*I (X) ausgeschnitten. Das aufgefüllte Fragment wurde ungerichtet in die *Sma*I (Sm) Schnittstelle der Expressionsvektoren pAD und pBD kloniert. Die cDNA von *InXS* (pBC277A#7) wurde mit *Nco*I (N)/*Eco*RI ausgeschnitten. Das aufgefüllte Fragment wurde ungerichtet in die aufgefüllte *Eco*RI Schnittstelle der Expressionsvektoren pAD und pBD kloniert. Die Orientierung der Fragmente in den Expressionsvektoren wurde durch die Restriktion mit *Sal*I (S) festgestellt.
InD1 (orange) kodiert für das vollständige Protein (AS 1-690). Es enthält die basische-Helix-Loop-Helix Region (schwarz/ orange schraffiert), die eine Homologie zu dem myc Transkriptionsfaktor *R* aufweist.
Bei der cDNA *InXS* handelt es sich um die cDNA eines missgespleißten Transkripts. Sie enthält u.a. Intron 2 Sequenzen, wodurch ein Stopp Codon im Leserahmen eingefügt wird. Das putative *InXS* Protein (hellgrün) dieser cDNA wird daher nur von den entsprechenden Exon 1 und 2 Sequenzen kodiert und besteht daher nur aus den Aminosäuren 1-147, anstatt der 685 AS des vollständigen *In* Proteins.
Die Fusionsproteine wurden als AD-*InD*, BD-*InD*, AD-*InXS* und BD-*InXS* bezeichnet und enthalten die AD (Aktivierungsdomäne, gelb) oder BD (Bindedomäne, grün) von Gal4. Die BD und AD Expressionsvektoren enthalten den ADH1Promotor (P) und den ADH1 Terminator (T), des weiteren die auxotrophen Markergene LEU2 (Leu, grau) und TRP1 (Trp, hellgrau).

3.2.7 Herstellung der *In* Expressionsplasmide

Für die Herstellung der *In* Expressionsplasmide war kein vollständiger *In* cDNA Klon vorhanden. Daher wurde versucht eine *In*-ähnliche cDNA aus Teilen von *In* und *InD1* herzustellen. Die Idee hierfür entstand aufgrund der hohen Homologie zwischen den Proteinen von *In* und *InD1*. Der Vergleich der Aminosäuresequenz (Abbildung 11) zeigt im aminoterminalen Proteinbereich viele konservierte und nichtkonservierte Aminosäureaustausche, der carboxyterminale Bereich ist identisch. Für das *In*-ähnliche Fusionsprotein sollte daher der aminoterminale Bereich von *In (In*-am) mit dem carboxyterminalen Bereich von *InD1* (*InD*-carb) zusammengeführt werden.

Für diese Fusion war eine direkte Klonierung der entsprechenden cDNA Fragmente nicht möglich, da die einzige mögliche Schnittstelle (*Mlu*I) in der cDNA von *InD1* nicht vorhanden war. Andere Schnittstellen konnten nicht verwendet werden, da sie mehrmals in der Sequenz vorkommen. Aus diesen Gründen wurde beschlossen die entsprechenden Fragmente aus den cDNAs von *In* und *InD*1 per PCR zu amplifizieren und sie anschließend zu fusionieren.

3.2.7.1 Herstellung des Fusionsklons aus In und InD1

Der ca. 1,2 kb lange Bereich von *In* (*In*-am) wurde mittels PCR und Pfx-DNA Polymerase aus dem Plasmid pBC-BNL-139-RI mit den Primern Ol-27 und Ol-24 amplifiziert (2.2.3.5). Das PCR Produkt wurde in die *Eco*RV/*Sma*I geschnittene (2.2.2.3) Plasmid DNA (2.2.2.2) des Vektor pBluescript II SK+ ligiert und vollständig sequenziert (2.2.4). Das resultierende Plasmid mit dem korrekt amplifizierten *In*-am Fragment wurde als Plasmid #623 bezeichnet (Abbildung 12).

Der ca. 1 kb lange Bereich von *InD* (*InD*-carb) wurde mittels PCR und Pfx-DNA Polymerase aus dem Plasmid 2.1 *InD* mit den Primern Ol-53 und Ol-28 amplifiziert (2.2.3.5). Der 5‘Primer Ol-53 enthält eine zusätzliche *Mlu*I Schnittstelle, um die Fusion der *In* und *InD1* Fragmente zu ermöglichen. Das PCR Produkt wurde in die *Eco*RV/*Sma*I geschnittene (2.2.2.3) Plasmid DNA (2.2.2.2) des Vektor pBluescript II SK+ ligiert und vollständig sequenziert (2.2.4). Das resultierende Plasmid mit dem korrekt amplifizierten *InD*-carb Fragment wurde als Plasmid #659 bezeichnet.

Für die Fusion der Fragmente wurde das *In*-am Fragment zunächst mittels Restriktion (2.2.2.3) mit *Mlu*I/*Hind*III aus der Plasmid DNA #623 ausgeschnitten und isoliert (2.2.3.3). Nach der Bestimmung der DNA Menge erfolgte die gerichtete Ligation (2.2.3.6) in die *Mlu*I/ *Hind*III geschnittene Plasmid DNA #659 (2.2.2.2). Die *Hind*III Schnittstellen stammen hierbei aus dem Polylinker des Vektors pBluescript II SK+. Das resultierende Fragment,

bestehend aus *In*-am und *InD*-carb, wurde als *InFus* bezeichnet und ist im Plasmid #685 enthalten. Die Aminosäuresequenz befindet sich im Anhang (Abbildung 78, Seite 172).

Die Primer Ol-27 und Ol-28 enthielten zusätzliche *Bam*HI Schnittstellen um die Klonierung für andere, im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuche, zu ermöglichen. Diese Schnittstellen wurden auch für die Subklonierung des *InFus* Fragmentes in die pAD und pBD Vektoren genutzt (Abbildung 13). Hierfür wurde das *InFus* Fragment mittels *Bam*HI Restriktion (2.2.2.3) aus der Plasmid DNA #685 (2.2.2.1) ausgeschnitten. Damit die Enden kompatibel zu den Enden des Vektors sind mußten sowohl die Enden des Fragmentes als auch die Enden des Vektors aufgefüllt werden. Nach der Isolierung des Fragmentes erfolgte die Bestimmung der DNA Menge und die Ligation (2.2.3.6) in die *Sal*I (2.2.2.3) geschnittene Plasmid DNA (2.2.2.2) der Expressionsvektoren pAD und pBD.

Aufgrund der ungerichteten Klonierung ergaben sich zwei mögliche Orientierungen des Fragmentes in den Vektoren. Um die Orientierung festzustellen wurde aus 24 unabhängigen Bakterientransformanten die Plasmid DNA isoliert (2.2.2.1) und mit *Pst*I restringiert (2.2.2.3). Die Restriktionsfragmente wurden anschließen elektorphoretisch aufgetrennt (2.2.2.4) und anhand des verwendeten Standards bestimmt (2.2.2.5).

Positive Bakterientransformanten enthalten das subklonierte *InFus* Fragment, welches für die Aminosäuren 1-366 von *In* und für die Aminosäuren 373-690 von *InD1* kodiert. Die Fusionsproteine mit der Aktivierungs- und Bindedomäne von Gal4 wurden als AD-*InFus* und BD-*InFus* bezeichnet und die korrespondierenden Expressionsplasmide als:

pAD-*InFus* Plasmid # 824

pBD-*InFus* Plasmid # 822

```
In   : MAAGGRG---EAAQKALQSVAQSTGWTYSLLWRLCPRQGALVWAEGYYNGAIRTRKTTMT :  57
InD1 : MAAGGGGGGGEAAQKALQSVAQSTGWTYSLLWRLCPRQGALVWAEGYYNGAIRTRKTTMT :  60

In   : TVRQPAGAEDAGDEETAPRRSRQLKELYDSLAAGEAAYDGGGGVGGPQQQQ---QAAVVP : 114
InD1 : TVRQPAGAEDAGDEETALRRSRQLKELYDSLAAGEAAYDGGGGVGDPQQQQHQQQVAVVP : 120

                                          *
In   : PPRRPAAALAPEDLTETEWFYLMCASYCFPPAVGLPGEAFVRRAHVWLCGANKADSKVFS : 174
InD1 : PPRRPAAALAPEDLTETEWFYLLCASYCFPPAVGLPGEAFVRRAHVWLCGANKADSKVFS : 180

In   : RAILARSAGIQTVACIPVDDGVLEIGTTEKVEEDIFLIQHVRNIFVDQHGAHIMPTTLSG : 234
InD1 : RAILARSAGIQTVACIPVDDGVLEIGTTEKVEEDIFLIQHVRNIFVDQHGAHIMPTTLSG : 240

In   : YSTSTPTTQLNH-QPFQTKTGISLNLGDERNSEMEDDDDDGRIDLENNTENDSTRRHLPQ : 293
InD1 : YSTSTPTTQLNHHQPFQTKTGISLNLGDERNSEMEDDDD-GRIDLENNTENDSTRRHLPQ : 299

In   : DASAGNELETLNAESSGPMLIANLTAQDEYGQLHRFLSVDLSSKYLQSPGAEDQAAVAEN : 353
InD1 : DASVGNELETLNAESSGPMLIANLTAQDEYGPLHRFLSVDLSSKYLQSPGAEGQAAVAEN : 359

                  MluI
                    ▽
In   : AHYIETVLRILRFNACRQTQAASSNIAKTYLALSKNSPFSRWNWKRKGISSMMIAEGTPQ : 413
InD1 : AHYIETVLRILRSNACRQTRAAS-NVVKTYLALSKNSPFSRWNWKRKGISSMLIPEGTPQ : 418

In   : RMLKSVLLGAPSSSSHRSHRGEVQSSSPEPRGDDGEGTSRSRRGPVPSQTELSASHVLKE : 473
InD1 : RMLKSVLLGAPSSSSHRSHRGEVQSSSPEPRGDDGEGTSRSRRGPVPSQTELSASHVLKE : 478
                                                         basisch

In   : RRRREKLNEGFAMLRSLVPFVTKMDRASILGDTIEYVKQLRRRIQELESRRRLVGSNQKT : 533
InD1 : RRRREKLNEGFAMLRSLVPFVTKMDRASILGDTIEYVKQLRRRIQELESRRRLVGSNQKT : 538
            Helix          loop        Helix

In   : TMAQQPPPPAASTEERGRRQTSGGYLARAAGTGSRAAEASGNSNLGEEPPAAAASDTDTE : 593
InD1 : TMAQQPPPPAASTEERGRRQTSGGYLARAAGTGSRAAEASGNSNLGEEPPAAAASDTDTE : 598

In   : VQVSIIGSDALLELRCPHREGLLLRVMQALHQELRLEITSVQASSAGDVLLAKLRAKVKE : 653
InD1 : VQVSIIGSDALLELRCPHREGLLLRVMQALHQELRLEITSVQASSAGDVLLAKLRAKVKE : 658

In   : VHGRRSSITEVKRAIHLIVSSDWICEKNPCLA : 685
InD1 : VHGRRSSITEVKRAIHLIVSSDWICEKNPCLA : 690
```

Abbildung 11: Vergleich der Aminosäuresequenz von *In* und *InD*1

Durch den Vergleich der Aminosäuresequenz von *In* und *InD1* fallen die homologen und nichthomologe Bereiche auf. Der Hauptunterschied zwischen den beiden Proteinen liegt hierbei im aminoterminalen Bereich. Der carboxyterminale Bereich, beginnend vor der basischen Helix-Loop-Helix Region (Boxen), ist dagegen konserviert.
Die konservierten Aminosäure-Austausche sind in grün markiert, die nicht-konservierten in rot. Die Lage der *Mlu*I Schnittstelle, abgeleitet aus der *In* cDNA Sequenz, ist durch ein Dreieck markiert. Das Zeichen * markiert die letzte Aminosäure, die vom Exon 2 codiert wird.

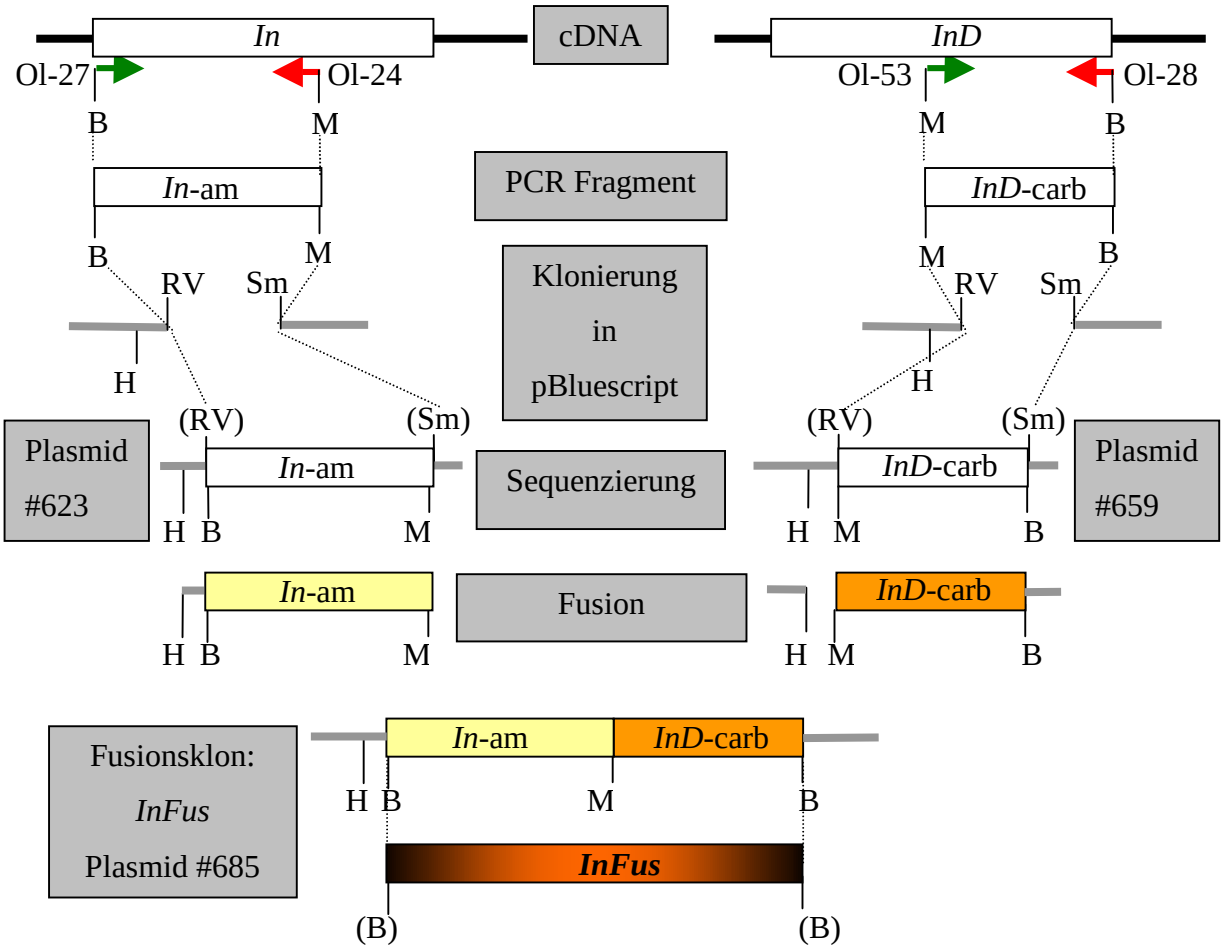

Abbildung 12: Schematische Darstellung der Herstellung des Fusionsklons *InFus*

Für die Herstellung der Expressionskonstrukte war kein vollständiger *In* cDNA Klon vorhanden. Daher wurde eine *In*-ähnliche cDNA aus Teilen von *In (In*-am*)* und *InD1* (*InD*-carb) hergestellt. Die entsprechenden Bereiche wurden per PCR aus den cDNAS pBC-BNL-139-RI (In) und 2.1 InD amplifiziert und in die *Eco*RV (RV)/*Sma*I (Sm) Schnittstelle des Vektors pBluescript II SK+ kloniert. Die Primer (grüne und rote Pfeile) Ol-27 und Ol-28 enthielten eine zusätzliche *Bam*HI (B) Schnittstelle, der Primer Ol-53 eine zusätzliche *Mlu*I (M) Schnittstelle. Nachdem die Fragmente vollständig sequenziert wurden, erfolgte die Fusion der Fragmente. Hierzu wurde das *In*-am Fragment mittels Restriktion mit *Mlu*I/*Hind*III (H) aus dem Plasmid #623 ausgeschnitten und anschließend gerichtet in die *Mlu*I/ *Hind*III Schnittstelle des Plasmids #659 mit dem *InD*-carb Fragment kloniert. Das resultierende Fusionsfragment, bestehend aus *In*-am und *InD*-carb, wurde als *InFus* bezeichnet. Die Aminosäuresequenz befindet sich im Anhang (Abbildung 78, Seite 172).

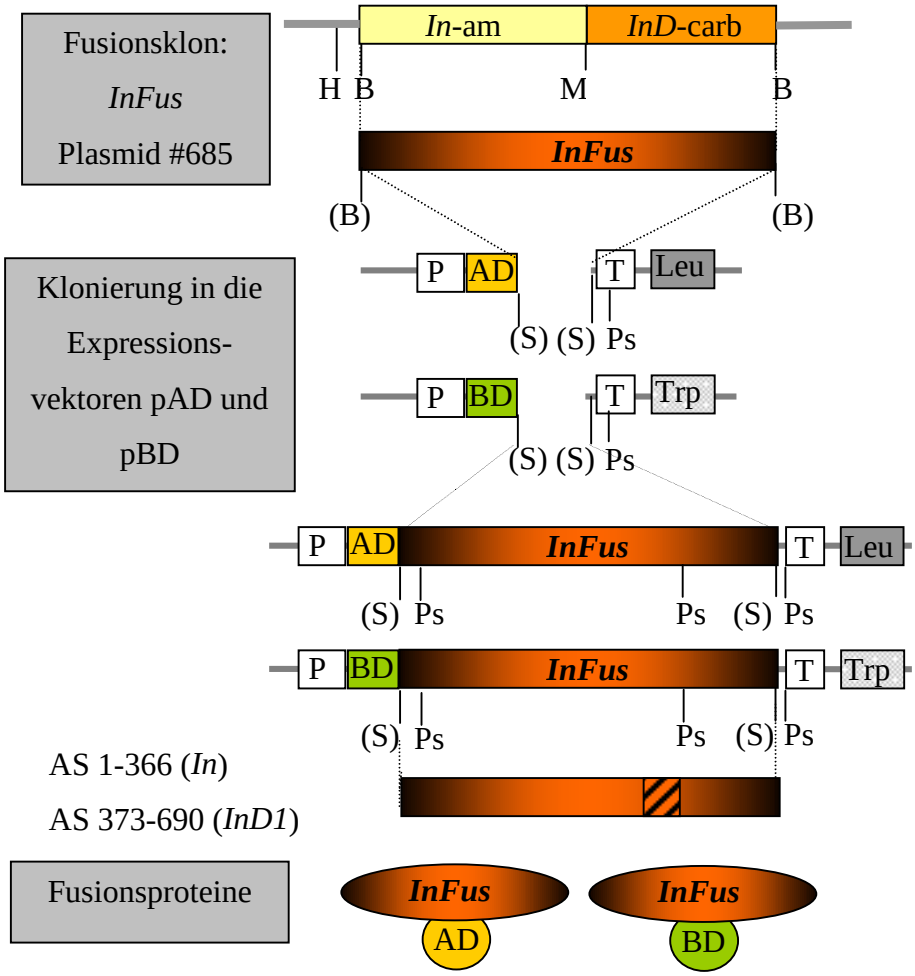

Abbildung 13: Schematische Darstellung der Herstellung der *InFus* Expressionsplasmide

Das *InFus* Fragment wurde mittels Restriktionverdau mit *Bam*HI aus dem Plasmid #685 ausgeschnitten und die Enden des Fragmentes aufgefüllt. Das Fragment wurde anschließend ungerichtet in die aufgefüllte *Sal*I (S) Schnittstelle der Vektoren pAD und pBD einkloniert. Die Orientierung des Fragmentes in den Vektoren wurde durch Restriktion mit *Pst*I (Ps) festgestellt. Das subklonierte *InFus* kodiert für die Aminosäuren 1-366 von *In (In*-am*)* und für die Aminosäuren 373-690 von *InD*1 (*InD*-carb). Es enthält die basische-Helix-Loop-Helix Region (schwarz/ orange schraffiert), die eine Homologie zu dem myc Transkriptionsfaktor *R* aufweist.
Die Fusionsproteine wurden als AD-*Fus* und BD-*Fus* bezeichnet und enthalten die AD (Aktivierungsdomäne, gelb) oder BD (Bindedomäne, grün) von Gal4. Die BD und AD Expressionsvektoren enthalten den ADH1Promotor (P) und den ADH1 Terminator (T), des weiteren die auxotrophen Markergene LEU2 (Leu, grau) und TRP1 (Trp, hellgrau).

Um die korrekte Klonierung im Leserahmen zu gewährleisten, wurden alle im Rahmen dieser Arbeit hergestellten pAD und pBD Expressionsplasmide durch Sequenzierung der Fusionsstellen überprüft. Die Expressionsplasmide und die vom Hersteller mitgelieferten Kontrollen, für das Two Hybrid System, sind in Tabelle 4 aufgelistet. Auf diese Kontrollen pGal4, p53, pSV40 und pLamin C wird im nächsten Kapitel eingegangen.

Plasmid	**Fusionsprotein**	**schematische Darstellung der Fusionsproteine**
pAD	AD	
pBD	BD	
pAD-*R*	AD-*R*	
pBD-*R*	BD-*R*	
pAD-*Rdel*	AD-*Rdel*	
pBD-*Rdel*	BD-*Rdel*	
pAD-*C1*	AD-*C1*	
pBD-*C1*	BD-*C1*	
pAD-*C1–I*	AD-*C1-I*	
pBD-*C1-I*	BD-*C1–I*	
pAD-*InD1*	AD-*InD*1	
pBD-*InD1*	BD-*InD1*	
pAD-*InXS*	AD-*InXS*	
pBD-*InXS*	BD-*InXS*	
pAD-*InFus*	AD-*InFus*	
pBD-*InFus*	BD-*InFus*	
pGal4	Gal4	
p53	p53	
pSV40	SV40	
pLamin C	Lamin C	

Tabelle 4: Übersicht der zu testenden Expressionsplasmide und ihrer Fusionsproteine

Die Tabelle zeigt eine Übersicht über die hergestellten Expressionsplasmide und die vom Hersteller mitgelieferten Kontrollen pGal4, p53, pSV40 und pLamin C. Die Fusionsproteine sind in der rechten Spalte schematisch dargestellt, wobei der gelbe Kreis das Symbol für die Aktivierungsdomäne von Gal4 (AD) und der grüne Kreis das Symbol für die DNA Bindedomäne von Gal4 (BD) ist.

3.3 Vorversuche

3.3.1 Der Hefestamm YRG-2

Der im Two Hybrid System verwendete Hefestamm YRG-2 trägt Mutationen in den Genen *LEU2* , *TRP1* und *HIS3* und kann daher die Aminosäuren Leucin, Tryptophan und Histidin nicht synthetisieren. Um festzustellen, ob der richtige Stamm für die durchzuführenden Versuche vorlag, wurde er auf seine Fähigkeit getestet, in Selektionsmedium zu wachsen, dem Leucin, Tryptophan und Histidin fehlen. Es wurde zu keinem Zeitpunkt ein Wachstum beobachtet. Erst nach Transformation von kompetenten Hefezellen (2.2.5.3) mit der DNA der entsprechenden Expressionsplasmide lagen funktionsfähige *LEU2* , *TRP1* und *HIS3* Gene vor. Diese Transformanten konnten auf dem Selektionsmedium wachsen. Demzufolge handelt es sich bei den nichttransformierten Zellen um den richtigen Hefestamm YRG-2.

3.3.2 Western Blot Analysen

Mit Western Blot Analysen sollte getestet werden, ob in den Transformanten die Fusionsproteine synthetisiert werden. Damit sollte ausgeschlossen werden, daß der Grund für einen negativen Nachweis auf eine *in vivo* Interaktion, nicht ein fehlendes Fusionsprotein ist.

Für einen Vortest wurden Transformanten hergestellt, die entweder das Plasmid pGal4 (natives Gal4) oder die beiden Plasmide pAD (Aktivierungsdomäne von Gal4) und pBD (DNA Bindedomäne von Gal4) enthielten. Von diesen Transformanten und dem nicht transformierten YRG-2 Hefestamm wurden die Gesamtproteine isoliert (2.2.5.6) und elektrophoretisch aufgetrennt (2.2.6.1). Die Proteine parallel gelaufener SDS-Polyacrylamidgele wurden angefärbt (2.2.6.2) oder auf eine Nitrozellulosemembran übertragen (2.2.6.3). Die Membran wurde anschließend einer Immuno Detektion unterzogen (2.2.6.4). Für die Immunodetektion wurden monoklonale Antikörper gegen die Aktivierungsdomäne und DNA Bindedomäne verwendet.

Die Analyse des Western Blots zeigte eine starke Kreuzhybridisierung der Antikörper mit Proteinen aus dem Hefestamm YRG-2. Es wurden viele Banden detektiert, die eine eindeutige Zuordnung nicht ermöglichten (Daten nicht gezeigt). Wiederholungen mit unterschiedlichen Konzentrationen des ersten und zweiten Antikörpers zeigten die gleichen Ergebnisse (Daten nicht gezeigt).

Aufgrund dieser Ergebnisse war es nicht möglich, die Fusionsproteine in weiteren Transformanten nachzuweisen. Es wurden daher keine Western Blot Analysen der im Rahmen dieser Arbeit hergestellten Transformanten, durchgeführt.

3.4 Das Two Hybrid System

Für die Synthese der Fusionsproteine mussten die entsprechenden AD- oder BD-Expressionsplasmide in den Hefestamm YRG-2 eingebracht werden. Hefetransformanten mit den AD-Expressionsplasmiden wurden aufgrund des aktiven auxotrophe Reportergens *LEU2* identifiziert. Die Hefetransformanten waren dadurch in der Lage, in Leucinmangelmedium zu wachsen. Hefetransformanten mit den BD-Expressionsplasmiden wurden aufrund des aktiven auxotrophe Reportergens *TRP1* identifiziert. Die Hefetransformanten waren dadurch in der Lage, in Tryptophanmangelmedium zu wachsen. Die Selektion auf die Anwesenheit von sowohl AD- als auch BD-Expressionsplasmiden erfolgte in Mangelmedium, dem sowohl Leucin als auch Tryptophan fehlte.

Anschließend wurde die Fähigkeit zur Interaktion der synthetisierten Fusionsproteine BD-X und AD-Y in den Hefetransformanten untersucht. Hierbei stehen X und Y für die auf Interaktion zu testenden Proteine. Fusionsproteine, die interagieren, sind in der Lage die Funktion des Transkriptionsaktivators Gal4 weitgehend wieder herzustellen. Das führt zu einer Aktivierung des auxotrophen Reportergens *HIS3* und zu einer Aktivierung des *lacZ* Reportergens. Hefetransformanten, deren Fusionproteine interagieren, können daher in Histidinmangelmedium wachsen und zeigen eine β-Galaktosidaseaktivität (Abbildung 14).

Von jedem der hergestellen Hefestämme wurden zwei bis vier Transformanten auf die *HIS3* Aktivierung untersucht. Dazu wurden sie auf Histidinmangelmedium ausgestrichen (2.2.5.1) und durch Wachstum identifiziert. Für den quantitativen Nachweis der β-Galaktosidaseaktivität wurden von den selben Transformanten Flüssigkulturen hergestellt. Aus diesen wurden die Gesamtproteine isoliert und für den Enzymassay mit dem Substrat versetzt (2.2.5.5).

Aus den für die entsprechenden Expressionplasmide erhaltenen relativen Einheiten der β-Galaktosidaseaktivität wurden die Mittelwerte gebildet. Der hierbei erhaltene Mittelwert von Hefetransformanten mit pGal4 Expressionsplasmid wurde gleich 100% gesetzt. Alle übrigen gemessenen Mittelwerte eines Versuches wurden auf diesen Wert bezogen.

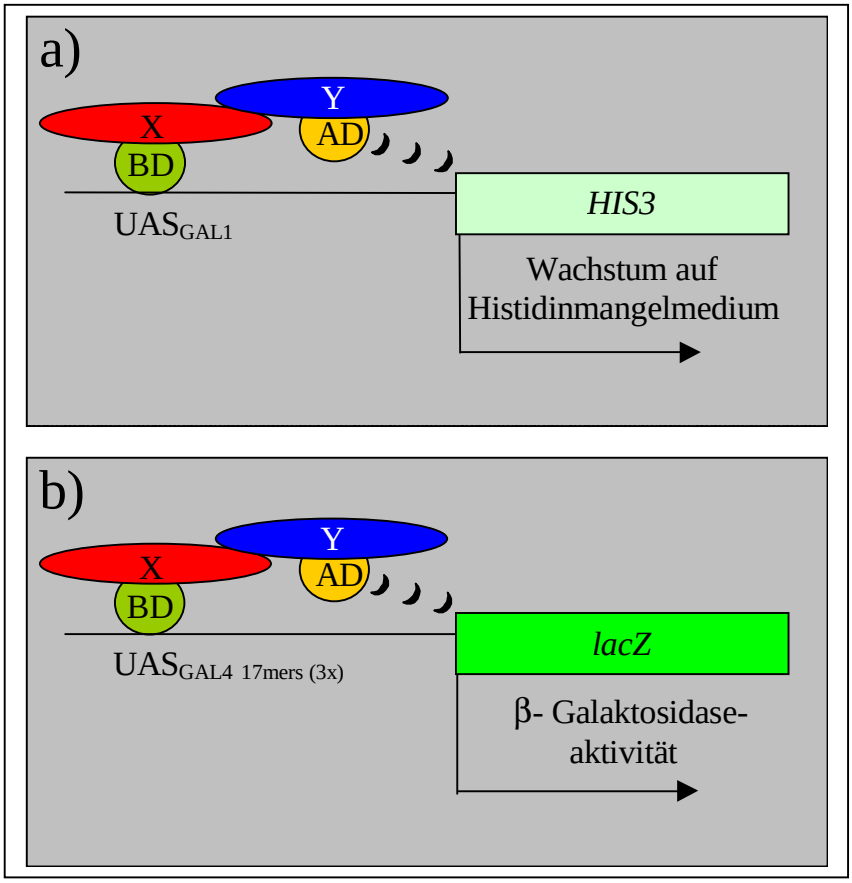

Abbildung 14: Two Hybrid System

Durch die Interaktion der Fusionsproteine BD-X und AD-Y in den Hefetransformanten wird die Funktion des Transkriptionsaktivators Gal4 weitgehend wiederhergestellt. Das führt zu einer Aktivierung (a) des auxotrophen Reportergens *HIS3* (hellgrüne Box) und zu einer Aktivierung (b) des *lacZ* Reportergens (grüne Box) Hefetransformanten mit interagierenden Proteinen können daher auf Histidinmangelmedium wachsen und zeigen eine β-Galaktosidaseaktivität. X und Y stehen für die Proteine, die auf eine mögliche Interaktion getestetet werden sollen, sie sind mit der AD (Aktivierungsdomäne von Gal4) oder BD (DNA Bindedomäne von Gal4) fusioniert, UAS (upstream activating sequence = DNA Bindestelle der Gal4 DNA Bindedomäne)

3.5 Kontrollen

Als Kontrollen für die Two Hybrid Experimente können die Expressionsplasmide p53, pSV40, pLamin C und pGal4 (Abbildung 15) verwendet werden. Das pGal Expressionsplasmid kodiert hierbei für das vollständige native Gal4 Protein. Laut Hersteller (Stratagene) sind das native Gal4 und die in vivo interagierenden Fusionsproteine p53 und pSV40 in der Lage, die Reportergene *HIS3* und *lacZ* zu aktivieren. Hefetransformanten, die diese Proteine synthetisieren, sollten demzufolge auf Histidinmangelmedium wachsen und eine β-Galaktosidaseaktivität aufweisen. Diese Proteine eignen sich damit als positive Kontrollen für die Two Hybrid Experimente.

Im Gegensatz dazu sind die Fusionsproteine pSV40 und Lamin C nicht in der Lage, zu interagieren und verursachen demzufolge keine Aktivierung der Reportergene. Das gleiche gilt für die nicht-fusionierten Proteindomänen (AD und BD) von Gal4. Hefetransformanten, die diese Proteine synthetisieren, sollen demzufolge nicht auf Histidinmangelmedium wachsen und keine β-Galaktosidaseaktivität zeigen. Sie eigenen sich damit als negative Kontrollen für die Two Hybrid Experimente.

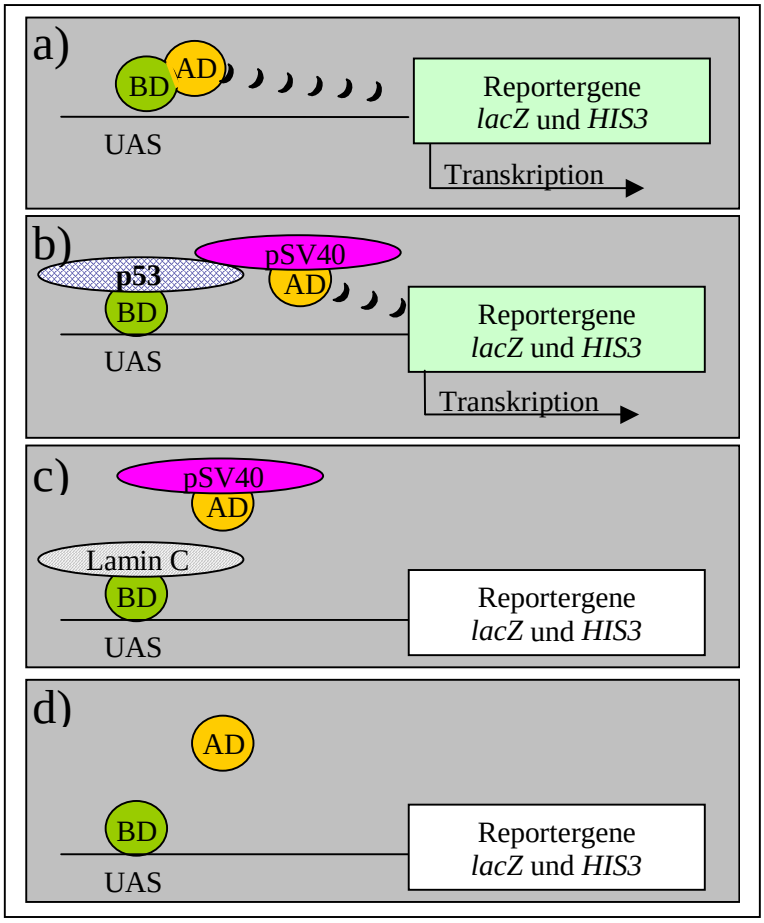

Abbildung 15: Kontrollen des Two Hybrid Systems

Durch das native Gal4 (a) und die in vivo interagierenden Fusionsproteine p53 und pSV40 (b) werden die Reportergene *HIS3* und *lacZ* aktiviert (grüne Box). Hefetransformanten, die diese Proteine synthetisieren, wachsen demzufolge auf Histidinmangelmedium und zeigen eine β-Galaktosidaseaktivität. Diese Proteine eignen sich damit als positive Kontrollen für das Two Hybrid System.
Im Gegensatz dazu sind die Fusionsproteine pSV40 und Lamin C nicht in der Lage zu interagieren (c). Das gleiche gilt für die nichtfusionierten AD- (Aktivierungsdomäne) und BD- (DNA Bindedomäne) Proteine von Gal4 (d). Hefetransformanten, die diese Proteine synthetisieren, können die Reportergene *HIS3* und *lacZ* (weiße Box) nicht aktivieren. Diese Hefetransformanten wachsen demzufolge nicht auf Histidinmangelmedium und zeigen keine β-Galaktosidaseaktivität. Sie eignen sich damit als negative Kontrollen für das Two Hybrid System.
UAS (upstream activating sequence = DNA Bindestelle der Gal4 DNA Bindedomäne)
Farbcode: natives Gal4 (Fusion aus gelben und grünem Kreis), pSV40 (rosa Oval), p53 (gemustertes Oval), pLamin C (graues Oval), AD (Aktivierungsdomäne, gelber Kreis), BD (DNA Bindedomäne, grüner Kreis)

Um festzustellen, ob die vom Hersteller mitgelieferten Kontrollen funktionieren, wurden die entsprechenden Expressionsplasmide zunächst in den Hefestamm YRG-2 eingebracht und hinsichtlich der Expressionsplasmide selektiert (2.2.5.3).

Anschließend wurden von jeder Transformation zwei bis vier Kolonien auf die Reportergenaktivität von *HIS3* untersucht (2.2.5.1).

Die pGal4 Transformanten, sind in der Lage auf Histidinmangelmedium zu wachsen (Abbildung 16). Die gleiche Beobachtung wurde bei Hefetransformanten gemacht, die p53 und SV40 Proteine synthetisieren. In beiden Hefestämme wird demzufolge das *HIS3* Reportergen aktiviert. Im Gegensatz hierzu waren die Hefetransformanten, die Lamin C und SV40 Proteine synthetisieren, nicht in der Lage auf Histidinmangelmedium zu wachsen (Abbildung 16). Die gleiche Beobachtung wurde bei Hefetransformanten gemacht, die sowohl AD als auch BD Proteine synthetisieren. In beiden Hefestämme wird demzufolge das *HIS3* Reportergen nicht aktiviert.

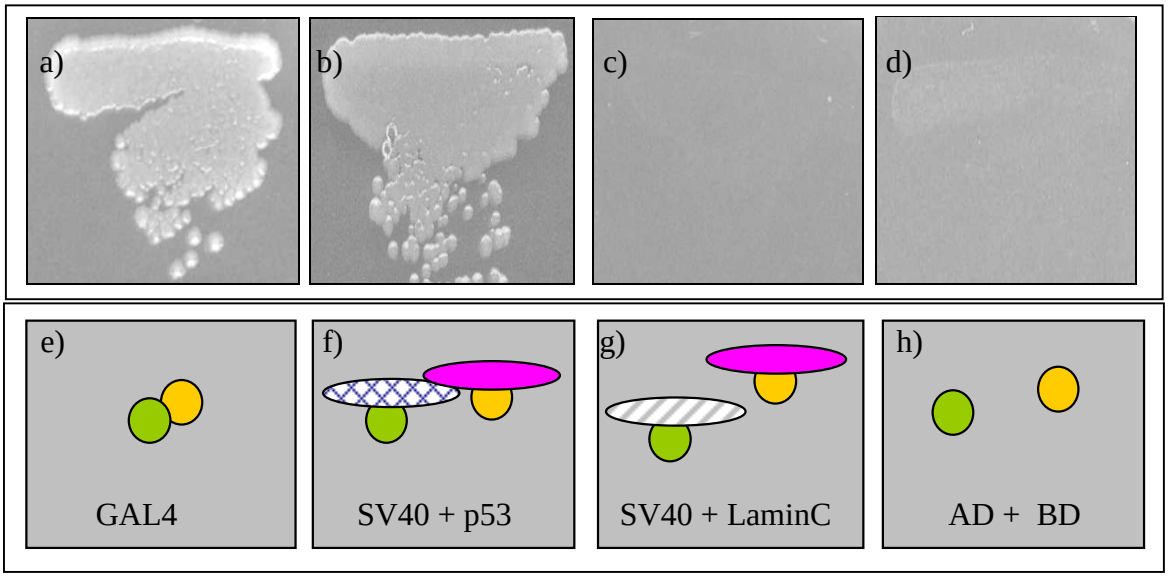

Abbildung 16: *HIS3* Reportergenaktivierung der Kontrollen

Der Hefestamm YRG-2 wurde mit den verschiedenen Kontrollplasmiden transformiert. Die Transformanten wurden anschließend hinsichtlich ihres Wachstums auf Histidinmangelmedium untersucht. Die pGal4 Transformanten, waren in der Lage auf Histidinmangelmedium zu wachsen (a, e). Die gleiche Beobachtung wurde bei Hefetransformanten gemacht, die p53 und SV40 synthetisieren (b, f). In beiden Hefestämme wird demzufolge das *HIS3* Reportergen aktiviert..
Im Gegensatz hierzu, waren die Hefetransformanten, die Lamin C und SV40 synthetisieren, nicht in der Lage auf Histidinmangelmedium zu wachsen (c, g). Die gleiche Beobachtung wurde bei Hefetransformanten gemacht, die sowohl AD als auch BD herstellen (d, h). In beiden Hefestämme wird demzufolge das *HIS3* Reportergen nicht aktiviert.
(a-d) Typisches Wachstum eines ausgestrichenen Hefetransformanten auf Histidinmangelmedium.
(e-h) Schematische Darstellung der Fusionsproteine in den entsprechenden Hefetransformanten.
Farbcode: natives Gal4 (Fusion aus gelben und grünem Kreis), pSV40 (rosa Oval), p53 (gemustertes Oval), pLamin C (graues Oval), AD von Gal4 (Aktivierungsdomäne, gelber Kreis), BD von Gal4 (DNA Bindedomäne, grüner Kreis)

Der quantitative Nachweis der β-Galaktosidaseaktivität (2.2.5.5) zeigt, daß Hefetransformanten mit dem Gal4 Protein ein aktives *lacZ* Reportergen enthalten (Abbildung 17). Die gleiche Beobachtung wurde bei Hefetransformanten gemacht, die p53 und pSV40 Proteine synthetisieren. Diese zeigen jedoch mit nur 3 % eine wesentlich niedrigere Aktivität im Vergleich zu den Transformanten mit Gal4 Protein.

In Hefetransformanten, die SV40 und Lamin C Proteine synthetisieren, wurde keine β-Galaktosidaseaktivität nachgewiesen. Hefetransformanten mit den AD und BD Proteinen, zeigten ebenfalls keine β-Galaktosidaseaktivität. Diese Ergebnisse zeigen, daß in beiden Hefestämmen das *lacZ* Reportergen nicht aktiviert wird.

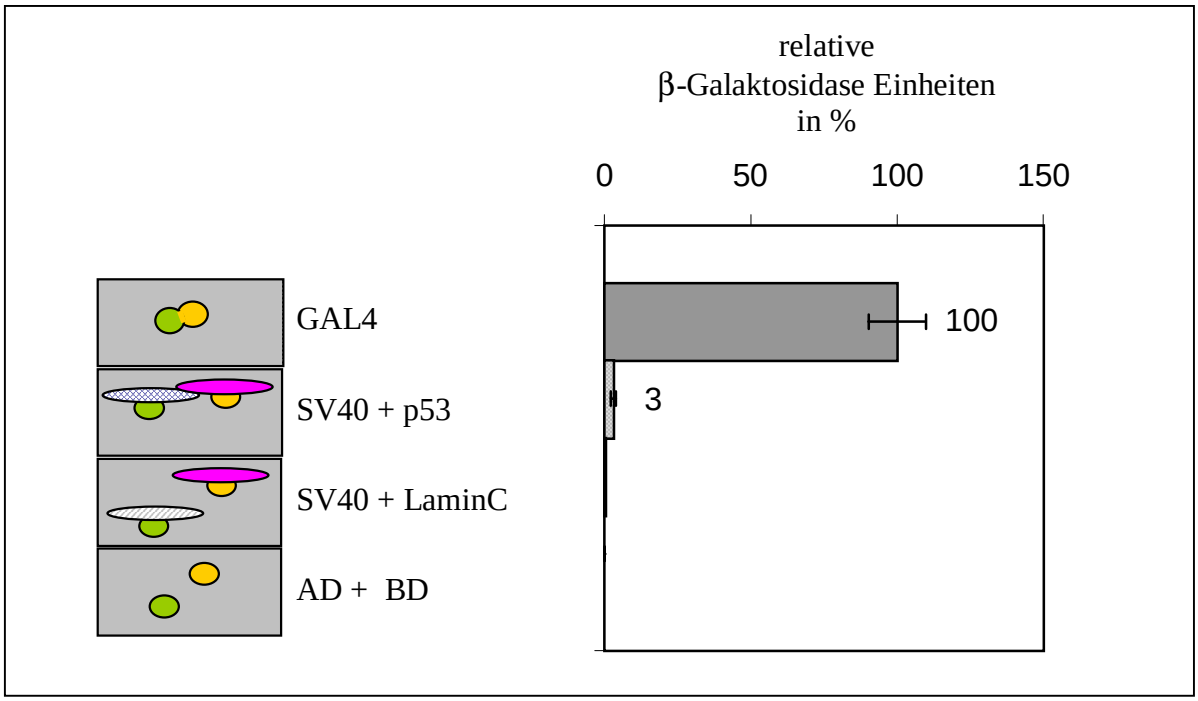

Abbildung 17: *lacZ* Reportergenaktivierung der Kontrollen

Die Expression des Reportergens *lacZ* wurde bei zwei bis vier unabhängigen Transformanten durch quantitative Messung der β-Galaktosidaseaktivität festgestellt und gemittelt. Der hierbei erhaltene Wert von Hefetransformanten mit dem Gal4 Protein wurde gleich 100% gesetzt. Alle übrigen gemessenen Mittelwerte wurden auf diesen Wert bezogen.
Farbcode: natives Gal4 (Fusion aus gelben und grünem Kreis), pSV40 (rosa Oval), p53 (gemustertes Oval), pLamin C (graues Oval), AD (Aktivierungsdomäne, gelber Kreis), BD (DNA Bindedomäne, grüner Kreis)

Aus den Untersuchungen geht hervor, daß die AD und BD Proteine alleine nicht in der Lage sind beide Reportergene zu aktivieren. Eine Genaktivierung erfolgte nur als Fusion mit den p53 und SV40 Proteinen. Sie ist damit auf die Interaktion der beiden Proteine zurückzuführen. Im Gegensatz dazu interagieren die Fusionsproteine pSV40 und Lamin C nicht, da sie nicht in der Lage sind, die beiden Reportergene zu aktivieren.

Diese Ergebnisse bestätigen hiermit, daß die untersuchten Transformanten und ihre synthetisierten Proteine geeignete Kontrollen für die anschließenden Untersuchungen darstellen. Sie wurden daher in jedem durchgeführten Experiment verwendet.

3.5.1 Test der AD-und BD-Fusionsproteine auf Hintergrundaktivität

Bevor die Interaktion von zwei Fusionsproteinen getestet werden kann, muss in einem Vorversuch festgestellt werden, ob die zu testenden Fusionsproteine BD-X oder AD-Y bereits alleine in der Lage sind die Reportergene *HIS3* und *lacZ* zu aktivieren und so eine Hintergrundaktivität erzeugen können.

Würde mit den BD-X Fusionsproteinen allein eine Aktivierung der Reportergene beobachtet werden, so könnte das auf eine interne funktionelle Aktivierungsdomäne im Protein X hinweisen. Würde dagegegen mit den AD-Y Fusionsproteinen eine Aktivierung beider Reportergene beobachtet werden, so könnte das auf eine interne funktionelle DNA Bindedomäne im Protein Y hinweisen (Abbildung 18).

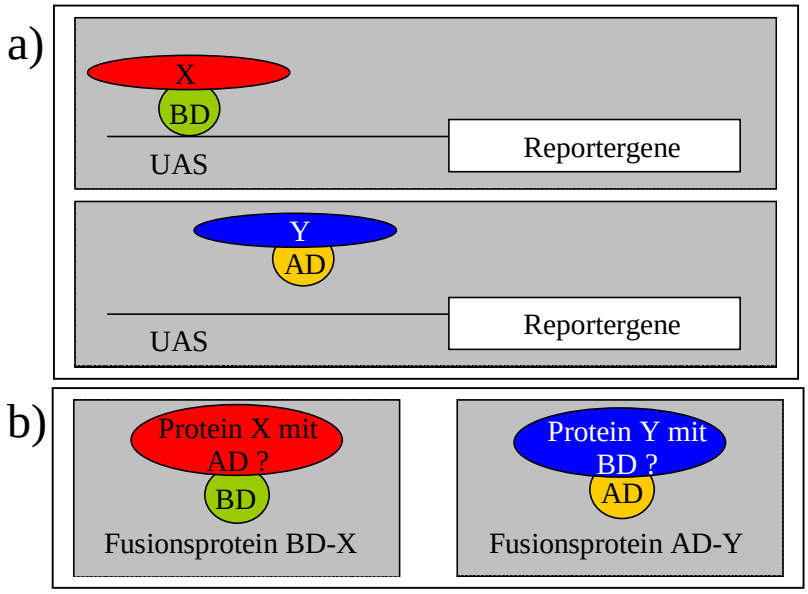

Abbildung 18: Test der Fusionsproteine auf Autoaktivierung der Reportergene

Transformanten (a), die entweder nur BD-Fusionsproteine oder AD-Fusionsproteine synthetisieren, sollten in Abwesenheit eines Intreaktionsprartners nicht in der Lage sein, die Reportergene (weiße Box) zu aktivieren.
(b) Würde mit den BD-X Fusionsproteinen eine Aktivierung der Reportergene beobachtet, so könnte das auf eine interne funktionelle Aktivierungsdomäne (AD) im Protein X hinweisen. Würde dagegegen mit den AD-Y Fusionsproteinen eine Aktivierung der Reportergene beobachtet werden, so könnte das auf eine interne funktionelle DNA Bindedomäne (BD) im Protein Y hinweisen.

Für diesen Vorversuch wurden Transformanten hergestellt die entweder nur die BD-X oder AD-Y Fusionsproteine synthetisieren (2.2.5.3). Diese Transformanten wurden zunächst auf eine Hintergrundaktivität des *HIS3* untersucht (2.2.5.1) und mit dem Wachstum der positiven und negativen Kontrollen verglichen.

Die Hintergrundaktivität von *HIS3* kann mittels Zugabe von 3-amino-triazol (3AT) in das Medium unterdrückt werden. Für jedes Fusionsprotein muss dazu die optimale Menge an 3AT ermittelt werden, da eine zu hohe Konzentration die später zu testende Interaktion zweier Proteine miteinander negativ beeinflussen kann. Zuwenig 3AT würde eventuell zu falsch positiven Nachweisen führen.

Um herauszufinden, ob die verschiedenen Fusionsproteine eine *HIS3* Hintergrundaktivität verursachen und sich diese unterdrücken lässt, wurden die entsprechenden Transformanten auf Histidinmangelmedium, mit unterschiedlichen Konzentrationen an 3AT (0 mM, 5 mM/ 15 mM/ 45 mM/ 60 mM), angezogen (Abbildung 19).

Die Transformanten der positiven Kontrolle Gal4 zeigen ein deutliches Wachstum bei Konzentrationen von 60 mM 3AT. Transformanten der positiven Kontrolle p35 + SV40 wachsen dagegen nur, wenn kein 3AT im Medium vorhanden ist (Daten nicht gezeigt). Die Transformanten der negativen Kontrollen SV40 + Lamin C und AD + BD zeigen dagegen erwartungsgemäß überhaupt kein Wachstum auf Histidinmangelmedium.

Fast alle Transformanten, die entweder AD- oder BD-Fusionsproteine enhalten, verhalten sich wie die negativen Kontrollen und zeigen bereits kein Wachstum auf Histidinmangelmedium ohne 3AT (Daten nicht gezeigt). Zwei Ausnahmen wurden beobachtet: Transformanten die BD-*R* Fusionsproteine enthalten, zeigen noch ein schwaches Wachstum auf Medium mit Konzentrationen von bis zu 5 mM 3AT. Ein besseres Wachstum wurde bei Transformanten beobachtet, die BD-*Rdel* Fusionsproteine enthalten. Sie wachsen noch schwach auf 3AT haltigem Medium mit Konzentrationen von bis zu 45 mM 3AT.

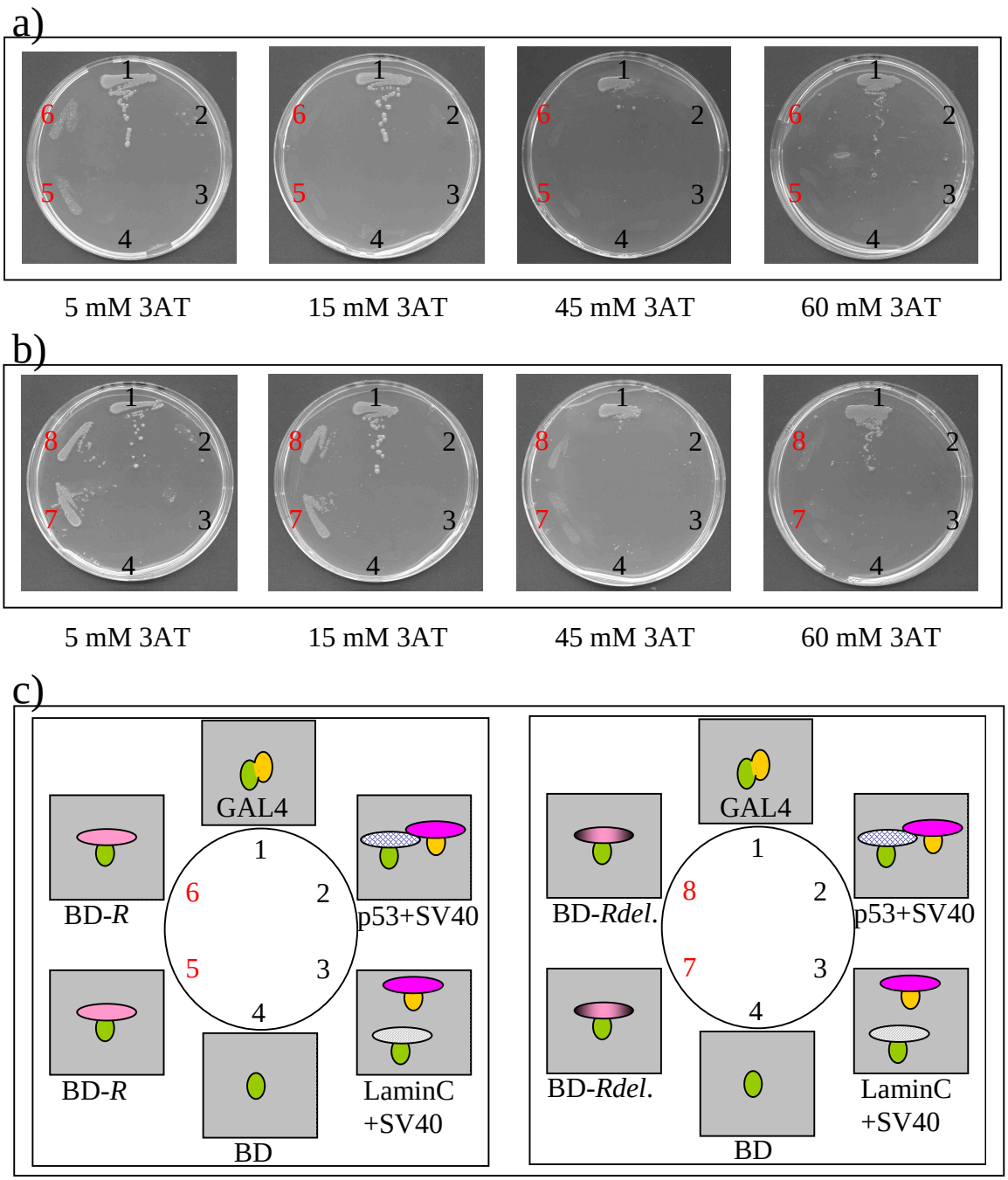

Abbildung 19: *HIS3* Reportergenaktivierung der BD-*R* und BD-*Rdel* Transformanten

(a) Die Kontrollen und die Hefetransformanten mit BD-*R* Fusionsprotein wurden auf Histidinmangelmedium mit unterschiedlich hohen Konzentrationen an 3AT (5-60 mM) angezogen.
(b) Die Kontrollen und die Hefetransformanten mit BD-*Rdel* Fusionsprotein wurden auf Histidinmangelmedium mit unterschiedlich hohen Konzentrationen an 3AT (5-60 mM) angezogen.
(c) schematische Darstellung der ausgestrichenen Hefetransformanten
Transformanten, die BD-*R* Fusionsprotein (5, 6) enthielten, zeigen ein schwaches Wachstum auf 3AT haltigem Medium mit Konzentrationen von bis zu 5 mM 3AT. Ein besseres Wachstum wurde bei Transformanten beobachtet, die BD-*Rdel* (7, 8) Fusionsproteine enthalten. Sie wachsen noch schwach auf 3AT haltigem Medium mit Konzentrationen von bis zu 45 mM 3AT. Die Transformanten der positive Kontrolle Gal4 (1) zeigen noch ein deutliches Wachstum bei Konzentrationen von 60 mM 3AT. Transformanten der positiven Kontrolle p35 + SV40 waren nicht in der Lage, bei einer Konzentration von 5mM 3AT zu wachsen.
Die Transformanten der negativen Kontrollen SV40 + Lamin C und AD + BD zeigen dagegen erwartungsgemäß überhaupt kein Wachstum auf Histidinmangelmedium.
AD (Aktivierungsdomäne, gelber Kreis) von Gal4, BD (DNA Bindedomäne, grüner Kreis) von Gal4

Aus den Untersuchungen geht hervor, daß die Aktivierung des *HIS3* Gens durch das native Gal4 Protein sehr stark ist, da die Aktivität auch durch hohe Konzentrationen von 3AT nicht vollständig gehemmt werden kann. Dagegen ist die Aktivierung von *HIS3* durch die p53 + SV40 Proteine so schwach, daß bereits geringe Konzentrationen (5mM) von 3AT für eine Unterdrückung ausreichen. Die negativen Kontrollen SV40 + Lamin C und AD + BD zeigen erwartungsgemäß kein aktives *HIS3* Reportergen.
Bis auf zwei Ausnahmen waren die synthetisierten BD- oder AD Fusionsproteine nicht in der Lage das *HIS3* Reportergen zu aktivieren. Die Ausnahmen waren die BD-*R* und BD-*Rdel* Fusionsproteine.

Die Hintergrundexpression des Reportergens *lacZ* wurde durch quantitative Messung der β-Galaktosidaseaktivität (2.2.5.5) festgestellt.
Wie bereits bei dem Nachweis der *HIS3* Aktivität beobachtet, können Transformanten mit dem BD-*Rdel*. Fusionsprotein das Reportergen besser aktivieren, als Transformanten mit dem BD-*R* Fusionsprotein (Abbildung 20). Transformanten, mit dem BD-*R* Fusionsprotein weisen eine signifikante β-Galaktosidaseaktivität von 22% auf, verglichen mit dem nativen Gal4 Protein. In Transformanten mit dem BD-*Rdel* Fusionsprotein konnte erwartungsgemäß eine signifikant höhere Aktivität von 45% gemessen werden. Diese beiden Transformantenstämme weisen damit eine höhere Aktivität auf, als die positive Kontrolle SV40 + p53, die nur eine Aktivität von 3-6 % zeigt. Bei den anderen pBD- und pAD-Transformanten wurde keine β-Galaktosidaseaktivität nachgewiesen (Abbildung 20, Abbildung 21).

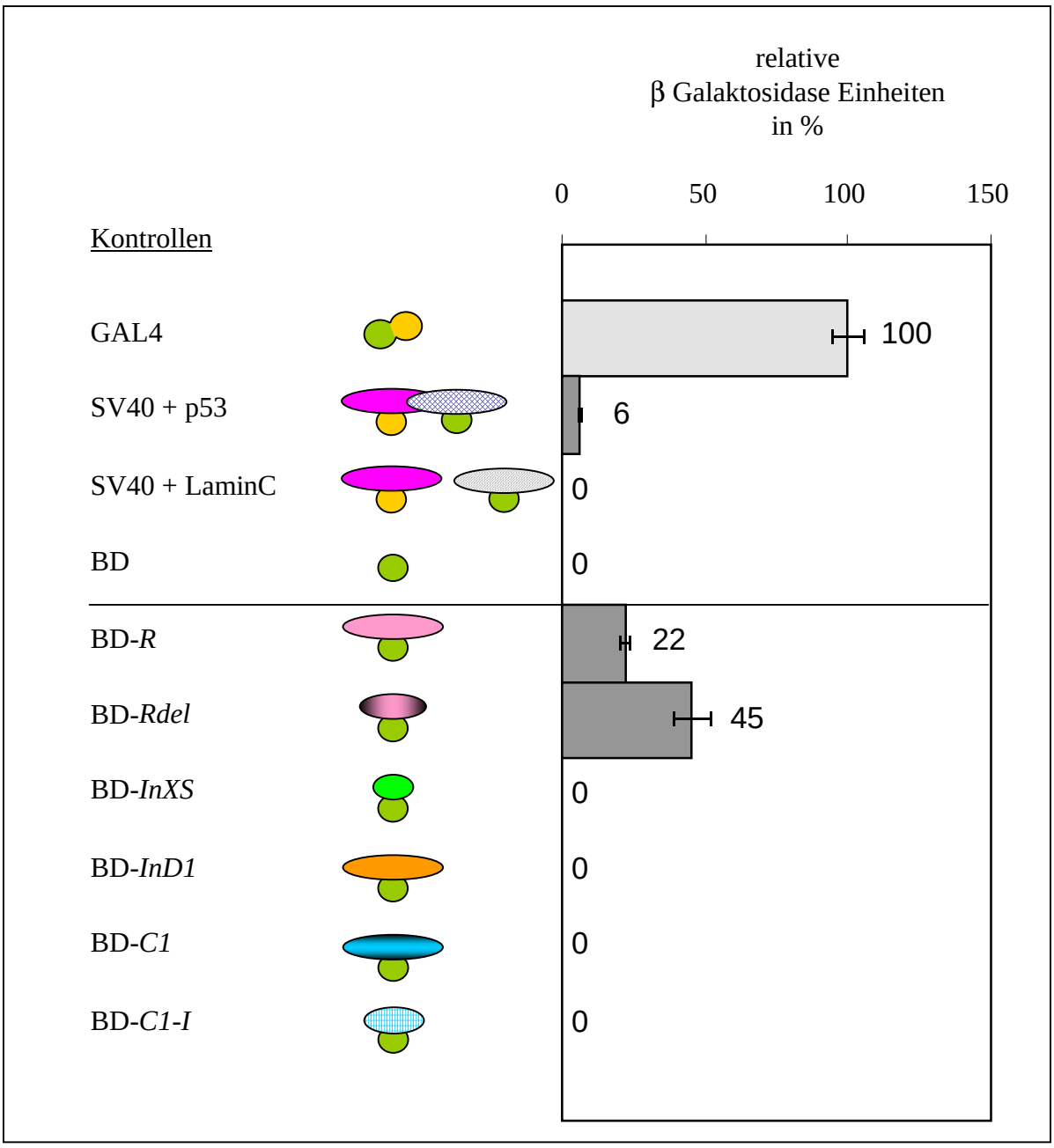

Abbildung 20: *lacZ* Hintergrundaktivität bei Transformanten mit BD-Fusionsproteinen

Die Expression des Reportergens *lacZ* wurde von zwei bis vier unabhängigen Transformanten durch quantitative Messung der β-Galaktosidaseaktivität festgestellt und gemittelt. Der hierbei erhaltene Wert von Hefetransformanten mit Gal4 Protein wurde gleich 100% gesetzt. Alle übrigen gemessenen Mittelwerte wurden auf diesen Wert bezogen.

Transformanten mit BD-*R* Fusionsprotein wiesen eine signifikante β-Galaktosidaseaktivität auf. Mit BD-*Rdel* wurde sogar eine signifikant höhere Aktivität gemessen. Sie weisen damit eine höhere Aktivität auf, als die positive Kontrolle SV40 + p53. Bei den anderen BD-Transformanten wurde keine β-Galaktosidaseaktivität detektiert.

AD von Gal4 (Aktivierungsdomäne, gelber Kreis), BD von Gal4 (DNA Bindedomäne, grüner Kreis)

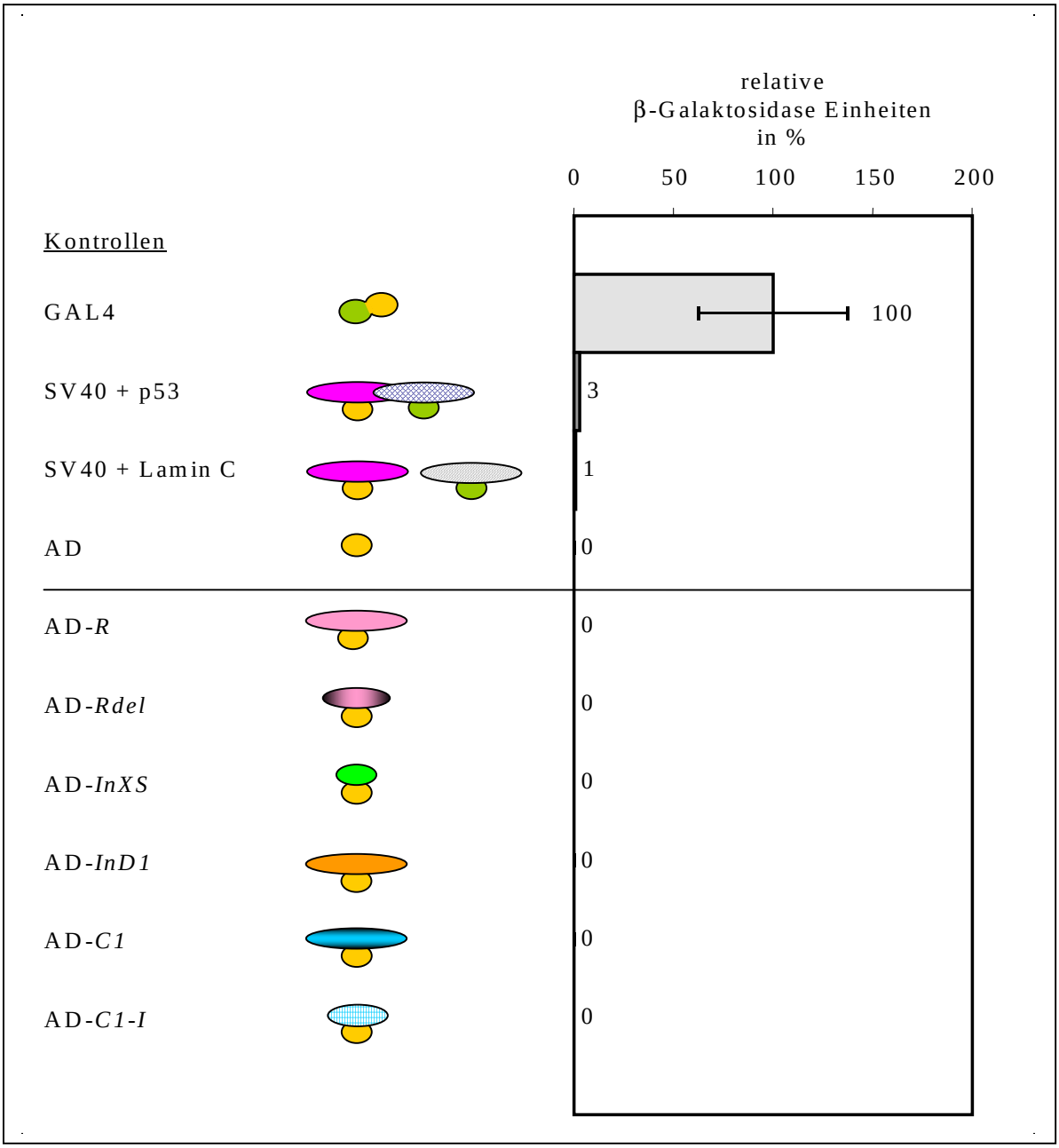

Abbildung 21: *lacZ* Hintergrundaktivität bei Transformanten mit AD-Fusionsproteinen

Die Expression des Reportergens *lacZ* wurde von zwei bis vier unabhängigen Transformanten durch quantitative Messung der β-Galaktosidaseaktivität festgestellt und gemittelt. Der hierbei erhaltene Wert von Hefetransformanten mit Gal4 Protein wurde gleich 100% gesetzt. Alle übrigen gemessenen Mittelwerte wurden auf diesen Wert bezogen.

Bei den AD-Transformanten wurde keine β-Galaktosidaseaktivität detektiert. Die in ihnen synthetisierten Fusionsproteine sind demzufolge nicht in der Lage, das *lacZ* Reportergen zu aktivieren.

AD von Gal4 (Aktivierungsdomäne, gelber Kreis), BD von Gal4 (DNA Bindedomäne, grüner Kreis)

Die Ergebnisse zur Aktivierung der Reportergene *HIS3* und *lacZ* zeigen, daß die BD-*R* und BD-*Rdel* Proteine in der Lage sind beide Reportergene zu aktivieren. Sie erzeugen dadurch einen hohen Hintergrund. Die Hintergrundaktivtät des *HIS3* könnte durch Zugabe von 3AT in das Medium unterdrückt werden, jedoch nicht die hohe *lacZ* Hintergrundaktivierung. Diese Fähigkeit zur Aktivierung könnte auf eine interne funktionierende Aktivierungsdomäne im *R* bzw *Rdel* Protein hinweisen (Abbildung 18).

Möglicherweise wird die Funktion der internen Aktivierungsdomäne, zum Beispiel aufgrund sterischer Behinderung durch die Fusion des vollständigen *R* Proteins mit der BD von Gal4, im BD-*R* Fusionsprotein unterdrückt. Mit dem verkürzten *R* Protein (*Rdel*), scheint dagegen keine sterische Behinderung vorzuliegen, da Transfomanten mit BD-*Rdel* eine stärkere Expression des *lacZ* aufweisen.

Entgegen den Erwartungen, wurde weder mit den BD-*C1* noch mit den AD-*C1* Fusionsproteinen, eine Hintergrundaktivität festgestellt. Dieses könnte auf eine veränderte Faltung des *C1* Proteins, durch die Fusion mit der AD oder BD von Gal4, zurückzuführen sein.

Es wurde vermutet, daß durch die Hintergrundaktivität von BD-*R* und BD-*Rdel* keine verläßlichen Aussagen über die Interaktion mit anderen Proteinen möglich wären. Die weitere Verwendung dieser Proteine erschien daher nicht möglich. Alle anderen getesteten Proteine zeigten keine Hintergrundaktivität und konnten für den Test auf Interaktion ohne weitere Zugabe von 3AT verwendet werden.

3.5.2 Test der Fusionsproteine auf Interaktion mit der BD oder AD von Gal4

Bevor die Interaktion von zwei Fusionsproteinen getestet werden kann, muss in einem Vorversuch festgestellt werden, ob eine Interaktion der BD-Fusionsproteine bereits nur mit der AD von Gal4 erfolgen kann und dadurch die Reportergene *HIS3* und *lacZ* aktiviert werden. Weitere Tests sollten mit dem reziproken Ansatz durchgeführt werden (Abbildung 22).

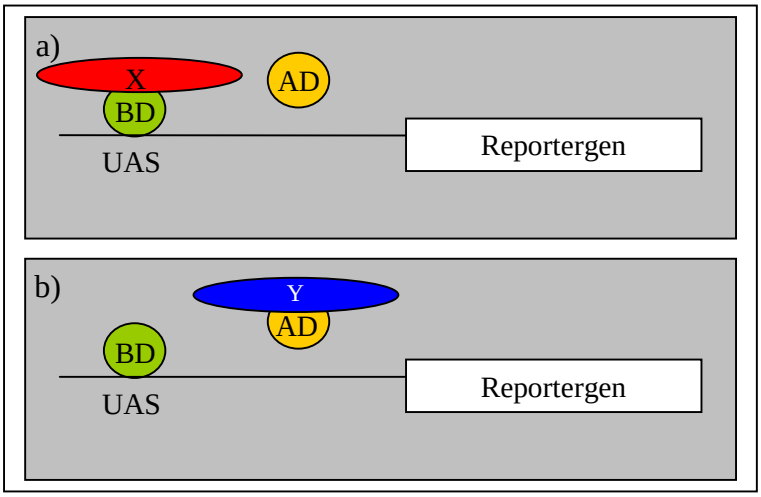

Abbildung 22: Test der Fusionsproteine auf Interaktion mit der AD oder BD von Gal4

Mit diesem Test soll festgestellt werden (a), ob eine Interaktion der Proteine X (rot) bereits nur mit der AD (Aktivierungsdomäne, gelber Kreis) von Gal4 erfolgt und dadurch die Reportergene *HIS3* und *lacZ* aktiviert werden. Des weiteren soll festgestellt werden (b), ob eine Interaktion der Proteine Y (blau) bereits nur mit der BD (Bindedomäne, grüner Kreis) von Gal4 erfolgt und dadurch beide Reportergene aktiviert werden.
Hierbei sind X und Y die auf Interaktion zu testenden Proteine.

Für diesen Versuch wurden die entsprechenden Transformanten hergestellt (2.2.5.3) und diese anschließend auf die Aktivität des *HIS3* - (2.2.5.1) und *lacZ*-Gene (2.2.5.5) untersucht. Transformanten, die BD-*R* und BD-*Rdel* Proteine synthetisieren, zeigen sowohl Wachstum auf Histidinmangelmedium als auch eine β-Galaktosidaseaktivität (Abbildung 23, Abbildung 24). Dieses ist auf die bereits beobachtete Autoaktivierung beider Reportergene durch die Proteine BD-*R* und BD-*Rdel* zurückzuführen (Abbildung 19, Abbildung 20).

Alle anderen Fusionsproteinen sind nicht in der Lage, die Reportergene zu aktivieren. Sie sind demzufolge nicht in der Lage mit der BD oder AD von Gal4 zu interagieren. Eine in späteren Versuchen detektierbare Aktivierung der Reportergene könnte daher auf eine echte Interaktion der zu testenden Proteine zurückzuführen sein.

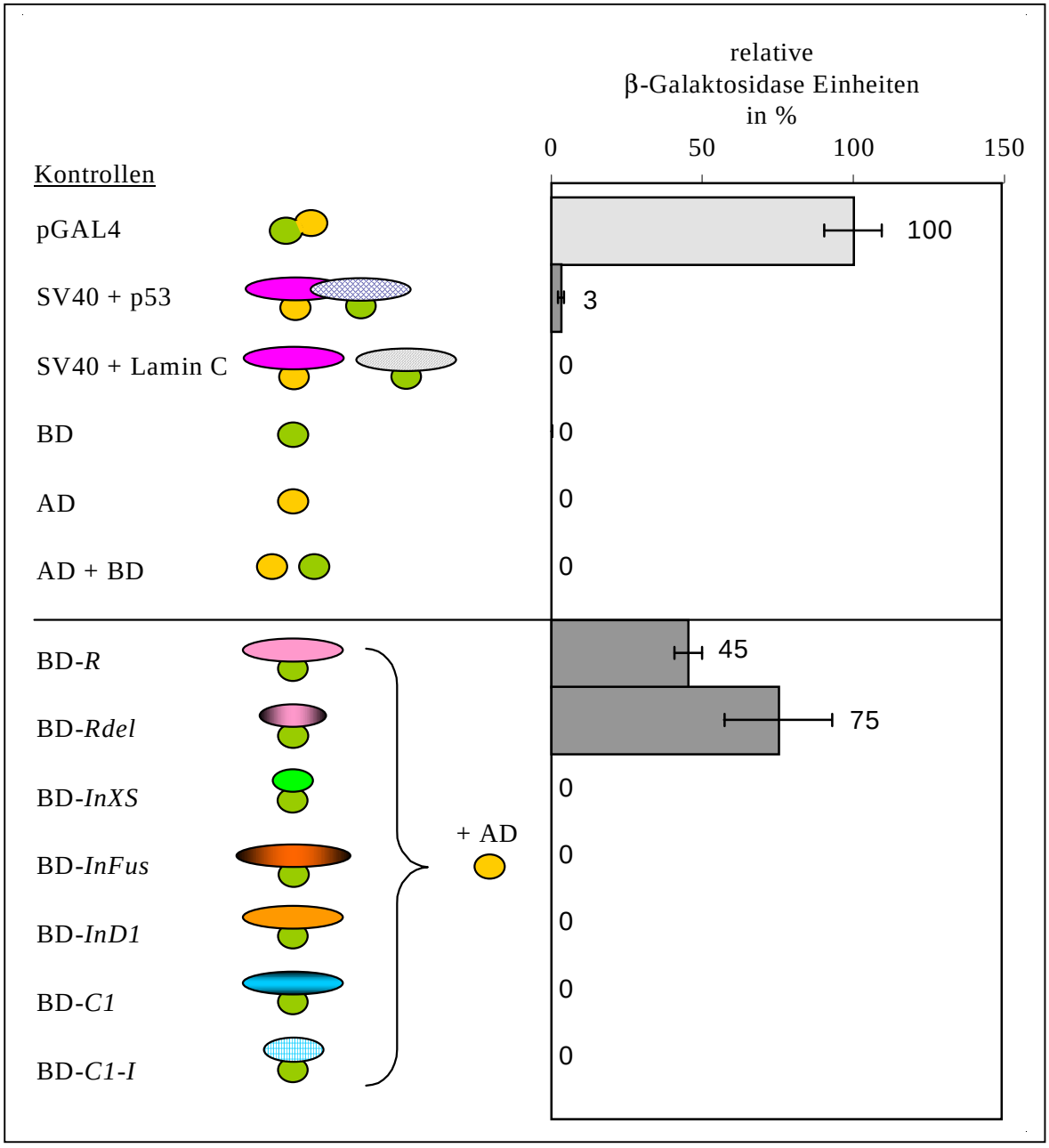

Abbildung 23: *lacZ* Reportergenaktivierung bei Transformanten mit der AD und diversen BD-Fusionsproteinen

Die Expression des Reportergens *lacZ* wurde von zwei bis vier unabhängigen Transformanten durch quantitative Messung der β-Galaktosidaseaktivität festgestellt und gemittelt. Der hierbei erhaltene Wert von Hefetransformanten mit Gal4 Protein wurde gleich 100% gesetzt. Alle übrigen gemessenen Mittelwerte wurden auf diesen Wert bezogen.

Nur die BD-*R* und BD-*Rdel* Transformanten zeigten eine β-Galaktosidaseaktivität und damit ein aktives *lacZ* Reportergen. Dieses ist auf die bereits beobachtete Hintergrundaktivierung von *HIS3* durch die Proteine BD-*R* und BD-*Rdel* zurückzuführen.

Bei den anderen Transformanten wurde keine β-Galaktosidaseaktivität nachgewiesen. Die in ihnen synthetisierten Fusionsproteine sind demzufolge nicht in der Lage, mit der AD von Gal4 zu interagieren und können demzufolge das *lacZ* Gen nicht aktivieren.
AD von Gal4 (Aktivierungsdomäne, gelber Kreis), BD von Gal4 (DNA Bindedomäne, grüner Kreis)

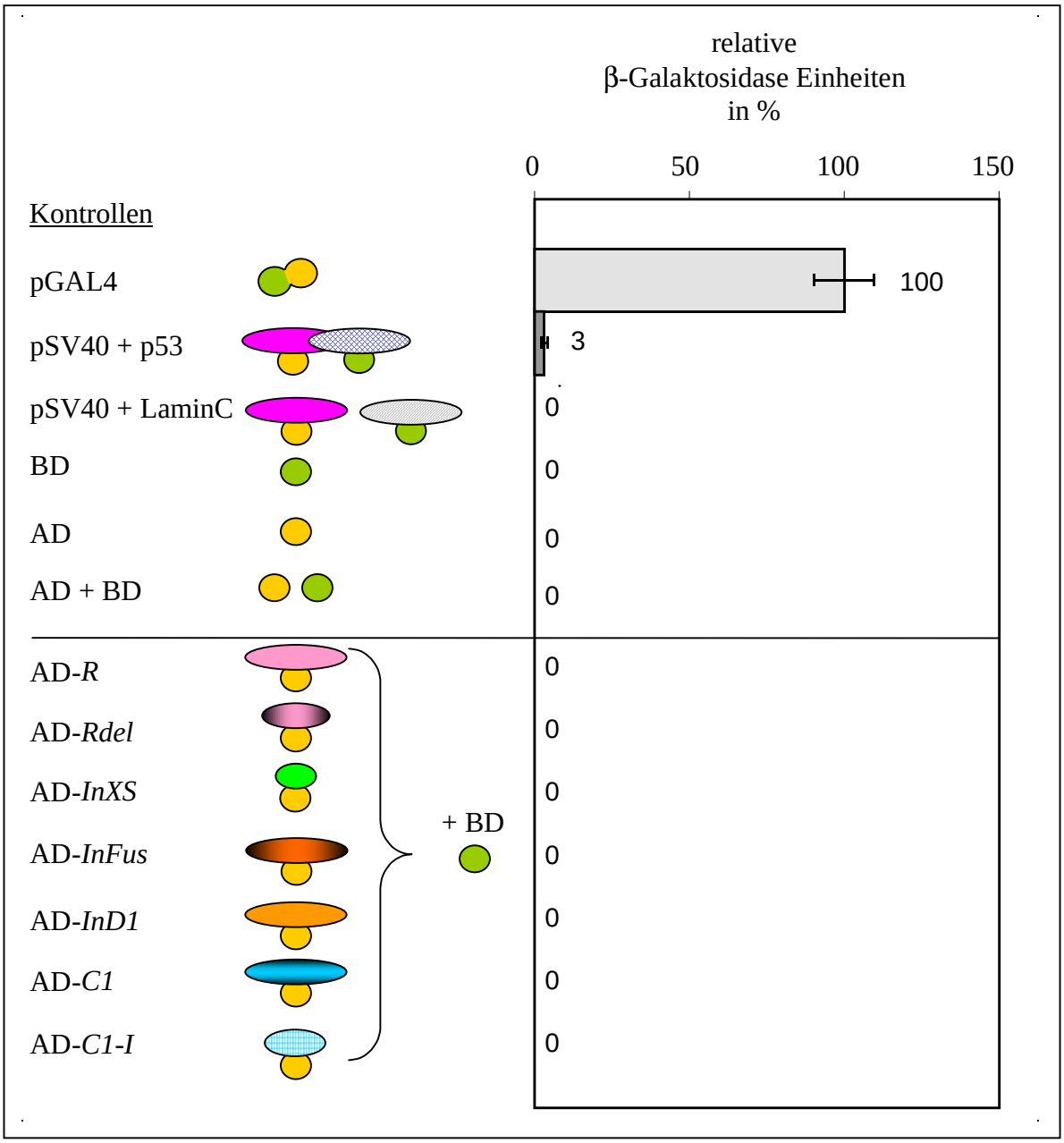

Abbildung 24: *lacZ* Reportergenaktivierung bei Transformanten mit der BD und diversen AD-Fusionsproteinen

Die Expression des Reportergens *lacZ* wurde von zwei bis vier unabhängigen Transformanten durch quantitative Messung der β-Galaktosidaseaktivität festgestellt und gemittelt. Der hierbei erhaltene Wert von Hefetransformanten mit Gal4 Protein wurde gleich 100% gesetzt. Alle übrigen gemessenen Mittelwerte wurden auf diesen Wert bezogen.

Bei den Transformanten wurde keine β-Galaktosidaseaktivität nachgewiesen. Die synthetisierten Fusionsproteine sind demzufolge nicht in der Lage, mit der AD von Gal4 zu interagieren und können demzufolge das *lacZ* Gen nicht aktivieren.

AD von Gal4 (Aktivierungsdomäne, gelber Kreis), BD von Gal4 (DNA Bindedomäne, grüner Kreis)

3.6 Test auf in vivo Interaktion der Fusionsproteine

Für die Untersuchung von *in vivo* Interaktionen sollten möglichst alle Fusionsproteine miteinander getestet werden. Aufgrund der beobachteten Reportergenaktivierung durch die Proteine pBD-*R* und pBD-*Rdel* alleine, wurde beschlossen, diese nicht zu verwenden. Da bei ihnen vermutlich nicht zwischen einer Aktivierung aufgrund einer *in vivo* Interaktion und der HIntergrundaktivierung unterschieden werden kann.

Die untersuchten Kombinationen der Fusionsproteine sind in Tabelle 5 dargestellt.

Tabelle 5: Durchgeführte Kombinationen für den Test auf *in vivo* Interaktion

		pAD-Fusionsproteine						
		AD-R	AD-*Rdel*	AD-*InXS*	AD-*InFus*	AD-*InD*1	AD-*C1*	AD-*C1-I*
pBD Fusionsproteine	BD-R							
	BD-*Rdel*							
	BD-*InXS*	X	X	X		X	X	X
	BD-*InFus*	X	X		X	X	X	X
	BD-*InD*1	X	X	X	X	X	X	X
	BD-*C1*	X	X	X	X	X	X	
	BD-*C1-I*	X	X	X	X	X		

Die BD-Fusionsproteine wurden auf Interaktion mit (fast) allen AD-Fusionsproteinen getestet. Die entsprechenden Kombinationen sind mit einem X markiert. Die ersten Untersuchungen wurden mit dem BD-*C1* Fusionsprotein in Kombination mit den verschiedenen AD-Fusionsproteinen durchgeführt (grau und fett markierte Zeile). Anschließend wurde zeilenweise fortgefahren. Die pBD-*R* und pBD-*Rdel* Proteine wurden aufgrund der beobachteten Hintergrundaktivität nicht verwendet.

Dabei wurde speziell darauf geachtet, ob es Unterschiede in dem Verhalten der Proteine als BD-Fusion oder AD-Fusion gibt (Prinzip der reziproken Kombination, Abbildung 25). Möglicherweise lässt sich eine Interaktion der Proteine X und Y nur nachweisen, wenn X mit der AD fusioniert ist, aber nicht, wenn X an die BD fusioniert ist. Der Grund hierfür wäre z.B. eine veränderte Faltung des zu untersuchenden Proteins durch die Fusion mit der AD oder BD.

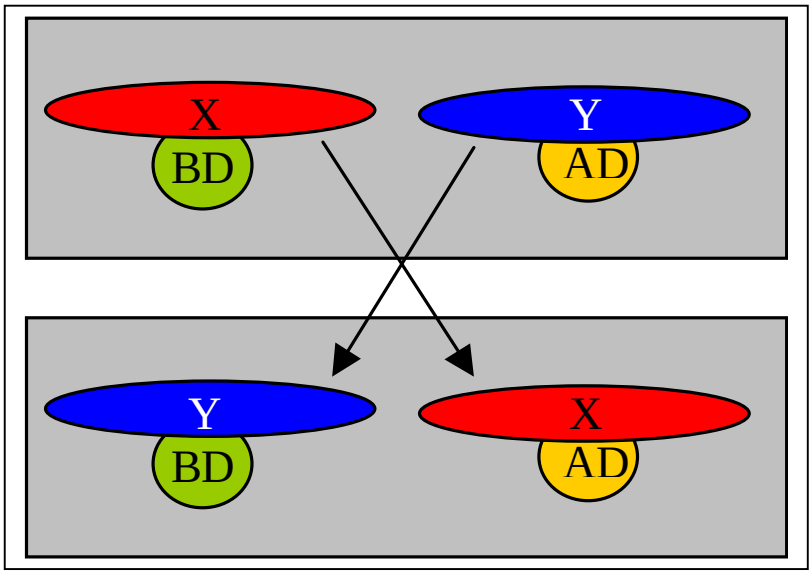

Abbildung 25: reziproke Kombination der Fusionsproteine X und Y

Transformanten, die gleichzeitig BD-Fusionsproteine und AD-Fusionsproteine synthetisieren werden auf die Reportergenaktivierung untersucht. Hierbei könnten Unterschiede festgestellt werden. Möglicherweise lässt sich eine Interaktion der Proteine X (rotes oval) und Y (blaues oval) nur nachweisen wenn X mit der AD (Aktivierungsdomäne, gelber Kreis) fusioniert ist, aber nicht wenn X an die BD (Bindedomäne, grüner Kreis) fusioniert ist. Der Grund hierfür wäre z.B. eine veränderte Faltung der zu untersuchenden Proteine in Fusion mit der AD oder BD.

Goff *et al.* (1992) konnten die *in vivo* Interaktion des *R*-homologen Proteins *B* mit dem *C1* Protein in Two Hybrid Experimenten nachweisen. Daher wurde in den Versuchsreihen der vorliegenden Arbeit mit pBD-*C1* als Interaktionspartner der *R* und *In*-Fusionsproteine begonnen (fett und grau markierte Zeile in Tabelle 5). Diese Experimente sollten zeigen, ob das System mit den hergestellten Fusionsproteinen funktioniert.

3.6.1 Transformanten mit dem BD-*C1* Fusionsprotein und diversen AD-Fusionsproteinen

(Kombinationen siehe auch Tabelle 5)

Für diesen Versuch wurden die entsprechenden Transformanten hergestellt (2.2.5.3). Diese wurden zunächst auf die Aktivität des *HIS3* Reportergens untersucht (2.2.5.1).

Transformanten, die zusätzlich zum BD-*C1* Fusionsprotein noch AD-*R*, AD-*Rdel*, AD-*InFus* oder AD-*InD*1 synthetisieren, zeigen ein deutliches Wachstum auf Histidinmangelmedium und besitzen damit ein aktives *HIS*3 Reportergen (Abbildung 26). Das Ergebnis deutet darauf hin, daß die in den Hefen synthetisierten Proteine, miteinander interagieren. Alle anderen Transformanten zeigten kein Wachstum und besitzen demzufolge kein aktives *HIS3* Reportergen.

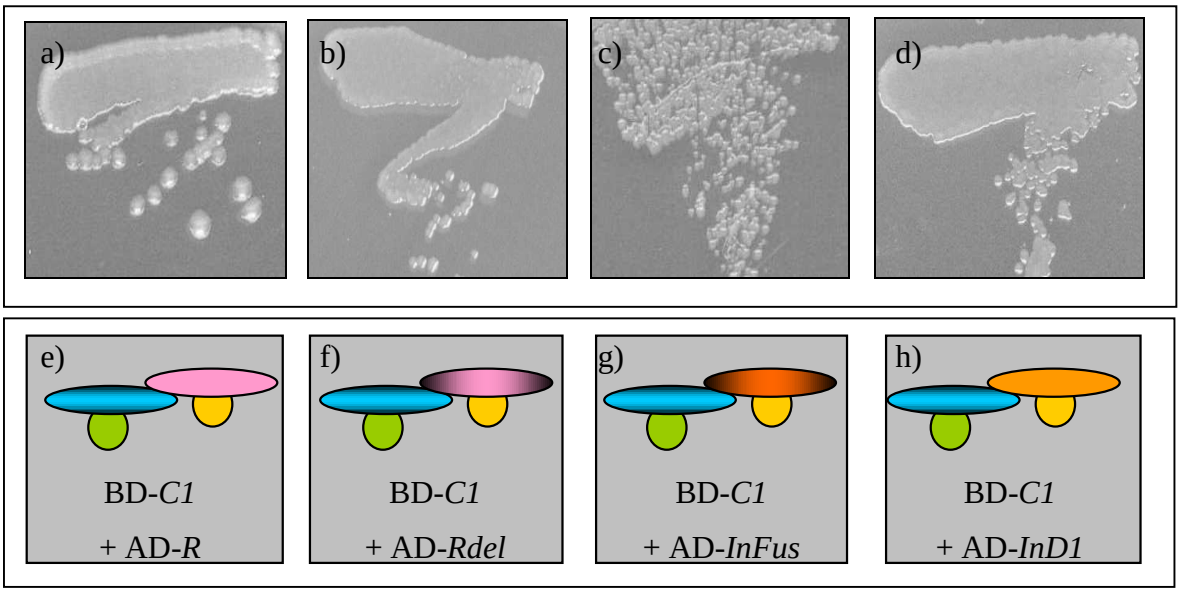

Abbildung 26: *HIS3* Reportergenaktivierung der Transformanten mit BD-*C1* Fusionsprotein und verschiedenen AD-Fusionsproteinen

Der Hefestamm YRG-2 wurde mit den verschiedenen Kontrollplasmiden transformiert. Die Transformanten wurden anschließend hinsichtlich ihres Wachstums auf Histidinmangelmedium untersucht.

Transformanten, die zusätzlich zum BD-*C1* Fusionsprotein noch das AD-*R* (a, e), AD-*Rdel* (b, f), AD-*InFus* (c, g) oder AD-*InD*1 (d, h) synthetisieren, sind in der Lage, auf Histidinmangelmedium zu wachsen. Das deutet darauf hin, daß die in den Hefen synthetisierten Proteine miteinander interagieren können und dadurch das *HIS3* Reportergen aktivieren.

(a-d) Typisches Wachstum eines ausgestrichenen Hefetransformanten auf Histidinmangelmedium.
(e-h) Schematische Darstellung der Fusionsproteine in den entsprechenden Hefetransformanten.
AD von Gal4 (Aktivierungsdomäne, gelber Kreis), BD von Gal4 (DNA Bindedomäne, grüner Kreis)

Die Expression des Reportergens *lacZ* wurde durch quantitative Messung der β-Galaktosidase untersucht (2.2.5.5).

Die Messung ergab, daß die Transformanten mit aktivem *HIS3* Reportergen auch ein aktives *lac*Z Reportergen besitzen. In Transformanten, die zusätzlich zum BD-*C1* Fusionsprotein noch AD-*R* oder AD-*Rdel* synthetisieren, wurde die stärkste β-Galaktosidaseaktivität gemessen. Sie ist bei beiden Fusionsproteinen vergleichbar und liegt bei 78-81% relativ zu der Aktivität von Gal4. Damit ist die Aktivität 27fach höher als die der positiven Kontrolle mit SV40 und p53. Transformanten, die BD-*C1* und AD-*InD*1 synthetisieren, zeigten im Vergleich zu dieser Kontrolle mit 17% eine ebenfalls stärkere β-Galaktosidaseaktivität. In Transformanten mit BD-*C1* und AD-*InFus* wurde dagegen nur eine Aktivität von 4% gemessen (Abbildung 27). Diese Expressionsaktivität ist mit derjenigen der positiven Kontrolle SV40 + p53 vergleichbar.

Bei allen anderen Transformanten wurde keine β-Galaktosidaseaktivität nachgewiesen.

Aus den Untersuchungen geht hervor, daß die Reportergene *HIS3* und *lacZ* durch die gemeinsame Expression der Fusionsproteine BD-*C1* und AD-*R* aktiviert werden. Somit ist von einer Interaktion dieser Proteine auszugehen.

Aus den Untersuchungen geht weiter hervor, daß BD-*C1* des weiteren mit AD-*Rdel*, AD-*InD1* und AD-*InFus* interagieren kann. Eine Interaktion von BD-*C1* mit AD-*InXS* scheint nicht zu erfolgen, da keines der beiden Reportergene aktiviert wurde. Aufgrund der Beobachtung, daß BD-*C1* ebenfalls mit AD-*C1* keine Reportergenaktivierung zur Folge hat, könnte vermutet werden, daß das *C1* keine Homodimere bilden kann.

Wird die Stärke der Aktivierung des lacZ Reportergens als Maß für die Stärke der Interaktion genommen, so deutet das auf eine bessere Interaktion von BD-*C1* mit AD-*R*, als BD-*C1* mit AD-*Rdel* hin. Im Vergleich hierzu, scheint die Interaktion von BD-*C1* mit AD-*InD1* oder AD-*InFus* nur sehr schwach zu sein.

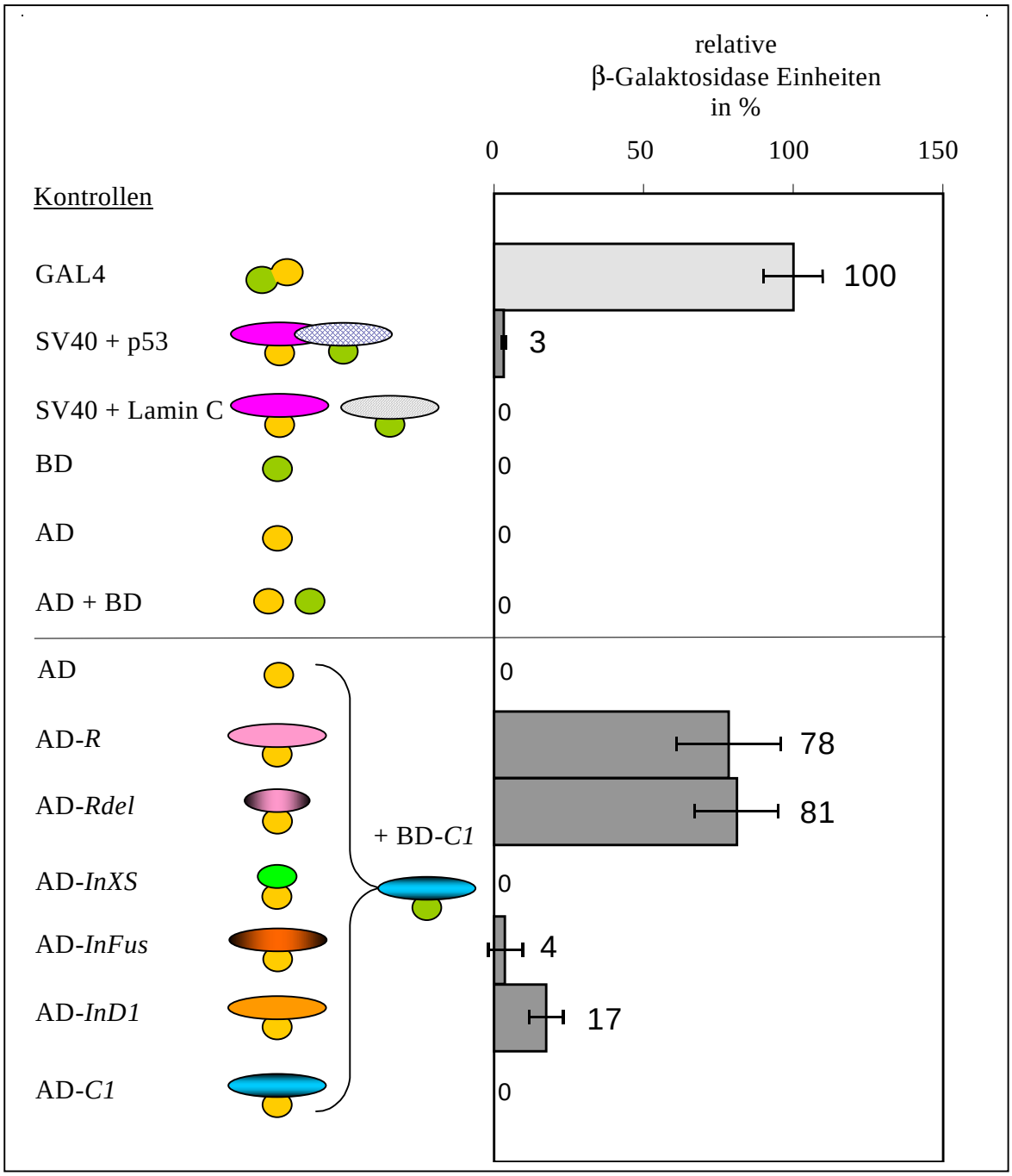

Abbildung 27: *lacZ* Reportergenaktivierung bei Transformanten mit dem BD-*C1* Fusionsprotein und verschiedenen AD-Fusionsproteinen

Die Expression des Reportergens *lacZ* wurde von zwei bis vier unabhängigen Transformanten durch quantitative Messung der β-Galaktosidaseaktivität festgestellt und gemittelt. Der hierbei erhaltene Wert von Hefetransformanten mit Gal4 Protein wurde gleich 100% gesetzt. Alle übrigen gemessenen Mittelwerte wurden auf diesen Wert bezogen.

Transformanten, die zusätzlich zum BD-*C1* Fusionsprotein die Fusionsproteine AD-*R*, AD-*Rdel*, AD-*InFus* oder AD-*InD*1 synthetisieren, zeigen eine β-Galaktosidaseaktiviät und damit ein aktives *lacZ* Reportergen. Das deutet darauf hin, daß die in den Hefen synthetisierten Proteine miteinander interagieren können. Bei den anderen Transformanten wurde keine β-Galaktosidaseaktivität nachgewiesen. Die in ihnen synthetisierten Fusionsproteine sind demzufolge nicht in der Lage, zu interagieren und können das *lacZ* Gen nicht aktivieren.

AD von Gal4 (Aktivierungsdomäne, gelber Kreis), BD von Gal4 (DNA Bindedomäne, grüner Kreis)

Die Tabelle 6 und Abbildung 28 geben eine Übersicht über die hier dargestellten Ergebnisse.

Tabelle 6: Interaktion des BD-*C1* Fusionsproteins mit verschiedenen AD-Fusionsproteinen

	AD-Fusionsproteine						
	AD-*R*	AD-*Rdel*	AD-*InXS*	AD-*InFus*	AD-*InD*1	AD-*C1*	AD-*C1-I*
BD-*C1*	+++	+++	-	+	+	-	NA

\+ Aktivierung der Reportergene *HIS*3 und *lacZ*. Die Anzahl der + gibt die Stärke an der Expression an.
\- Keine Aktivierung der Reportergene *HIS*3 und *lacZ*
NA nicht analysiert

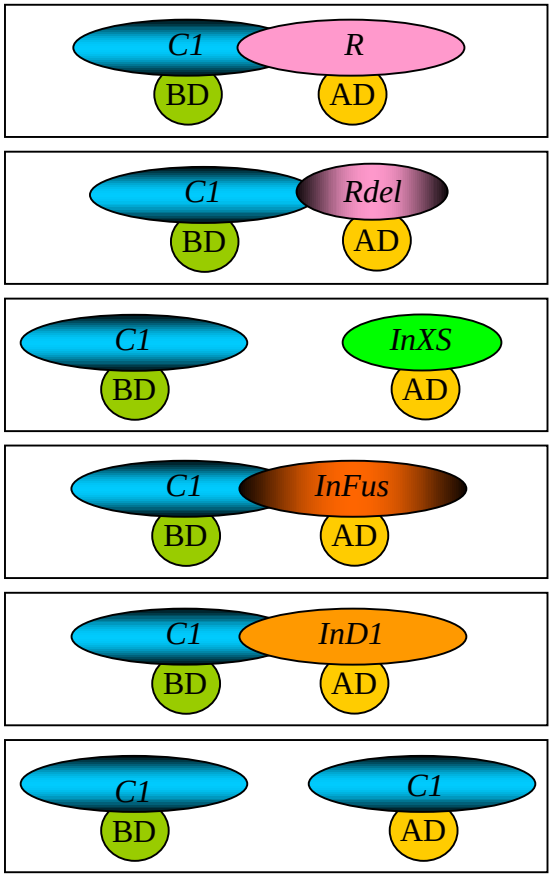

Abbildung 28: Interaktion des BD-*CI* Fusionsproteins mit verschiedenen AD-Fusionsproteinen

Die BD-*C1* Fusionsproteine, die mit den AD-Fusionsproteinen interagieren sind überlappend dargestellt. Fusionsproteine die nicht interagieren sind entfernt voneinander dargestellt. AD von Gal4 (Aktivierungsdomäne, gelber Kreis), BD von Gal4 (DNA Bindedomäne, grüner Kreis)

Anhand der hier dargestellen Ergebnisse stellte sich die Frage, ob mit der *C1* Mutante *C1-I* die gleichen Interaktionspartner und Interaktionsstärken nachgewiesen werden können oder ob es Unterschiede gibt. Das *C1-I* Protein besitzt, im Gegensatz zu *C1*, keine endogene Aktivierungsdomäne.

3.6.2 Transformanten mit dem BD-*C1-I* Fusionsprotein und verschiedenen AD-Fusionsproteinen

(Kombinationen siehe auch Tabelle 5)

Für diesen Versuch wurden die entsprechenden Transformanten hergestellt (2.2.5.3). Diese wurden zunächst auf die Aktivität des *HIS3* Reportergens untersucht (2.2.5.1).

Transformanten, die zusätzlich zum BD-*C1-I* Fusionsprotein noch AD-*R*, AD-*Rdel*, AD-*InFus* oder AD-*InD1* synthetisieren, zeigten ein deutliches Wachstum auf Histidinmangelmedium und besitzen damit ein aktives *His*3 Reportergen (Abbildung 29). Das Ergebnis deutet darauf hin, daß die in den Hefen synthetisierten Proteine, miteinander interagieren. Alle anderen Transformanten zeigten kein Wachstum und besitzen demzufolge kein aktives *HIS3* Reportergen.

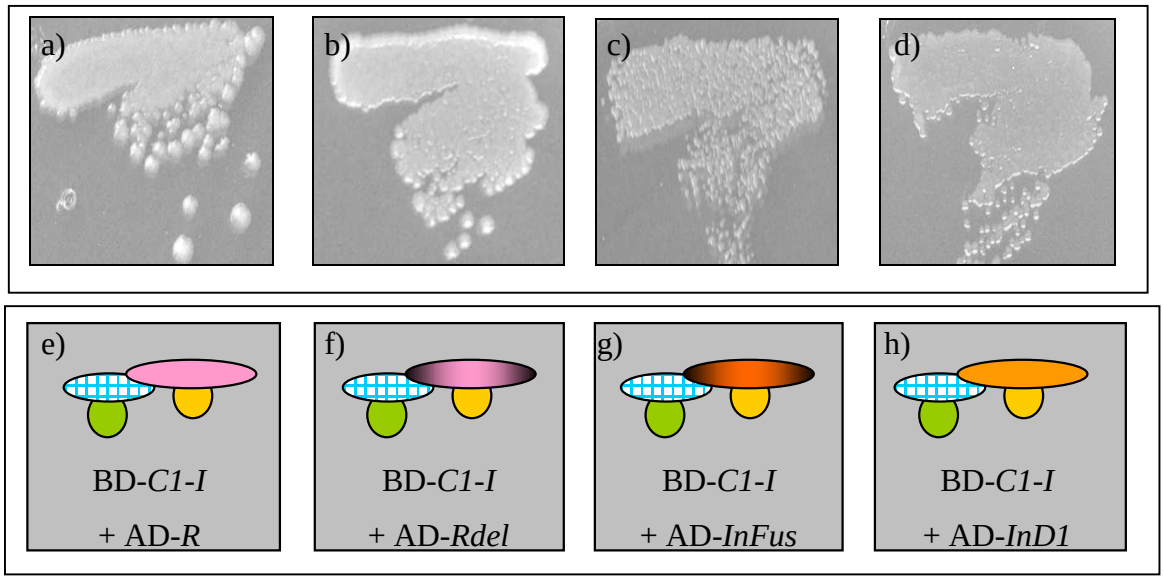

Abbildung 29: *HIS3* Reportergenaktivierung der Transformanten mit dem BD-*C1-I* Fusionsprotein und verschiedenen AD-Fusionsproteinen

Der Hefestamm YRG-2 wurde mit den verschiedenen Kontrollplasmiden transformiert. Die Transformanten wurden anschließend hinsichtlich ihres Wachstums auf Histidinmangelmedium untersucht.

Transformanten, die zusätzlich zum BD-*C1-I* Fusionsprotein noch AD-*R* (a, e), AD-*Rdel* (b, f), AD-*InFus* (c, g) oder AD-*InD*1 (d, h) synthetisieren, sind in der Lage auf Histidinmangelmedium zu wachsen. Das deutet darauf hin, daß die in den Hefen synthetisierten Proteine miteinander interagieren können und dadurch das *HIS3* Reportergen aktivieren.

(a-d) Typisches Wachstum eines ausgestrichenen Hefetransformanten auf Histidinmangelmedium.
(e-h) Schematische Darstellung der Fusionsproteine in den entsprechenden Hefetransformanten.
AD von Gal4 (Aktivierungsdomäne, gelber Kreis), BD von Gal4 (DNA Bindedomäne, grüner Kreis)

Die Expression des Reportergens *lacZ* wurde durch quantitative Messung der β-Galaktosidaseaktivität untersucht (2.2.5.5).

Die Messung ergab, daß die Transformanten mit aktivem *HIS3* Reportergen, auch ein aktives *lac*Z Reportergen besitzen. In Transformanten, die zusätzlich zum BD-*C1* Fusionsprotein noch AD-*R* oder AD-*Rdel* synthetisieren, wurde ebenfalls eine signifikante Aktivität der β-Galaktosidase gemessen.

Die Expressionsstärke des *lacZ* Reportergens unterscheidet sich wesentlich von der bei Transformanten mit BD-*C1*. Bei Transformanten mit BD-***C1*** und AD-*R* oder AD-*Rdel* wurde eine β-Galaktosidaseaktivität von 78-81%, relativ zu der Aktivität von pGal4, gemessen. Im Vergleich dazu wurde, mit BD-*C1-I* und AD-*R*, nur etwa halb soviel Aktivität nachgewiesen. Diese betrug 43% relativ zu der Aktivität von pGal4.

Mit pBD-*C1-I* und pAD-*Rdel* wurde sogar eine noch geringere Aktivität gemessen. Mit BD-*C1-I* und AD-*Rdel* wurde im Vergleich dazu, nur etwa ein Viertel der Aktivität (22%) gemessen.

Auch die Kombination von BD-*C1-I* mit AD-*InD*1 zeigte mit nur 11% relativ zu der Aktivität von pGal4, eine reduzierte β-Galaktosidaseaktivität. Mit BD-***C1*** und AD-*InD*1 wurde dagegen eine Aktivität von 17 % gemessen.

Mit BD-*C1-I* und AD-*InFus* wurden, im Vergleich zu BD-***C1*** und AD-*InFus*, keine signifikanten Unterschiede festgestellt.

Bei den AD-*InXS* Transformanten wurde keine β-Galaktosidaseaktivität detektiert.

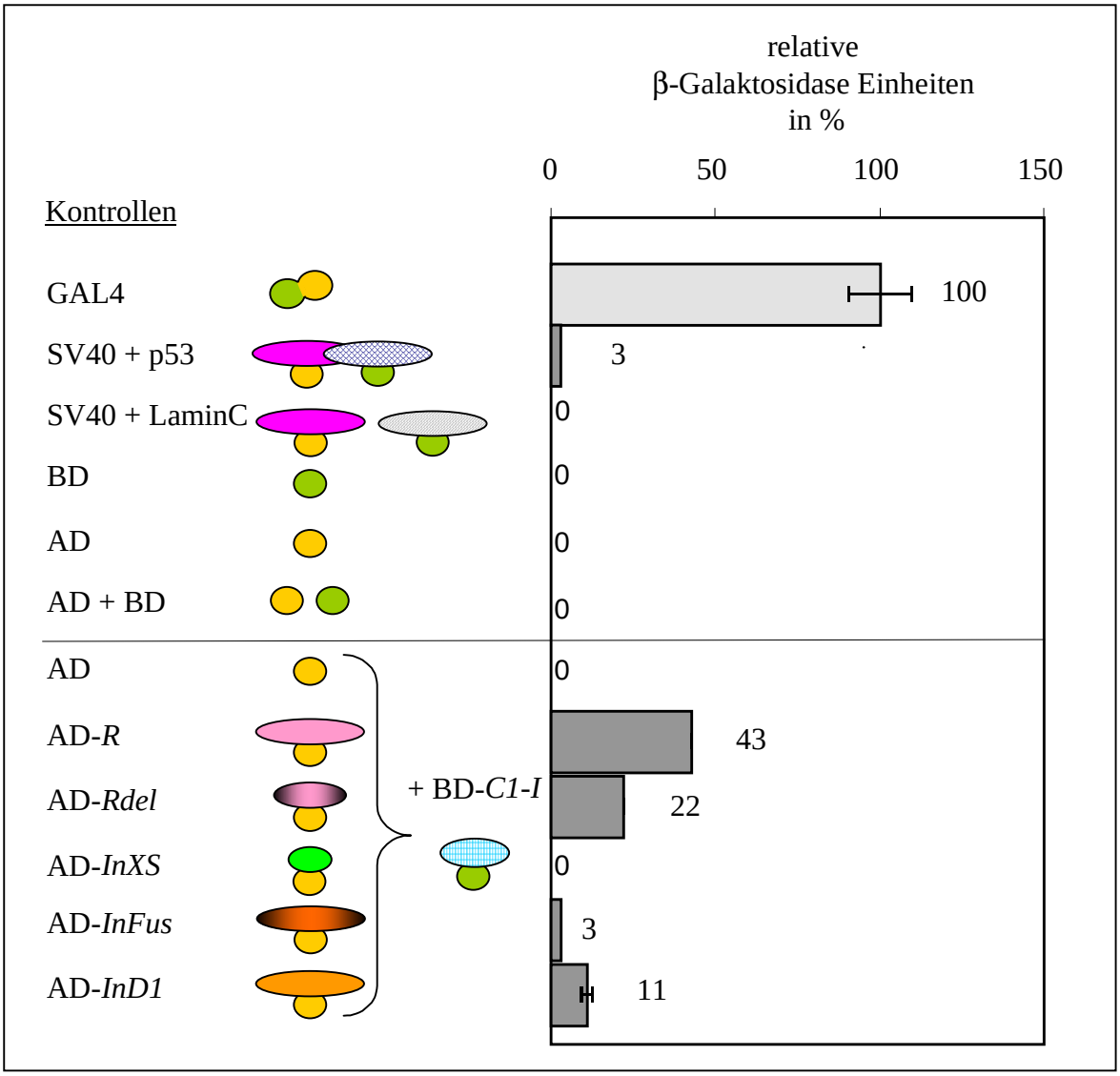

Abbildung 30: *lacZ* Reportergenaktivierung bei Transformanten mit dem BD-*C1-I* Fusionsprotein und verschiedenen AD-Fusionsproteinen

Die Expression des Reportergens *lacZ* wurde von zwei bis vier unabhängigen Transformanten durch quantitative Messung der β-Galaktosidaseaktivität festgestellt und gemittelt. Der hierbei erhaltene Wert von Hefetransformanten mit Gal4 Protein wurde gleich 100% gesetzt. Alle übrigen gemessenen Mittelwerte wurden auf diesen Wert bezogen.

Transformanten, die zusätzlich zum BD-*C1-I* Fusionsprotein die Fusionsproteine AD-*R*, AD-*Rdel*, AD-*InFus* oder AD-*InD1* synthetisieren, zeigen eine β-Galaktosidaseaktiviät. Das Ergebnis deutet darauf hin, daß die in den Hefen synthetisierten *C1-I* Proteine mit den gleichen Proteinen, wie ***C1*** interagieren können und dadurch das *lacZ* Reportergen aktivieren. Die Stärke der Aktivierung unterscheidet sich jedoch zwischen BD-*C1-I* und BD-***C1***. Mit BD-***C1*** wurde, bis auf AD-*InFus*, eine verstärkte β-Galaktosidaseaktivität gemessen (Abbildung 27).
Alle anderen Transformanten zeigen keine β-Galaktosidaseaktivität und besitzen demzufolge kein aktives *lacZ* Reportergen.

AD von Gal4 (Aktivierungsdomäne, gelber Kreis), BD von Gal4 (DNA Bindedomäne, grüner Kreis)

Diese Ergebnisse zeigen, daß BD-*C1-I* mit den gleichen Proteinen wie BD-***C1*** interagieren kann. Hierbei wurden jedoch Unterschiede in der Stärke der Aktivierung des *lacZ* Reportergens beobachtet. Wird die Stärke der Aktivierung als Maß für die Stärke der Interaktion genommen, so deuten die Ergebnisse auf eine bessere Interaktion der entsprechenden Proteine mit BD-*C1*, als mit BD-*C1-I*, hin. Des weiteren scheinen BD-*C1* und BD-*C1-I* mit AD-*InFus* nur sehr schwach zu interagieren.

Die Tabelle 7 und Abbildung 31 geben eine Übersicht über die hier vorgestellten Ergebnisse.

Tabelle 7: Interaktion des BD-*C1-I* Fusionsproteins mit verschiedenen AD-Fusionsproteinen

	AD-Fusionsproteine						
	AD-*R*	AD-*Rdel*	AD-*InXS*	AD-*InFus*	AD-*InD1*	AD-*C1*	AD-*C1-I*
BD-*C1-I*	++	++	-	+	+	NA	NA

\+ Aktivierung der Reportergene *HIS*3 und *lacZ*. Die Anzahl der + gibt die Stärke an der Expression an.
- Keine Aktivierung der Reportergene *HIS*3 und *lacZ*
NA nicht analysiert

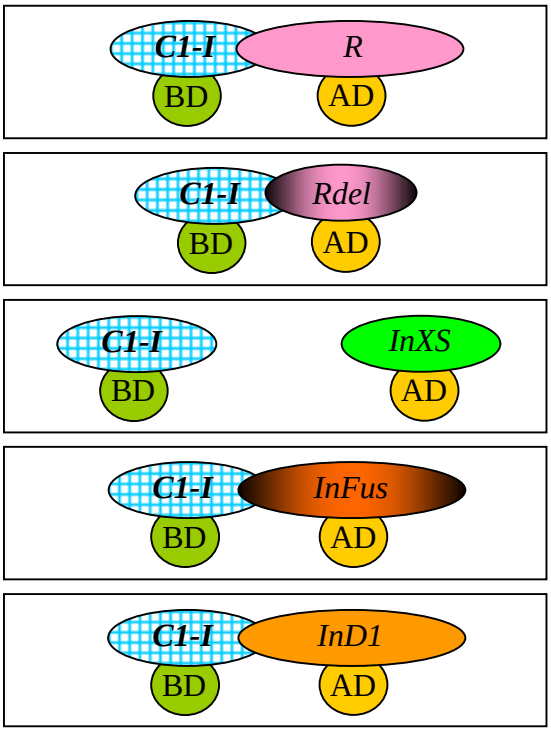

Abbildung 31: Interaktion des BD-*C1-I* Fusionsproteins mit verschiedenen AD-Fusionsproteinen

Die BD-*C1-I* Fusionsproteine, die mit den AD-Fusionsproteinen interagieren sind überlappend dargestellt. Fusionsproteine die nicht interagieren sind entfernt voneinander dargestellt. AD (Aktivierungsdomäne, gelber Kreis), BD (DNA Bindedomäne, grüner Kreis)

Mit AD-*InXS* wurde weder mit BD-*C1* noch mit BD-*C1-I* eine Interaktion nachgewiesen. Dies könnte auf eine veränderte Faltung des AD-*InXS* zurückzuführen sein. Daher wurden Experimente durchgeführt, bei denen das BD-*InXS* Fusionsprotein verwendet wurde.

3.6.3 Transformanten mit dem BD-*InXS* Fusionsprotein und verschiedenen AD-Fusionsproteinen

(Kombinationen siehe auch Tabelle 5)

Für diesen Versuch wurden die entsprechenden Transformanten hergestellt (2.2.5.3) und anschließend auf die Aktivitäten der Reportergene *HIS3* (2.2.5.1) und *lacZ* untersucht (2.2.5.5). Als zusätzliche positive Kontrolle wurden Transformanten verwendet, die BD-*C1* und AD-*R* Fusionsproteine synthetisieren. Die Reportergene werden mit diesen Proteinen stärker aktiviert, als mit den zuvor als positive Kontrollen SV40 + p53. Deshalb sind diese Proteine als Kontrollen besser geeignet. Dieser Test wurde an einem Zeitpunkt durchgeführt, an dem der Fusionsklon *InFus* noch nicht vorlag. Er fehlt daher in dieser Analyse.

Bei den Transformanten wurde weder ein Wachstum auf Histidinfreiem Medium festgestellt, noch wurde eine β-Galaktosidaseaktivität festgestellt. Beim quantitativen Nachweis der β-Galaktosidaseaktivität wurde, im Vergleich zu einem vorangegangenen Versuch (Abbildung 27), eine sehr viel niedrigere Aktivität der positiven Kontrolle BD-*C1*+AD-*R* nachgewiesen. Sie betrug nur noch etwa ein Fünftel, d.h. etwa 15% statt der früher gemessenen 75%., relativ zu der Aktivität von pGal4. Die Ursache hierfür war eine veränderte Reportergenaktivität bei den Transformanten, die Gal4 Proteine synthetisieren. Die Messung der β-Galaktosidaseaktivität in diesen Transformanten mit nativen Gal4 Protein, zeigte einen um das fünffache erhöhten Wert (ca. 200 relative Einheiten), im Vergleich zu den vorrangegangenen Experimenten (ca. 30-50 relative Einheiten). Dagegen blieb die β-Galaktosidaseaktivität in den Transformanten mit BD-*C1* + AD-*R* (ca. 25-30 relative Einheiten) und SV40 + p53 (ca. 1- 3 relative Einheiten) verglichen mit den früheren Experimenten nahezu identisch.

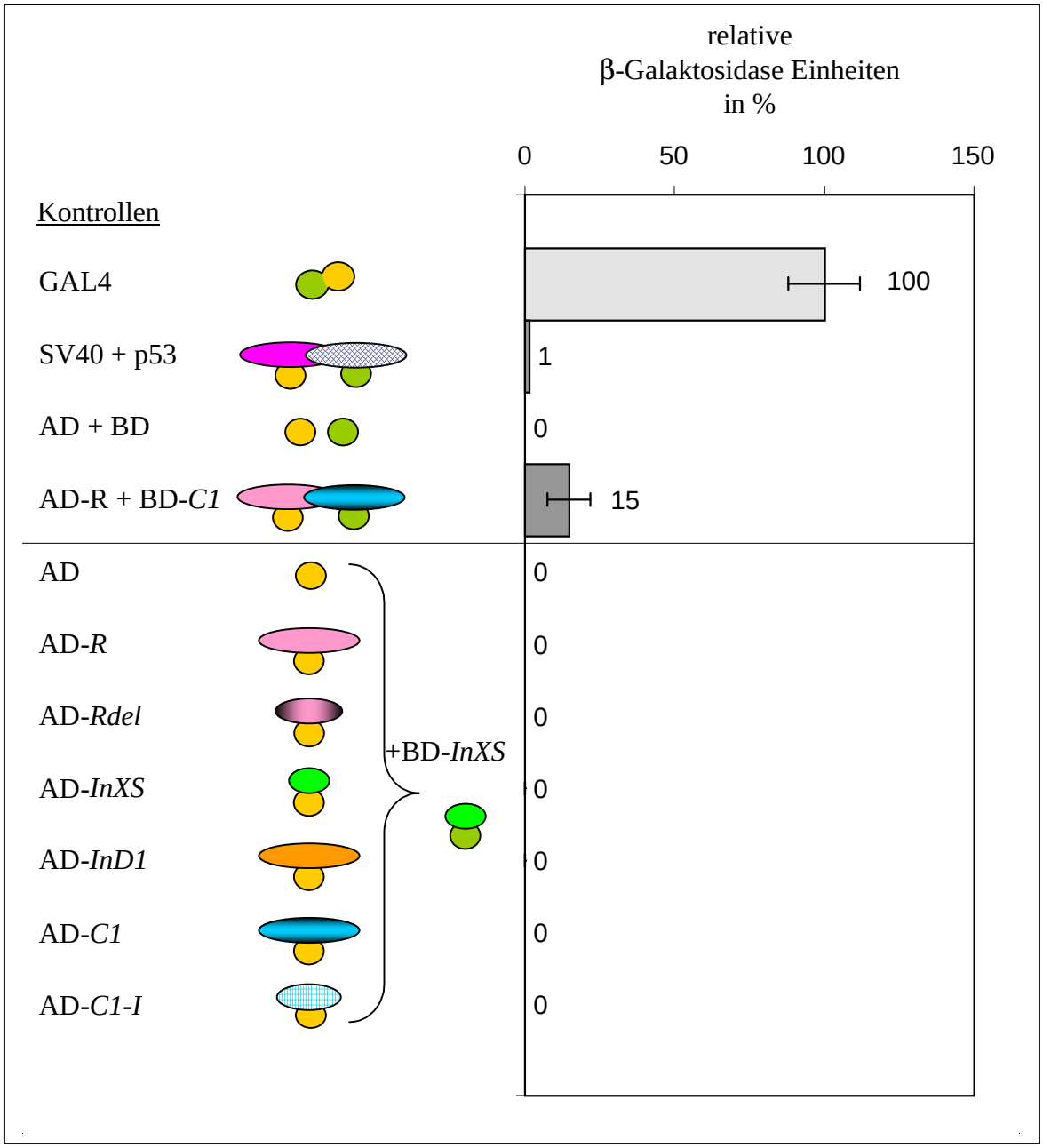

Abbildung 32: *lacZ* Reportergenaktivierung bei Transformanten mit dem BD-*InXS* Fusionsprotein und verschiedenen AD-Fusionsproteinen

Die Expression des Reportergens *lacZ* wurde von zwei bis vier unabhängigen Transformanten durch quantitative Messung der β-Galaktosidaseaktivität festgestellt und gemittelt. Der hierbei erhaltene Wert von Hefetransformanten mit Gal4 Protein wurde gleich 100% gesetzt. Alle übrigen gemessenen Mittelwerte wurden auf diesen Wert bezogen.

Transformanten die BD-*InXS* Fusionsproteine zusammen mit einem AD-Fusionsprotein synthetisieren, zeigen keine β-Galaktosidaseaktivität. In diesen Hefestämmen wurde das *lacZ* Reportergen nicht aktiviert. Das deutet darauf hin, daß die in den Hefen synthetisierten Proteine nicht miteinander interagieren können.

AD von Gal4 (Aktivierungsdomäne, gelber Kreis), BD von Gal4 (DNA Bindedomäne, grüner Kreis)

Aus den Untersuchungen zur Aktivierung der Reportergene *HIS3* und *lacZ* läßt sich schließen, daß BD-*InXS* weder mit AD-*C1*, AD-*C1*I, AD-R, AD-*Rdel* noch mit AD-*InD*1 interagieren kann. Aufgrund der Beobachtung, daß BD-*InXS* zusammen mit AD-*InXS* keine Reportergene aktiviert, kann abgeleitet werden, daß *InXS* keine Homodimere bilden kann.

Die Tabelle 8 und Abbildung 33 geben eine Übersicht über die hier dargestellten Ergebnisse.

Tabelle 8: Interaktion des BD-*InXS* Fusionsprotein mit verschiedenen AD-Fusionsproteinen

	AD Fusionsproteine						
	AD-*R*	AD-*Rdel*	AD-*InXS*	AD-*InFus*	AD-*InD1*	AD-*C1*	AD-*C1-I*
BD-*InXS*	-	-	-	NA	-	-	-

\+ Aktivierung der Reportergene *HIS*3 und *lacZ*. Die Anzahl der + gibt die Stärke an der Expression an.
\- Keine Aktivierung der Reportergene *HIS*3 und *lacZ*
NA nicht analysiert

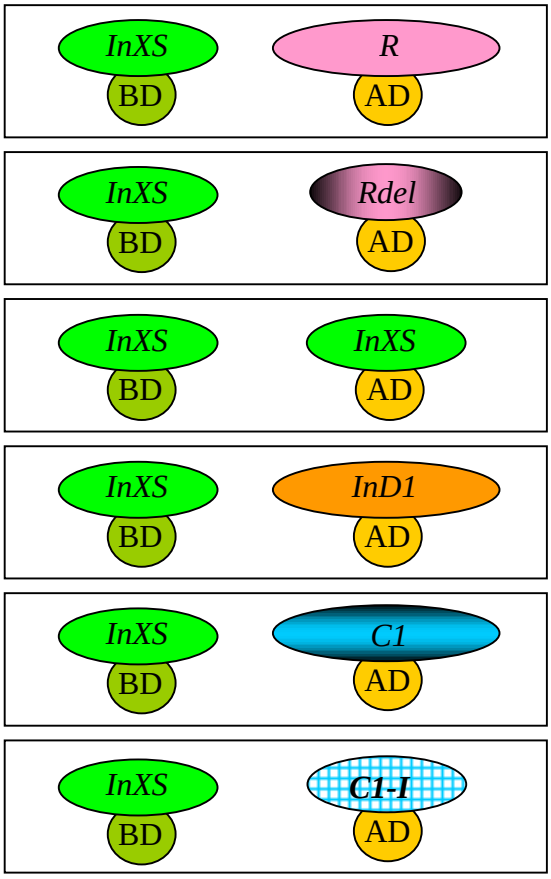

Abbildung 33: Interaktion des BD-*InXS* Fusionsprotein mit verschiedenen AD-Fusionsproteinen

Die BD-*InXS* Fusionsproteine, die mit den AD-Fusionsproteinen interagieren sind überlappend dargestellt. Fusionsproteine die nicht interagieren sind entfernt voneinander dargestellt. AD von Gal4 (Aktivierungsdomäne, gelber Kreis), BD von Gal4 (DNA Bindedomäne, grüner Kreis)

Das putative *InXS* Protein enthält, im Vergleich zum vollständigen *In* Protein mit 685 Aminosäuren, nur 147 Aminosäuren. Möglicherweise ist das *InXS* Protein für eine Interaktion zu klein und enthält nicht alle hierfür benötigten Aminosäuren.

Die Interaktion der größeren Proteine *InFus* und *InD*1 (als AD-Fusionsproteine) mit *C1* und *C1-I* (als BD-Fusionsproteine) konnte bereits nachgewiesen werden. Es stellte sich die Frage, ob diese Interaktion auch im reziproken Ansatz nachzuweisen ist (Abbildung 25). Hierzu wurden die Fusionsproteine BD-*InFus* und BD-*InD*1 getestet. Des weiteren sollte hiermit untersucht werden, ob BD-*InFus* oder BD-*InD1* in der Lage sind, mit AD-*R* zu interagieren.

3.6.4 Transformanten mit dem BD-*InFus* Fusionsprotein und verschiedenen AD-Fusionsproteinen

(Kombinationen siehe auch Tabelle 5)

Für diesen Versuch wurden die entsprechenden Transformanten hergestellt (2.2.5.3). Diese wurden zunächst auf die Aktivität des *HIS3* Reportergens untersucht (2.2.5.1).

Nur bei Transformanten, die zusätzlich zum BD-*InFus* Fusionsprotein noch das AD-*C1-I* Fusionsproteine synthetisieren, konnte ein aktives *HIS3* Reportergen festgestellt werden, da sie die einzigen waren, die ein Wachstum auf Histidinmangelmedium zeigten (Abbildung 26). Es wurde weder bei Transformanten mit BD-*InFus*, noch bei Transformanten mit AD-*C1* ein Wachstum beobachtet. Mit dem reziproken Ansatz dieser Kombination wurden in den unter 3.6.1 dargestellten Versuchen entgegengesetzte Ergebnisse erhalten. Dort wurde bei Transformanten, die zusätzlich zum **AD**-*InFus* das BD-*C1* synthetisieren, ein aktives *HIS3* nachgewiesen (Abbildung 26).

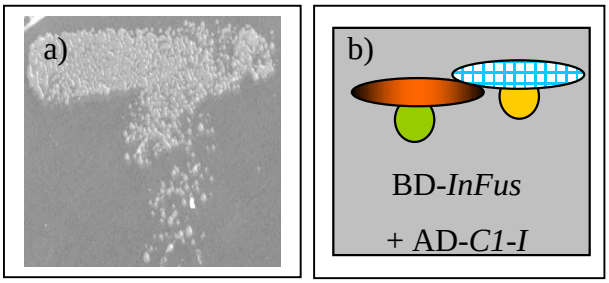

Abbildung 34: *HIS3* Reportergenaktivierung der Transformanten mit BD-*InFus* Fusionsprotein und verschiedenen AD-Fusionsproteinen

Der Hefestamm YRG-2 wurde mit den verschiedenen Kontrollplasmiden transformiert. Die Transformanten wurden anschließend hinsichtlich ihres Wachstums auf Histidinmangelmedium untersucht.

Bei Transformanten, die zusätzlich zum BD-*InFus* noch das AD-*C1-I* synthetisieren (a, bI), waren in der Lage auf Histidinmangelmedium zu wachsen und besitzen damit ein aktives *HIS3* Reportergen. Das deutet darauf hin, daß die in den Hefen synthetisierten Proteine miteinander interagieren können und dadurch das *HIS3* Reportergen aktivieren. Im reziproken Ansatz wurde dagegen bei Transformanten mit **BD**-*C1* und **AD**-*InFus* Fusionsproteinen ein aktives *HIS3* Reportergen beobachtet (Abbildung 26).

(a) Typisches Wachstum eines ausgestrichenen Hefetransformanten auf Histidinmangelmedium.
(b) Schematische Darstellung der Fusionsproteine in den entsprechenden Hefetransformanten.
AD von Gal4 (Aktivierungsdomäne, gelber Kreis), BD von Gal4 (DNA Bindedomäne, grüner Kreis)

Die Expression des Reportergens *lacZ* wurde durch quantitative Messung der β-Galaktosidase untersucht (2.2.5.5). Die Messung ergab, daß die Transformanten mit aktivem *HIS3* Reportergen auch ein aktives *lacZ* Reportergen besitzen. Es wurde hierbei nur eine sehr geringe β-Galaktosidaseaktivität nachgewiesen. Diese betrug ca. 1% % relativ zu der Aktivität von Gal4. (Abbildung 35). Bei allen anderen Transformanten wurde keine β-Galaktosidaseaktivität nachgewiesen.

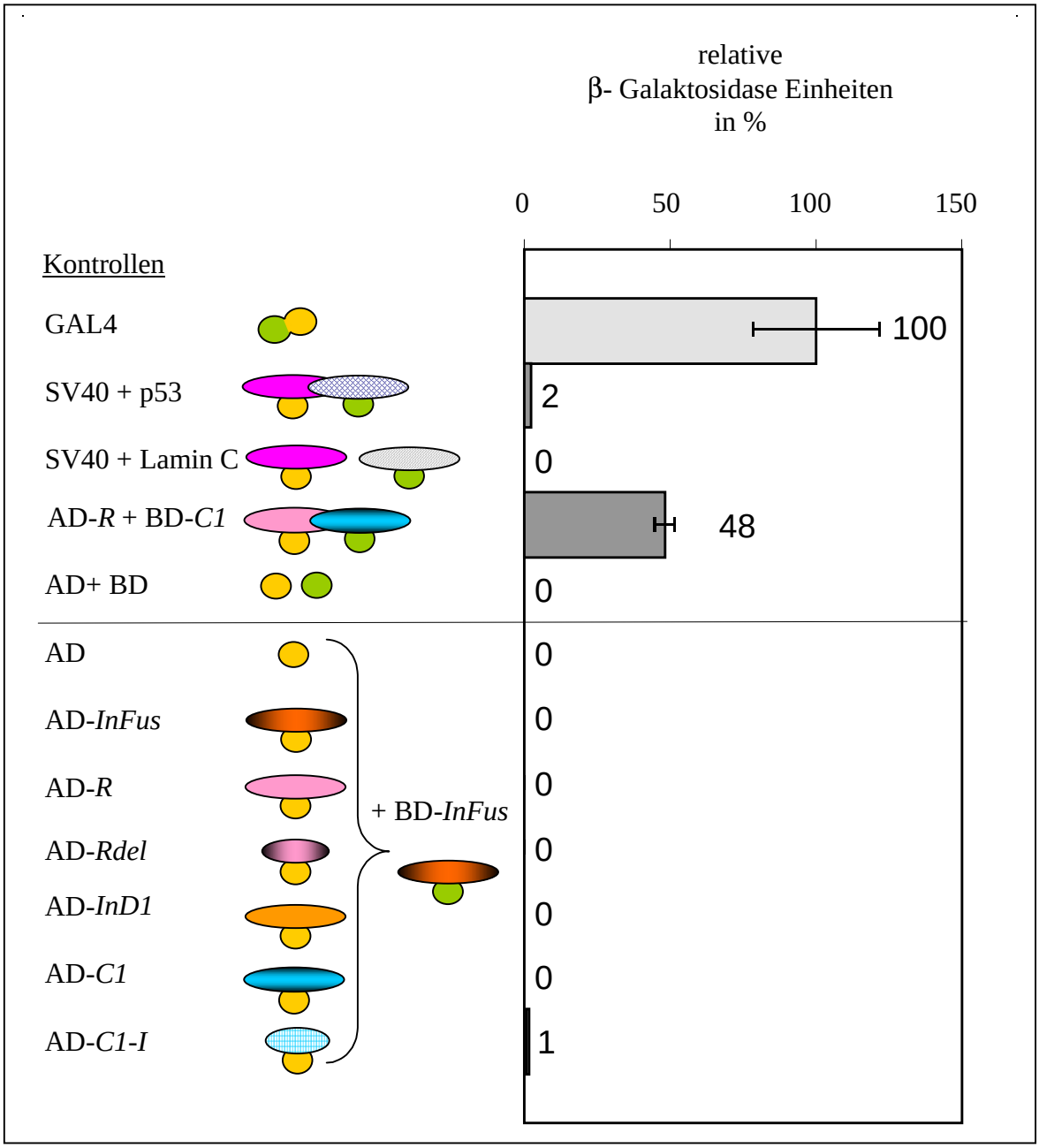

Abbildung 35: *lac*Z-Reportergenaktivierung bei Transformanten mit BD-*InFus* Fusionprotein und verschiedenen AD-Fusionsproteinen

Die Expression des Reportergens *lacZ* wurde von zwei bis vier unabhängigen Transformanten durch quantitative Messung der β-Galaktosidaseaktivität festgestellt und gemittelt. Der hierbei erhaltene Wert von Hefetransformanten mit Gal4 Protein wurde gleich 100% gesetzt. Alle übrigen gemessenen Mittelwerte wurden auf diesen Wert bezogen.

Transformanten, die zusätzlich zum BD-*InFus* noch AD-*C1-I* synthetisieren, zeigen eine sehr geringe β-Galaktosidaseaktivität und damit ein aktives *lacZ* Reportergen. Das deutet darauf hin, daß die in den Hefen synthetisierten Proteine miteinander interagieren können. Bei den anderen Transformanten wurde keine β-Galaktosidaseaktivität nachgewiesen. Die in ihnen synthetisierten Fusionsproteine sind demzufolge nicht in der Lage, zu interagieren und können das *lacZ* Gen nicht aktivieren. Im reziproken Ansatz wurde dagegen, bei Transformanten mit **BD**-*C1* und **AD**-*InFus* Fusionsproteinen, ein aktives *lacZ* Reportergenbeobachtet (Abbildung 27).

AD von Gal4 (Aktivierungsdomäne, gelber Kreis), BD von Gal4 (DNA Bindedomäne, grüner Kreis)

Aus den Untersuchungen geht hervor, daß eine Interaktion von *InFus* sowohl mit *C1* als auch mit *C1-I* erfolgen kann. Die Fähigkeit zu Interaktion hierbei aber davon abhängt, mit welcher Gal4 Domäne die einzelnen Proteine fusioniert sind.

Es wurden keine aktiven Reportergene bei Transformanten beobachtet, die zusätzlich zum BD-*InFus* noch AD-*R* oder AD-*Rdel* synthetisieren. Dies deutet darauf hin, daß BD-*InFus* nicht nicht mit AD-*R* oder *AD-Rdel* interagieren kann. Des weiteren wurden keine Reportergenaktivität bei Transformanten beobachtet, die BD-*InFus* zusammen mit AD-*InFus* synthetisieren. Hieraus kann abgeleitet werden, daß *InFus* keine Homodimere bilden kann.

Die Tabelle 9 und Abbildung 36 geben eine Übersicht über die hier dargestellten Ergebnisse.

Tabelle 9: Interaktion des BD-*InFus* Fusionsproteins mit verschiedenen AD-Fusionsproteinen

	pAD-Fusionsproteine						
	AD-*R*	AD-*Rdel*	AD-*InXS*	AD-*InFus*	AD-*InD*1	AD-*C1*	AD-*C1-I*
BD-*InFus*	-	-	NA	-	-	-	+

\+ Aktivierung der Reportergene *HIS*3 und *lacZ*. Die Anzahl der + gibt die Stärke an der Expression an.
\- Keine Aktivierung der Reportergene *HIS*3 und *lacZ*
NA nicht analysiert

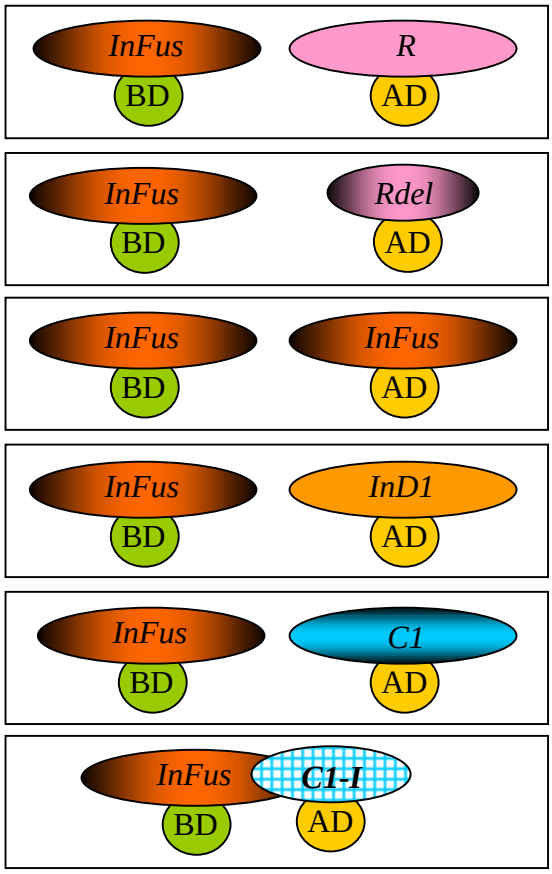

Abbildung 36: Interaktion des BD-*InFus* Fusionsproteins mit verschiedenen AD-Fusionsproteinen

Die BD-*InXS* Fusionsproteine, die mit den AD-Fusionsproteinen interagieren sind überlappend dargestellt. Fusionsproteine die nicht interagieren sind entfernt voneinander dargestellt. AD von Gal4 (Aktivierungsdomäne, gelber Kreis), BD von Gal4 (DNA Bindedomäne, grüner Kreis)

3.6.5 Transformanten mit dem BD-*InD1* Fusionsprotein und verschiedenen AD-Fusionsproteinen

(Kombinationen siehe auch Tabelle 5)

Für diesen Versuch wurden die entsprechenden Transformanten hergestellt (2.2.5.3). Diese wurden zunächst auf die Aktivität des *HIS3* Reportergens untersucht (2.2.5.1).

Bei diesem Versuch wurde bei Transformanten, die zusätzlich zum BD-*InD1* Fusionsprotein das AD-*C1-I* synthetisieren, ein normales Wachstum auf Histidinmangelmedium beobachtet. Im Vergleich dazu zeigen Transformanten, die zusätzlich zum BD-*InD1* Fusionsprotein das AD-*InD1* Fusionsprotein synthetisieren, ein allgemein schlechteres Wachstum. Sie bilden wesentlich kleinere Kolonien. Vermutlich liegt nur eine schwache Aktivierung des *HIS*3 Gens vor, die damit eine unzureichende Histidinversorgung zur Folge hat.

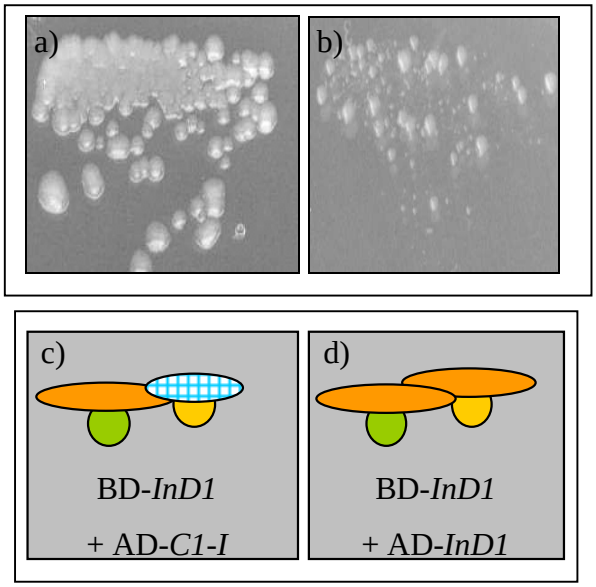

Abbildung 37: *HIS3* Reportergenaktivierung der Transformanten mit BD-*InD1* Fusionsprotein und verschiedenen AD-Fusionsproteinen

Der Hefestamm YRG-2 wurde mit den verschiedenen Kontrollplasmiden transformiert. Die Transformanten wurden anschließend hinsichtlich ihres Wachstums auf Histidinmangelmedium untersucht.

Transformanten, die zusätzlich zum BD-*InD1* Fusionsprotein noch das AD-*C1-I* (a, c) synthetisieren zeigen ein normales Wachstum auf Histidinmangelmedium. Das Ergebnis deutet darauf hin, daß die in den Hefen synthetisierten Proteine interagieren können und dadurch das *HIS3* Reportergen aktivieren. Im Vergleich dazu zeigten Transformanten, die zusätzlich zum BD-*InD*1 Fusionsprotein noch AD-*InD*1 (b, d) synthetisieren, ein allgemein schlechteres Wachstum. Sie bilden wesentlich kleinere Kolonien. Vermutlich liegt nur eine schwache Aktivierung des *HIS*3 Gens vor, die damit eine unzureichende Histidinversorgung zur Folge hat.
Transformanten mit BD-*InFus* und AD-*C1* besitzen kein aktives *HIS3* Reportergen. Im reziproken Ansatz wurde dagegen bei Transformanten mit **BD**-*C1* und **AD**-*InD*1 Fusionsproteinen ein aktives *HIS3* beobachtet (Abbildung 26).

(a, b) Typisches Wachstum eines ausgestrichenen Hefetransformanten auf Histidinmangelmedium.
(c, d) Schematische Darstellung der Fusionsproteine in den entsprechenden Hefetransformanten.
AD von Gal4 (Aktivierungsdomäne, gelber Kreis), BD von Gal4 (DNA Bindedomäne, grüner Kreis)

Transformanten mit BD-*InD1* und AD-*C1* enthalten kein aktives *HIS3* Reportergen. Mit dem reziproken Ansatz dieser Kombination wurde ein entgegengesetztes Ergebnisse erhalten. Dort wurde bei Transformanten, die pAD-*InD1* und BD-*C1* synthetisieren, ein aktives Reportergen nachgewiesen (Abbildung 26).

Die Expression des Reportergens *lacZ* wurde durch quantitative Messung der β-Galaktosidase untersucht (2.2.5.5).
Nur bei Transformanten, die zusätzlich zum BD-*InD1* noch AD-*C1-I* Fusionsproteine synthetisieren, konnte eine geringe β-Galaktosidaseaktivität gemessen werden. Sie beträgt ca. 4% relativ zu der durch Gal4 hervorgerufenen Reportergenaktivität. Das deutet darauf hin, daß die in den Hefen synthetisierten Proteine miteinander interagieren können und dadurch das *lacZ* Reportergen aktivieren.
Bei den Transformanten, die BD-*InD1* und AD-*InD1* Fusionsproteine synthetisieren, wurde dagegen keine Aktivität nachgewiesen. Sie besitzen demzufolge kein aktives *lacZ* Reportergen. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß diese Proteine nicht miteinander interagiern. Sie widersprechen damit den Ergebnissen der Untersuchungen auf die Aktivierung des *HIS3* Reportergens.

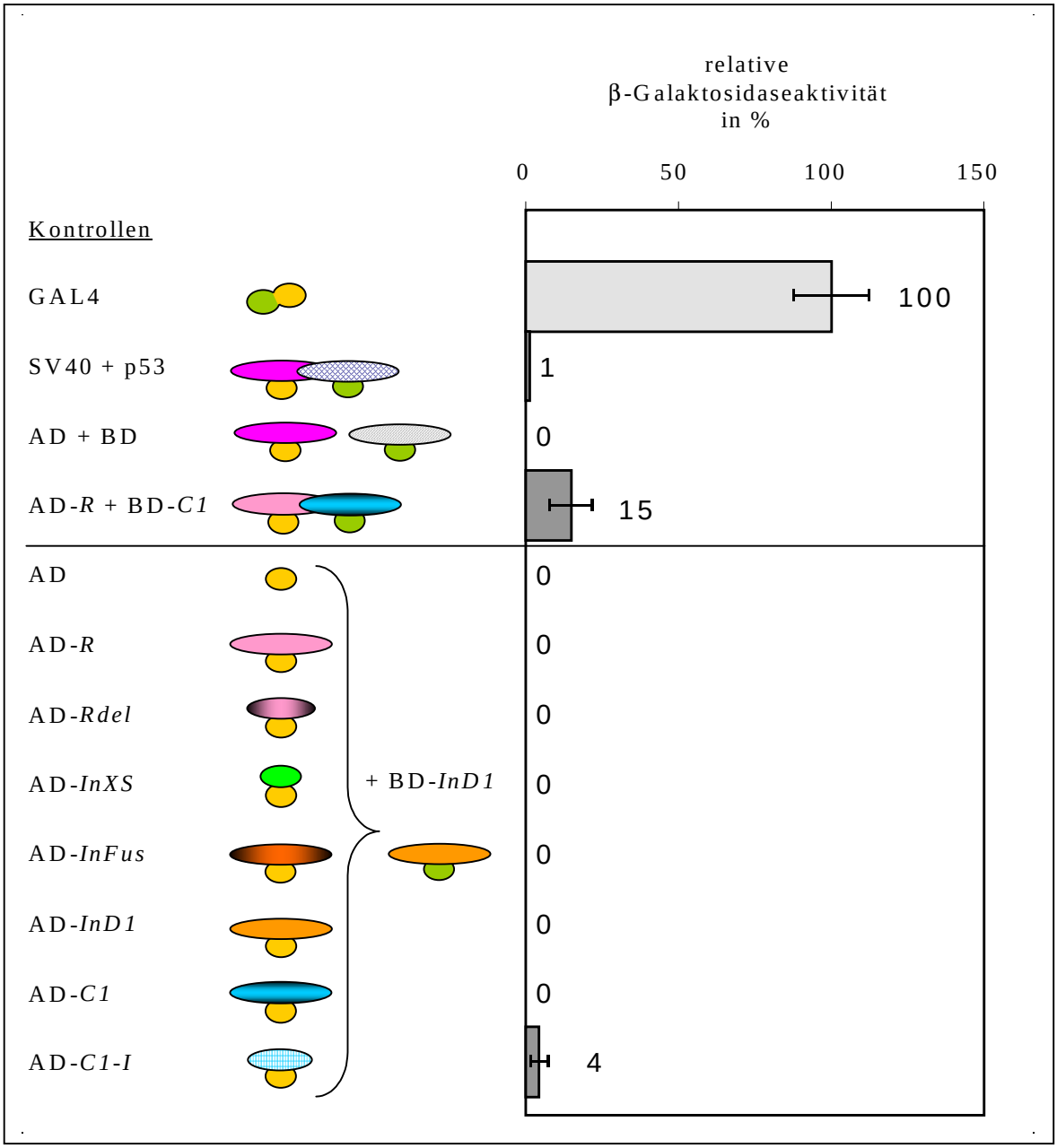

Abbildung 38: *lac*Z-Reportergenaktivierung bei Transformanten mit BD-*InD*1 Fusionprotein und verschiedenen AD-Fusionsproteinen

Die Expression des Reportergens *lacZ* wurde bei zwei bis vier unabhängigen Transformanten durch quantitative Messung β-Galaktosidaseaktivität festgestellt und gemittelt. Der hierbei erhaltene Mittelwert von Hefetransformanten mit Gal4 Protein wurde 100% gesetzt. Alle übrigen gemessenen Mittelwerte wurden auf diesen Wert bezogen.

Transformanten, die zusätzlich zum BD-*InD1* noch AD-*C1-I* synthetisieren, zeigen eine β-Galaktosidaseaktivität und besitzen damit ein aktives *lacZ* Reportergen. Das deutet darauf hin, daß die in den Hefen synthetisierten Proteine miteinander interagieren können. Alle anderen Transformanten zeigen keine β-Galaktosidaseaktivität und besitzen demzufolge kein aktives Reportergen.
Transformanten mit BD-*InD*1 und AD-*C1* besitzen kein aktives *lacZ* Reportergen. Im reziproken Ansatz wurde dagegen, bei Transformanten mit **BD**-*C1* und **AD**-*InD*1 Fusionsproteinen, ein aktives *lacZ* beobachtet (Abbildung 27).

AD (Aktivierungsdomäne, gelber Kreis), BD (DNA Bindedomäne, grüner Kreis)

Die Ergebnisse zeigen, daß das *InD1* Protein sowohl mit *C1* als auch mit *C1-I* interagieren kann. Die Fähigkeit zur Interaktion ist hierbei aber davon abhängig, mit welcher Gal4 Domäne die einzelnen Proteine fusioniert sind.
Bei Transformanten, die zusätzlich zum BD-*InD1* das AD-*R* oder AD-*Rdel* Fusionsprotein sysnthetisieren, wurde keine aktiven Reportergene festgestellt. Dies deutet darauf hin, daß *InD*1 nicht nicht mit *R* interagieren kann. Diese Beobachtungen wurden ebenfalls bei Transformanten festgestellt, die zusätzlich zum BD-*InFus* Protein das AD-*R* oder AD-*Rdel* Fusionsprotein synthetisieren (3.6.4).

InD1 scheint Homodimere bilden zu können, die mit dem Two Hybrid System nur schwer nachzuweisen waren. Die Ursachen für die unterschiedliche Expression der Reportergene *HIS3* und *lacZ* könnten hierbei auf eine sehr schwachen Interaktion oder zeitlich begrenzten Interaktion der *InD1* Proteine hinweisen.

Die Tabelle 10 und Abbildung 39 geben eine Übersicht über die hier dargestellten Ergebnisse.

Tabelle 10: Interaktion des BD-*InD1* Fusionsproteins mit verschiedenen AD-Fusionsproteinen

	AD-Fusionsproteine						
	AD-*R*	AD-*Rdel*	AD-*InXS*	AD-*InFus*	AD-*InD*1	AD-*C1*	AD-*C1-I*
BD-*InD*1	-	-	-	-	nur *HIS3*	-	+

\+ Aktivierung der Reportergene *HIS*3 und *lac*Z, Anzahl der + gibt die Stärke an
- keine Aktivierung der Reportergene *HIS*3 und *lac*Z
NA nicht analysiert

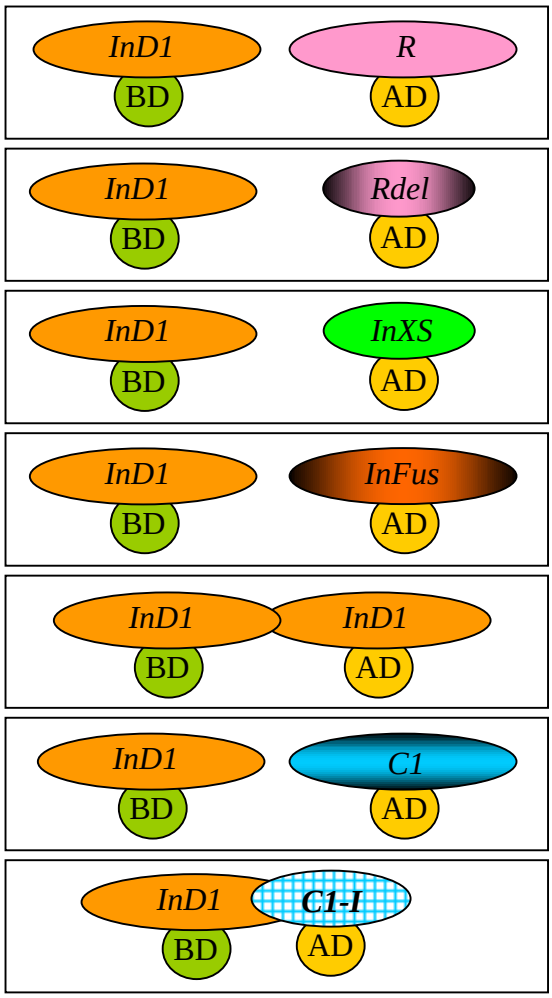

Abbildung 39: Interaktion des BD-*InD1* Fusionsproteins mit verschiedenen AD-Fusionsproteinen

Die BD-*InXS* Fusionsproteine, die mit den AD-Fusionsproteinen interagieren sind überlappend dargestellt. Fusionsproteine die nicht interagieren sind entfernt voneinander dargestellt. AD von Gal4 (Aktivierungsdomäne, gelber Kreis), BD von Gal4 (DNA Bindedomäne, grüner Kreis)

3.6.6 Transformanten mit dem BD-*R* oder dem BD-*Rdel* Fusionsprotein und verschiedenen AD-Fusionsproteinen

In den vorangegangenen Experimenten konnte eine Interaktion von AD-*R* oder AD-*Rdel* nur in Kombination mit BD-*C1* oder BD-*C1-I* nachgewiesen werden. In keinem Fall wurde eine Interaktion von AD-*R* oder AD-*Rdel* mit BD-In (*InXS*, *InD*1) nachgewiesen. Möglicherweise sind die verschiedenen *Intensifier* Proteine dennoch Interaktionspartner von *R* oder *Rdel*, dessen Interaktion sich jedoch mit den bisher durchgeführten Experimenten nicht nachweisen lässt. Möglicherweise könnte der gebildete Komplex aus *R* oder *Rdel* und den verschiedenen *Intensifier* Proteinen die Funktionen der Gal4 Binde- und Aktivierungsdomänen behindern. Dadurch könnte die Aktivierung der Reportergene *HIS*3 und *lac*Z stark unterdrückt sein.

Diese Theorie könnte durch Verwendung von Fusionsproteinen überprüft werden, die ohne Interaktionspartner eine Aktivierung der Reportergene bewirken. In Kombination mit einem komplexbildenden „Hemmer“ sollte eine reduzierte Reportergenaktivierung zu beobachten sein.

Für diese Untersuchungen wurden die allein aktivierenden Fusionsproteine von BD-*R* und BD-*Rdel* verwendet (Hintergrundaktivierun, Abbildung 20). Die Tabelle 11 gibt einen kurzen Überblick über die durchgeführten Experimente. Dieser Test wurde zu einem Zeitpunkt durchgeführt, an dem der Fusionsklon *InFus* noch nicht vorlag. Er fehlt daher in dieser Analyse.

Tabelle 11 : Test auf *in vivo* Interaktion der Fusionsproteine BD-*R* und BD-*Rdel* mit verschiedenen AD-Fusionsproteinen

	AD-Fusionsproteine						
	AD-*R*	AD-*Rdel*	AD-*InXS*	AD-*InFus*	AD-*InD*1	AD-*C1*	AD-*C1-I*
BD-*R*	X		X		X		
BD-*Rdel*			X		X		

Die durchgeführten Kombinationen sind mit einem X markiert.

Für diesen Versuch wurden die hergestellten Hefestämme verwendet, die BD-*R* oder BD-*Rdel* Fusionsproteine synthetisieren. Sie wurden mit den ensprechenden pAD-Expressionsplasmiden transformiert (2.2.5.3). Die hieraus resultierenden Transformanten wurden zunächst auf die Aktivität des *HIS3* Reportergens untersucht (2.2.5.1).

Alle untersuchten Transformanten zeigten auf Histidinmangelmedium ein normales Wachstum. Die Expression des *HIS*3 Gens scheint durch die Anwesenheit der AD-*InXS* oder AD-*InD*1 Fusionsproteine nicht beeinflusst zu werden.

Die Expression des Reportergens *lacZ* wurde durch quantitative Messung der β-Galaktosidaseaktivität untersucht (2.2.5.5). Anders als in den vorrangegangenen Experimenten wurde hier der von Transformanten mit BD-*R* + AD erhaltenen Mittelwert gleich 100 % gesetzt (Abbildung 40, a). Alle übrigen Mittelwerte wurden auf diesen Wert bezogen.

Die β-Galaktosidaseaktivität ist bei Transformanten, die zusätzlich zum BD-*R* Fusionsprotein das AD-*InD*1 synthetisieren, signifikant reduziert. Die Aktivität beträgt 62% und ist damit um etwa 38% geringer, als die Aktivität bei Transformanten mit BD-*R* + AD (Abbildung 40, b).

Eine ähnliche signifikante Reduktion der β-Galaktosidaseaktivität wurde bei Transformanten beobachtet, die zusätzlich zum BD-*R* Fusionsprotein das AD-*R* synthetisieren. Die Aktivität beträgt hier 66 % und ist damit um etwa 34 % geringer, als die Aktivität bei Transformanten mit BD-*R* + AD (Abbildung 40, b).

Bei Transformanten die das BD-*R* und das AD-*InXS* Fusionsprotein synthetisieren wurde ebenfalls eine Reduktion der β-Galaktosidaseaktivität festgestellt. Die Aktivität beträgt hier 80 % und ist damit um etwa 20% geringer, die Aktivität bei Transformanten mit BD-*R* + AD (Abbildung 40, b).

Die Transformanten die zusätzlich zu dem BD-*Rdel* Fusionsprotein ein weiteres Fusionsprotein synthetisieren, zeigten dagegen keine signifikante Veränderungen in der β-Galaktosidaseaktivität (Abbildung 40, c).

Wie zuvor beobachtet (Abbildung 20, Seite 66), können Transformanten mit dem BD-*Rdel* Fusionsprotein das *lacZ* Reportergen wesentlich besser aktivieren, als Transformanten mit dem BD-*R* Fusionsprotein. Diese Fähigkeit zur Aktivierung könnte auf eine interne funktionierende Aktivierungsdomäne im *R* Protein hinweisen. Möglicherweise wird diese Funktion, zum Beispiel aufgrund sterischer Behinderung durch die Fusion des vollständigen *R* Proteins mit der BD von Gal4, im BD-*R* Fusionsprotein unterdrückt. Mit dem verkürzten *R* Protein (*Rdel*), scheint dagegen keine sterische Behinderung vorzuliegen, da Transfomanten die BD-*Rdel* synthetisieren eine stärkere Expression des *lacZ* aufweisen.

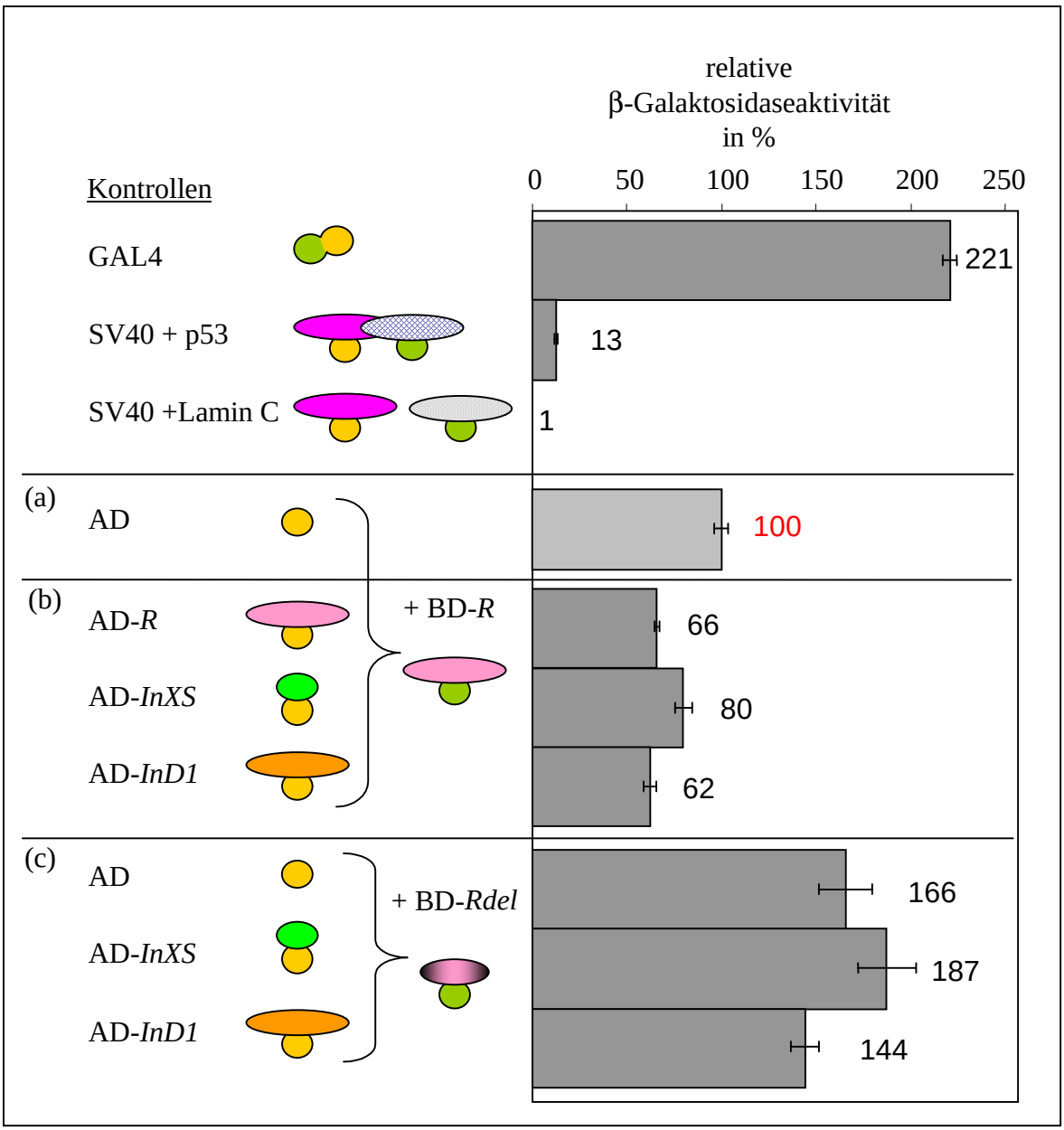

Abbildung 40: *lacZ* Reportergenaktivierung bei Transformanten mit BD-*R* oder BD-*Rdel* Fusionsproteinen und verschiedenen AD-Fusionsproteinen

Die Expression des Reportergens *lacZ* wurde bei zwei bis vier unabhängigen Transformanten durch quantitative Messung β-Galaktosidaseaktivität festgestellt und gemittelt. Anders als in den vorangegangenen Versuchen wurde hier der Mittelwert von Hefetransformanten mit BD-*R* + AD Proteinen als 100 % gesetzt (hellgrauer Balken, rote Schrift). Alle übrigen Mittelwerte wurden auf diesen Wert bezogen.

Die β-Galaktosidaseaktivität ist bei Transformanten, die zusätzlich zum BD-*R* Fusionsprotein das AD-*InD*1, AD-*InXS* oder AD-*R* synthetisieren, signifikant reduziert. Das scheint darauf hinzuweisen, daß AD-*InD1* und AD-*InXS* mit dem BD-*R* Fusionsprotein interagieren können. Diese Beobachtungen widersprechen damit den Ergebnissen die mit dem reziproken Ansatz erhalten wurden (Kapitel 3.6.3 und 3.6.5). Hier wurde keine Interaktion zwischen dem AD-*R* Fusionsprotein mit den BD-*InXS* und BD-*InD1* Fusionsproteinen festgestellt.

AD von Gal4 (Aktivierungsdomäne, gelber Kreis), BD von Gal4 (DNA Bindedomäne, grüner Kreis)

Die Ergebnisse zeigen, daß die Hintergrundaktivität des *lacZ* Reportergens durch das BD-*R* Fusionsprotein in Gegenwart der AD-*InXS* und AD-*InD1* Fusionsproteine gehemmt wird. Das scheint darauf hinzuweisen, daß AD-*InD1* und AD-*InXS* mit dem BD-*R* Fusionsprotein interagieren können. Diese Beobachtungen widersprechen damit den Ergebnissen die mit dem reziproken Ansatz erhalten wurden (Kapitel 3.6.3 und 3.6.5). Hier wurde keine Interaktion zwischen dem AD-*R* Fusionsprotein mit den BD-*InXS* und BD-*InD1* Fusionsproteinen festgestellt.

Diese Hemmung durch die AD-*InXS* und AD-*InD1* Fusionsproteine wurde in Kombination mit dem deletieren *R* Protein (*Rdel*) nicht beobachtet. Dies deutet darauf hin, daß die für eine Interaktion benötigten Aminosäuren in dem BD-*Rdel* Fusionsprotein nicht vorliegen.

Des weiteren konnte gezeigt werden, daß die Hintergrundaktivität von BD-*R* durch AD-*R* gehemmt werden kann. Daraus folgt, daß BD-*R* mit AD-*R* interagiert. Dieses gebildete Dimer kann dabei das *lacZ* Reportergen nicht so gut aktivieren, wie das BD-*R* Fusionsprotein alleine.

Die Tabelle 12 und geben eine Übersicht über die hier dargestellten Ergebnisse.

Tabelle 12: Beeinflussung der β-Galaktosidaseaktivität in Transformanten mit BD-*R* oder BD-*Rdel* Fusionsproteinen und verschiedenen AD-Fusionsproteinen

	AD-Fusionsproteine						
	AD-*R*	AD-*Rdel*	AD-*InXS*	AD-*InFus*	AD-*InD1*	AD-*C1*	AD-*C1-I*
BD-*R*	⇓⇓	NA	⇓	NA	⇓⇓	NA	NA
BD-*Rdel*	NA	NA	=	NA	=	NA	NA

⇓ Die Anzahl der Pfeile gibt die Stärke der signifikanten Reduktion an.
= unverändert
NA nicht analysiert

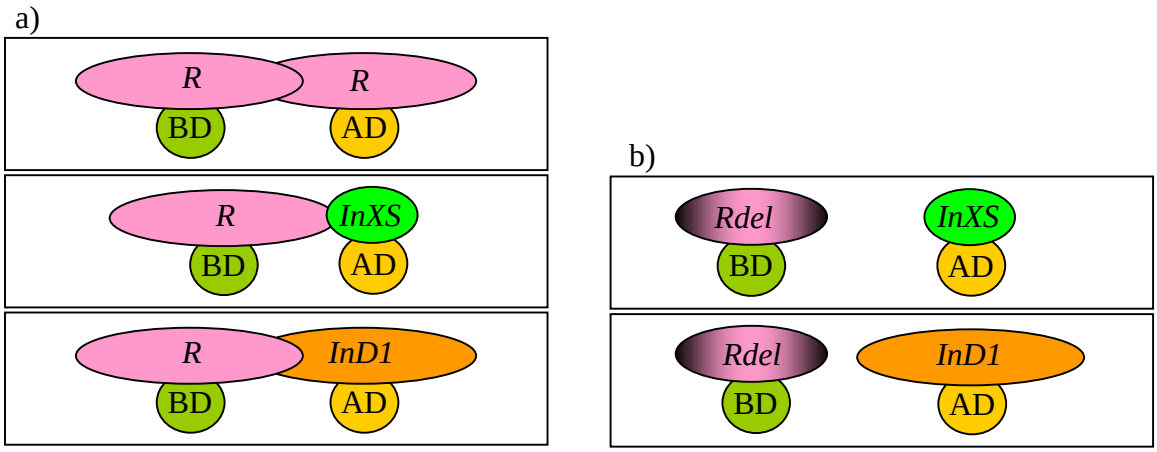

Abbildung 41: Ergebnisse der Interaktion von BD-*R* oder BD-*Rdel* mit verschiedenen AD-Fusionsproteinen

Die BD-*R* (a) oder *BD-Rdel* (b) Fusionsproteine, die mit den verschiedenen AD-Fusionsproteinen interagieren sind überlappend dargestellt. Fusionsproteine die nicht interagieren sind entfernt voneinander dargestellt. AD von Gal4 (Aktivierungsdomäne, gelber Kreis), BD von Gal4 (DNA Bindedomäne, grüner Kreis)

3.6.7 Transformanten mit drei Fusionsproteinen

Die Interaktion und damit Komplexbildung von *R* mit *C1* konnte in den in dieser Arbeit dargestellten Versuchen nachgewiesen werden. Des weiteren wurde die Interaktion der *Intensifier* Proteine (*InD1*, *InXS*) sowohl mit *C1* als auch mit *R* (Abbildung 42) nachgewiesen.

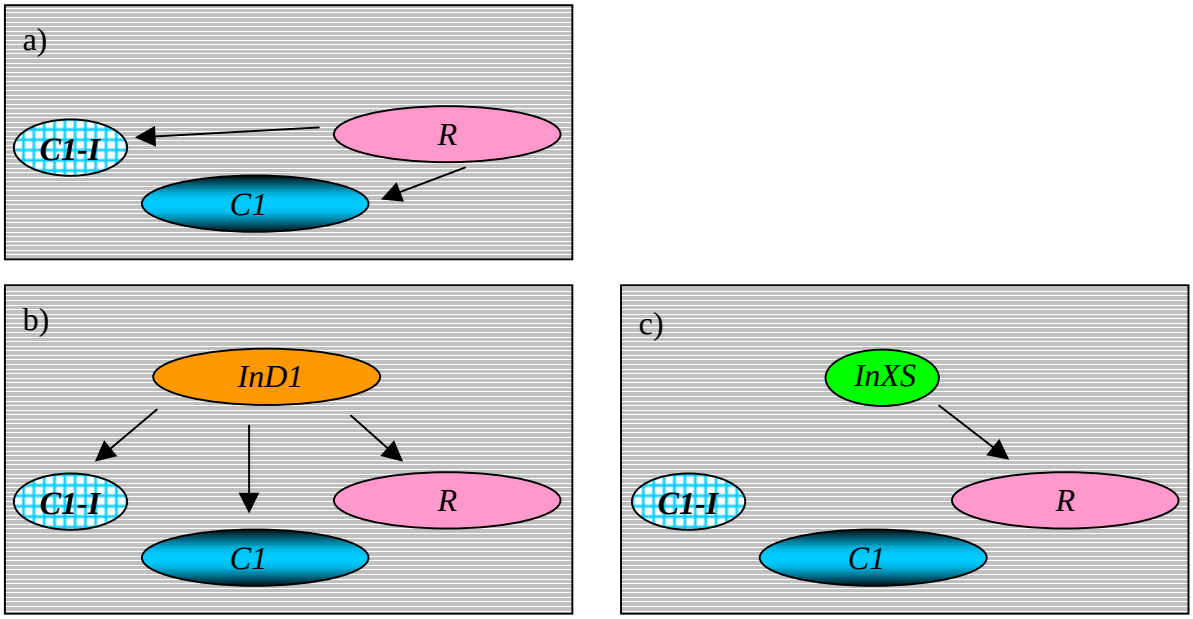

Abbildung 42: Interaktion von *R*, *C1* und den *Intensifier* Proteine

Das *R* Protein interagiert mit den Proteinen *C1* und *C1-I* (a). Des weiteren wurde eine Interaktion des Proteins *InD*1 mit den Proteinen R, *C1* und *C1-I* beobachtet (b). Mit dem *InXS* Protein wurde dagegen nur eine Interaktion mit dem *R* Protein beobachtet (c).

Es stellte sich daher die Frage, ob die *Intensifier* Proteine die Komplexbildung aus *R* und *C1* (oder *C1-I*) beeinflussen können (Abbildung 43). Dieser Einfluss könnte eine veränderte Expression der Reportergene *HIS3* und *lacZ* zur Folge haben. Für diese Untersuchungen sollten Transformanten hergestellt werden, die folgende Proteine synthetisieren:

R + *C1* + *InD1* (Abbildung 43, a)

R + *C1* + *InXS* (Abbildung 43, b)

R + *C1-I* + *InD1* (Abbildung 43, c)

R + *C1-I* + *InXS* (Abbildung 43, d)

Dieser Test wurde zu einem Zeitpunkt durchgeführt, an dem der Fusionsklon *InFus* noch nicht vorlag. Er fehlt daher in dieser Analyse.

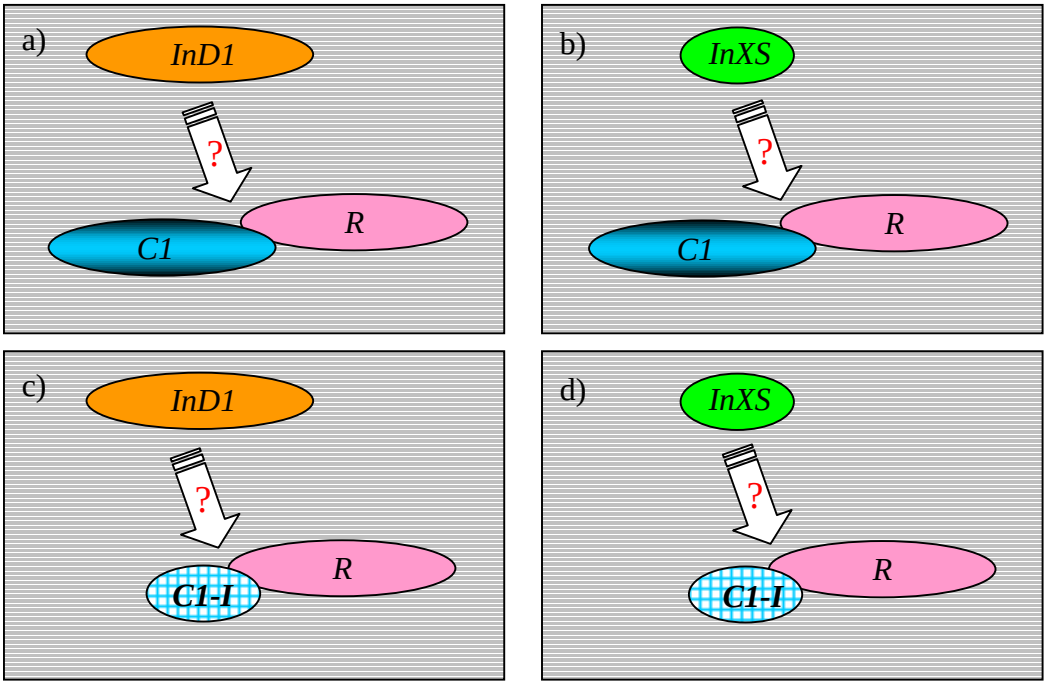

Abbildung 43: Beeinflussung der Komplexbildung von *R* und *C1* durch die *Intensifier* Proteine

Es konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, daß die *Intensifier* Proteine (*InD*1, *InXS*) sowohl mit *R* als auch *C1* (oder *C1-I*) interagieren (Abbildung 42). Daher stellte sich die Frage, ob die *Intensifier* Proteine (*InD*1, *InXS*) die Komplexbildung von *R* mit *C1* (oder *C1-I*) beeinflussen können.
Für diese Untersuchungen sollten Tranformanten hergestellt werden, die folgende Proteine synthetisieren:
R + C1 + InD1 (a), *R + C1 + InXS* (b), *R + C1-I + InD1* (c), *R + C1-I + InXS* (d)

In zuvor durchgeführten Experimenten konnte gezeigt werden, daß durch das BD-*R* Fusionsprotein eine hohe Hintergrundaktivität der Reportergene *HIS3* und *lacZ* erfolgt (3.5.1, Seite 62). Dadurch ist es nicht möglich, die Experimente mit diesem Fusionsprotein durchzuführen. Es wurde vermutet, daß mit diesen Fusionsproteinen keine verläßlichen Aussagen über die Interaktion mit anderen Fusionsproteinen möglich sind. In den durchzuführenden Versuchen mit *R*, C1 (*C1-I*) und den *Intensifier* Proteinen konnten daher nur das Fusionsprotein AD-*R* verwendet werden, da es keine Hintergrundaktivität verursacht (3.5.1).

Des weiteren konnte in zuvor durchgeführten Experimenten eine Interaktion von *C1* mit *InD1*, nur bei Verwendung von BD-*C1* in Kombination mit AD-*InD* nachgewiesen werden (3.6.1, Seite 74). Dagegen wurde mit dem reziproken Ansatz keine Interaktion zwischen diesen Proteinen nachgewiesen (Abbildung 25): AD-*C1* in Kombination mit BD-*InD*1 (3.6.5, Seite 90).

Daraus folgt, das die Experimente nur mit den folgenden Fusionsproteinen durchgeführt werden konnten:

AD-*R* + BD-*C1* + AD-*InD*1 (Abbildung 44, a)

AD-*R* + BD-*C1* + AD-*InXS* (Abbildung 44, b)

AD-*R* + BD-*C1-I* + AD-*InD*1 (Abbildung 44, c)

AD-*R* + BD-*C1-I* + AD-*InXS* (Abbildung 44, d)

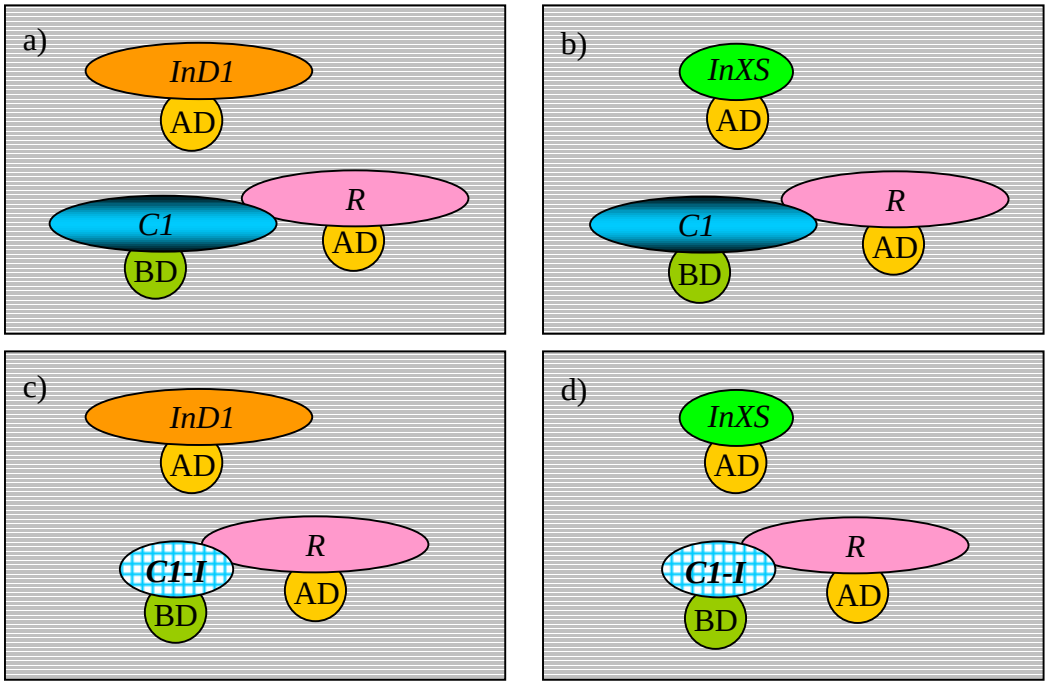

Abbildung 44: Zu testende Kombinationen der drei Fusionsproteine

Um festzustellen, ob die Proteine des *Intensifier* (*InD1*, *InXS*) die Komplexbildung von *R* mit *C1* (oder *C1-I*) beeinflussen können, wurden folgende Fusionsproteine verwendet:
AD-*R* + BD-*C1* + AD-*InD*1 (a), AD-*R* + BD-*C1* + AD-*InXS* (b), AD-*R* + BD-*C1-I* + AD-*InD*1 (c), AD-*R* + BD-*C1-I* + AD-*InXS* (d).
Andere Kombinationen der Fusionsproteine können nicht verwendet werden, da durch sie entweder eine zu hohe Hintergrundaktivität der Reportergene *HIS3* und *lacZ* erfolgt (BD-*R*, 3.5.1) oder eine Interaktion nicht nachgewiesen wurde (BD-*InD1* + AD-*C1*, 3.6.1).
AD von Gal4 (Aktivierungsdomäne, gelber Kreis), BD von Gal4 (DNA Bindedomäne, grüner Kreis)

3.6.7.1 Expressionsplasmide

Die Selektion auf Transformanten mit pAD-Expressionsplasmiden erfolgt durch das auxotrophe Markergen *LEU2*. Die Selektion auf Transformanten mit pBD-Expressionsplasmiden erfolgt durch das auxotrophe Markergen *TRP1*. Demzufolge können Transformanten, die beide Expressionsplasmide enthalten, die Aminosäuren Leucin und Tryptophan synthetisieren. Sie werden durch Wachstum im Medium dem die Aminosäuren Leucin und Tryptophan fehlen (-Leu/ -Trp) identifiziert.

Interagieren die synthetisierten AD- und BD-Fusionsproteine in den Transformanten, so wird das dritte auxotrophe Markergen *HIS3* aktiviert. Diese Transformanten können dadurch die Aminosäure Histidin synthetisieren. Die Selektion hierfür erfolgt in Medium, dem neben Leucin und Tryptophan auch Histidin fehlt (-Leu/ -Trp/ -His) (Abbildung 45, a).

Die Selektion kann auch in Medium erfolgen, dem nur Tryptophan und Histidin (-Trp/ -His) fehlen. Können die Transformanten auf -Trp/ -His Medium wachsen, so müssen beide Fusionsproteine und damit die entsprechenden Expressionsplasmide (pBD-X, pAD-Y), in den Zellen vorliegen. Das ermöglicht es, das auxotrophe Markergen *LEU2* des Expressionsplasmids pAD-Y funktionslos zu machen (-~~*LEU2*~~), und trotzdem davon ausgehen zu können, daß beide Expressionsplasmide in den Zellen vorliegen (Abbildung 45, b).

Dieser Mechanismus schafft die Grundlage für die Transformation eines dritten Expressionsplasmids. Sollen Transformanten hergestellt werden, die drei Plasmide enthalten (pBD-X, pAD-Y-~~*LEU2*~~ + zusätzliches pAD-Z), so müsste die Selektion in -Trp/ -His/ -Leu Medium erfolgen. Wobei der –Leu Selektionsdruck auf dem funktionslosen *LEU2* Markergen des zusätzlichen dritten Expressionsplasmids pAD-Z liegt (Abbildung 45, c).

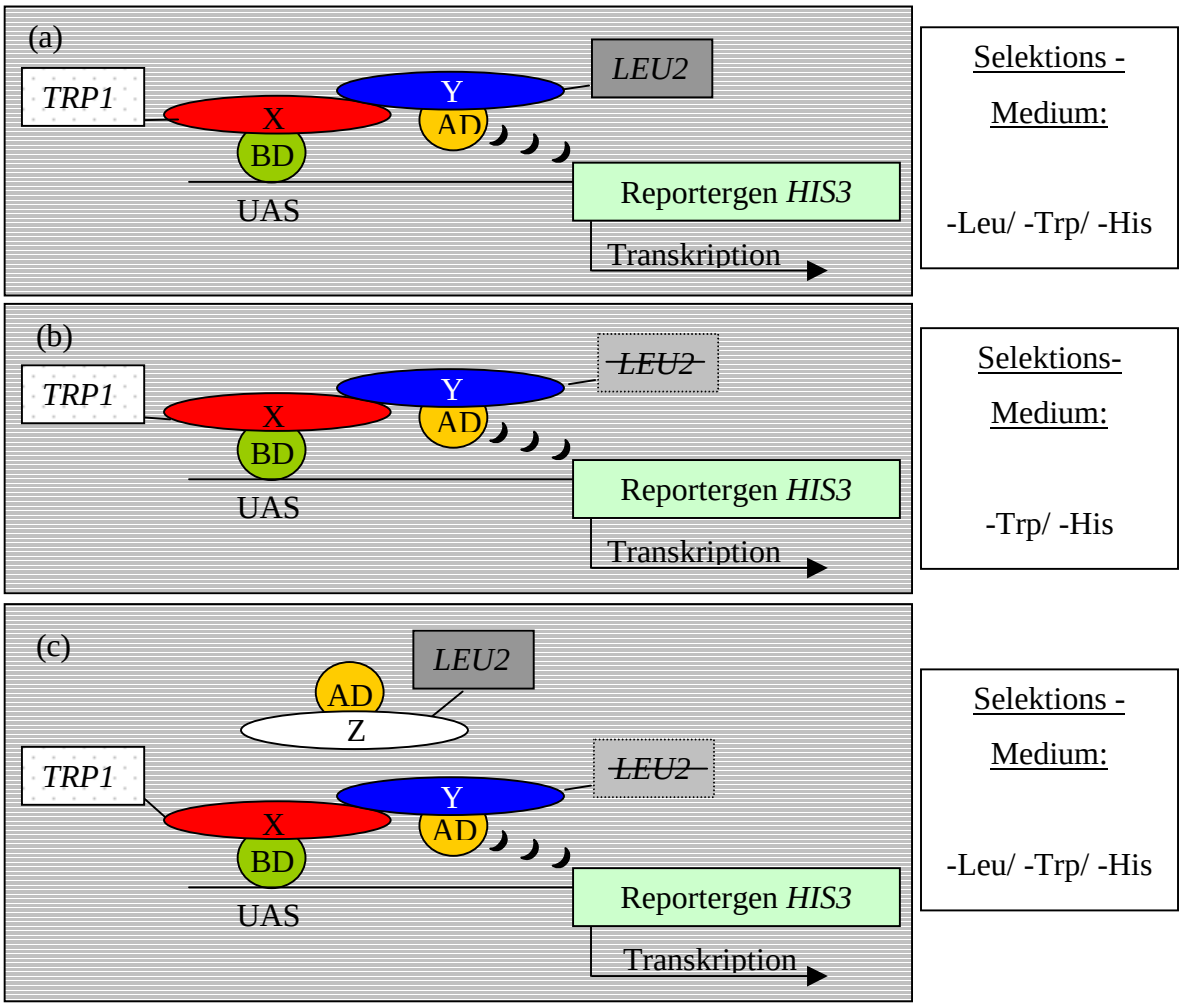

Abbildung 45: Selektionsmedium für Transformanten mit drei Expressionsplasmiden

Die Expressionsplasmide und Fusionsproteine werden durch die selben Symbole dargestellt.
(a) Transformanten mit BD-X und AD-Y Expressionsplasmiden besitzen die aktiven auxotrophen Markergene *TRP1* (weiße Box) und *LEU2* (graue Box). Die Selektion, auf die Expressionsplasmide, erfolgt in Medium ohne Leucin und Tryptophan (-Leu/ -Trp). Interagieren die synthetisierten Fusionsproteine BD-X und AD-Y, wird das dritte auxotrophe Markergen *HIS3* (grüne Box) aktiviert. Diese Transformanten werden durch Wachstum in Medium, dem die drei Aminosäuren Leucin, Tryptophan und Histidin fehlen (-Leu/ -Trp/ -His), identifiziert.
(b) Auf Transformanten mit einem funktionslosen *LEU2* Markergen (gestrichelte Box, ~~*LEU2*~~) und interagierenden Proteinen wird in Medium selektioniert, dem nur die Aminosäuren Tryptophan und Histidin fehlen (-Trp/ -His).
(c) Werden die Transformanten von (b) mit einem dritten Expressionsplasmid AD-Z transformiert, erfolgt die Selektion in Medium, dem drei Aminosäuren fehlen (-Leu/ -Trp/ -His). Hierbei liegt der –Leu Selektionsdruck auf dem funktionsfähigen *LEU2* Markergen des zusätzlichen dritten AD-Z Expressionsplasmids.
X, Y und Z stehen für die Proteine, die auf eine mögliche Interaktion getestetet werden sollen, sie sind mit der AD (Aktivierungsdomäne von Gal4, gelber Kreis) oder BD (DNA Bindedomäne von Gal4, grüner Kreis) fusioniert; UAS (upstream activating sequence = DNA Bindestelle der Gal4 DNA Bindedomäne)

Um die Transformanten mit den Expressionsplasmiden pBD-*C1*, pAD-*R* und dem zusätzlichen pAD Plasmid herzustellen, mußte zunächst das *LEU2* Markergen des pAD-*R* funktionslos gemacht werden.

Hierfür wurde die pAD-*R* #356 Plasmid DNA (2.2.2.1) mit *Eco*RV/*Cla*I restringiert (2.2.2.3). Dadurch wurden ca. 0,6 kb des ca 0,9 kb langen *LEU2* Gens deletiert. Damit die Enden kompatibel für eine Religation waren, mußte die zurückgesetzte *Cla*I Schnittstelle des verbliebenen Vektors aufgefüllt werden (2.2.3.1). Nach der Isolierung des geschnittenen Vektors erfolgte die Bestimmung der DNA Menge und die Ligation (2.2.3.6) der Enden.

Um die Deletion zu überprüfen wurden aus 24 unabhängigen Bakterientransformanten die Plasmid DNA isoliert (2.2.2.1) und mit *Hind*III restringiert (2.2.2.3). Die Restriktionsfragmente wurden anschließen elektorphoretisch aufgetrennt (2.2.2.4) und anhand des verwendeten Standards bestimmt (2.2.2.5).

Positive Bakterientransformanten enthalten das um 0,6 kb deletierte Expressionsplasmid. Dieses Expressionsplasmid wurde bezeichnet als:

pAD-R-~~*LEU2*~~ Plasmid #356-2

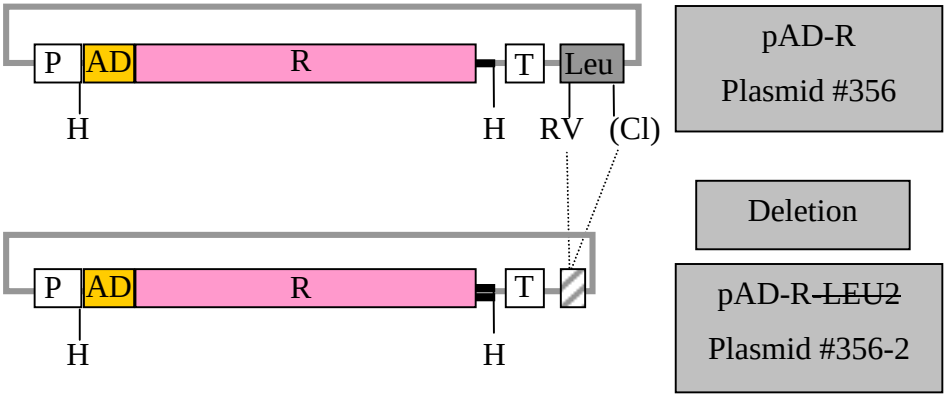

Abbildung 46: Herstellung des funktionslosen *LEU2* Markergens

Für die Herstellung des funtkionsunfähigen *LEU2* Markergens wurde das pAD-*R* Plasmid #356 mit *Eco*RV (RV)/*Cla*I (Cl) restringiert. Dadurch wurden ca. 0,6 kb des ca 0,9 kb langen *LEU2* Gens deletiert. Damit die Enden kompatibel für eine Ligation waren, mußte die die *Cla*I Schnittstelle des verbliebenen Vektors aufgefüllt werden. Das deletierte Vektor (grauer Rahmen) wurde identifizierte durch Restriktion mit *Hind*III (H).

Anschließend wurde die Plasmid DNA pAD-R-~~*LEU2*~~ mit pBD-*C1* (oder pBD-*C1-I*) in den Hefestamm YRG-2 eingebracht (2.2.5.3) und die Transformanten auf –Trp/-His Medium selektiert. Die Untersuchung auf ein funktionsloses *LEU2* erfolgte durch Ausstreichen der selben Transformanten auf –Leu Medium. Sie zeigten hier kein Wachstum, wodurch bestätigt wurde, daß sie kein funktionsfähiges *LEU2* enthalten.

Nach diesen Vortests wurden aus diesen Hefestämmen kompetente Zellen hergestellt (2.2.5.2) und mit dem dritten Plasmid (Tabelle 13) transformiert (2.2.5.3) Aus jedem Transformationsereignis wurden drei Hefekolonien auf die Aktivierung der Reportergene *HIS*3 und *lac*Z untersucht.

Hierbei wurde davon ausgegangen, daß der Einfluss der synthetisierten *Intensifier* Fusionsproteine (AD-*InD*1, AD-*InXS*) nur schwach ist, so daß die Reportergene *HIS*3 und *lac*Z noch ausreichend aktiviert werden können. Transformanten, bei denen die Aktivierung von *HIS*3 verhindert wird, könnten nicht detektiert werden, da sie in -Leu/ -Trp/ -His Medium nicht wachsen würden.

Tabelle 13 : Transformanten mit drei Fusionsproteinen

	AD-Fusionsprotein		
Hefestämme	AD	AD-*InXS*	AD-*InD*1
(a) BD-*C1* + AD-R-~~LEU2~~	X	X	X
(b) BD-*C1-I* + AD-R-~~LEU2~~	X	X	X

In den Hefestämmen (a) und (b) und wurde das dritten Fusionsprotein (AD, AD-*InXS* oder AD-*InD*1) synthethisiert. Die entsprechende Kombinationen sind mit einem X markiert.

Die Transformanten die in -Leu/ -Trp/ -His Medium angezogen wurden, zeigten ein normales Wachstum. Es konnte kein verändertes Wachstum, wie bei Transformanten die zusätzlich zum AD-*InD1* Fusionsprotein das BD-*InD1* Fusionsprotein synthetisieren (Abbildung 37, Seite 90), beobachtet werden. Die Expression des Reportergens *HIS*3 scheint durch die Anwesenheit von AD-*InD*1 oder AD-*InXS* nicht beeinflusst zu werden.

Die Expression des Reportergens *lacZ* wurde durch quantitative Messung der β-Galaktosidaseaktivität untersucht.

Die Ergebnisse zeigen starke Unterschiede innerhalb der analysierten Transformanten. Es wurden dabei Aktivitäten zwischen 12 % und 94 %, relativ zu der durch Gal4 hervorgerufenen Aktivität, gemessen. Hierbei handelt es sich jedoch um Transformanten, die als Kontrollen dienen sollten. Sie enthalten zusätzlich zu den AD-*R* und BD-*C1-I* Fusionsproteinen nur die Aktivierungsdomäne (AD) und nicht ein drittes Fusionsprotein.

Offensichtlich erfolgt bei Tranformanten, die drei Fusionsproteine synthetisieren, keine einheitlich Aktivierung des Reportergens *lac*Z. Aufgrund dieser Schwankungen bei den Kontrollen, ist es nicht möglich die β-Galaktosidase Messdaten der Transformanten mit

AD-*R*, BD-*C1* und den AD-*InXS* oder AD-*InD1* Fusionsproteinen zu deuten (Daten sind dem Anhang zu entnehmen).
Für die Untersuchungen auf eine mögliche Interaktion zwischen *InXS* oder *InD1* mit *R* und *C1* muss daher ein anderes System verwendet werden.

3.6.8 Zusammenfassung der *in vivo* Interaktion

Mit dem Two Hybrid System wurde die *in vivo* Interaktion von *InXS*, *InFus* (Fusionsprotein aus Teilen von *In* und *InD1*, Aminosäuresequenz siehe Anhang Abbildung 78 Seite 172), *InD1*, *C1*, *C1-I*, *R* und *Rdel* (verkürztes Protein, ohne basisches Helix-Loop-Helix Region), getestet. Hierzu wurden die entsprechenden cDNAs im richtigen Leserahmen sowohl an die DNA-Bindedomäne (BD) als auch Aktivierungsdomäne (AD) von Gal4 kloniert. Die hergestellten Expressonsplasmide wurden in den Hefestamm YRG-2 transformiert. Anschließend wurden die Transformanten auf die Aktivierung der Reportergene (der auxotropher Marker *HIS3* und das *lac*Z Gen) untersucht. Bei einer Interaktion der Fusionsproteine werden beide Reportergene aktiviert. Diese Transformanten können auf Histidinmangelmedium wachsen und zeigen β-Galaktosidaseaktivität.

Die Untersuchungen ergaben, das Transformanten die nur das BD-*R* oder das BD-*Rdel* Fusionsprotein enthalten, bereits zu einer Expression der Reportergene in der Lage sind. Alle anderen Transformanten, die nur ein Fusionsprotein enthalten, zeigen keine Reportergenaktivität.

Die Transformanten, die AD-*R* oder AD-*Rdel* Fusionsproteine (nicht mit BD-*R* oder BD-*Rdel* verwechseln) in Kombination mit BD-*C1* oder BD-*C1-I* Fusionsproteinen synthetisieren (Abbildung 47), zeigen eine sehr starke Aktivierung der Reportergene. Demzufolge scheinen diese Proteine *in vivo* zu interagieren.

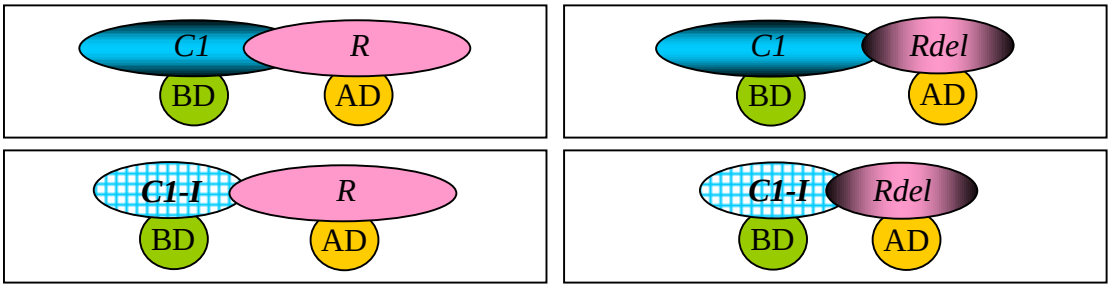

Abbildung 47: Interaktion der Fusionsproteine *R*, *Rdel*, *C1* und *C1-I*

Die Fusionsproteine AD-*R* und AD-*Rdel* können sowohl mit BD-*C1* als auch mit BD-*C1-I* interagieren. Fusionsproteine, die interagieren, sind überlappend dargestellt.
AD von Gal4 (Aktivierungsdomäne, gelber Kreis), BD von Gal4 (DNA Bindedomäne, grüner Kreis)

Transformanten, die *C1* oder *C1-I* in Kombination mit *InD* oder *InFus* synthetisieren, besitzen ebenfalls aktive Reportergene. Die Fähigkeit zur Interaktion hängt aber davon ab, mit welcher Domäne des Gal4 (AD oder BD) die einzelnen Proteine fusioniert sind. Bei Transformanten mit AD-*C1* in Kombination mit BD-*InD*1 oder BD-*InFus* wurden keine aktiven Reportergene beobachtet. Im Gegensatz dazu wurden bei dem reziproken Ansatz, d.h. BD-*C1* in Kombination mit AD-*InD1* oder AD-*InFus*, eine Aktivierung der Reportergene festgestellt. Diese Aktivierung ist dabei wesentlich schwächer als bei Transformanten mit AD-*R* oder AD-*Rdel* in Kombination mit BD-*C1* oder BD-*C1-I*. Die Interaktion der Proteine *C1* oder *C1-I* mit *InD* oder *InFus* ist demzufolge als geringer einzuschätzen.

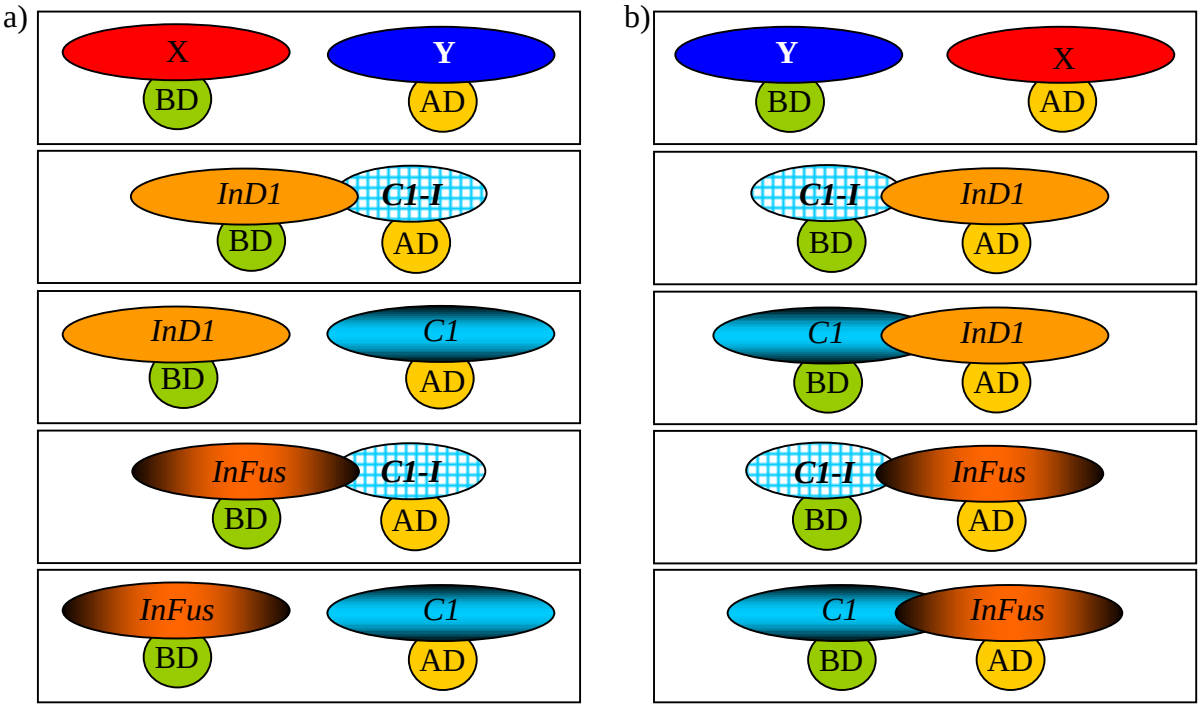

Abbildung 48: Interaktion der Fusionsproteine *InD1*, *InFus*, *C1* und *C1-I*

Die Proteine *InD*1 und *InFus* können sowohl mit *C1* als auch mit *C1-I* interagieren. Die Fähigkeit zur Interaktion hängt aber davon ab, mit welcher Domäne von Gal4 die einzelnen Proteine fusioniert sind. In Spalte (b) sind die reziproken Kombinationen von Spalte (a) gezeigt. Interagierende Fusionsproteine sind überlappend dargestellt. AD (Aktivierungsdomäne, gelber Kreis), BD (DNA Bindedomäne, grüner Kreis)

Transformanten, die zusätzlich zum AD-*R* oder AD-*Rdel* Fusionsprotein noch BD-*InD*1, BD-*InXS* oder BD-*InFus* Fusionsproteine synthetisieren, besitzen keine aktiven Reportergene. Das läßt vermuten, daß AD-*R* oder AD-*Rdel* Fusionsproteine nicht mit BD-*InD1*, BD-*InXS* oder BD-*InFus* Fusionsproteinen interagieren können. Bei dem reziproken Versuchsansatz wurden davon abweichende Ergebnisse erhalten.

Durch Verwendung von Transformanten, die allein aktivierende BD-*R* und BD-*Rdel* Fusionsproteine enthalten, konnte gezeigt werden, daß die Aktivität der Reportergene durch die Gegenwart von AD-*InXS* oder AD-*InD*1 beeinflusst wird. Hierbei konnte gezeigt werden, daß die β-Galaktosidaseaktivität signifikant reduziert wurde. Dies allerdings nur bei BD-*R* Transformanten, die zusätzlich AD-*InXS* oder AD-*InD*1 Fusionsproteine synthetisieren. Sowohl AD-*InXS* als auch AD-*InD*1 scheinen mit BD-*R* zu interagieren und dadurch die aktivierende Funktion des BD-R Fusionsproteins zu hemmen. Der Versuchsansatz mit BD-*Rdel* statt BD-*R* zeigte keine signifikanten Änderungen in der Reportergenaktivtiät. Eine Interaktion mit BD-*Rdel* scheint nicht zu erfolgen (Abbildung 49).

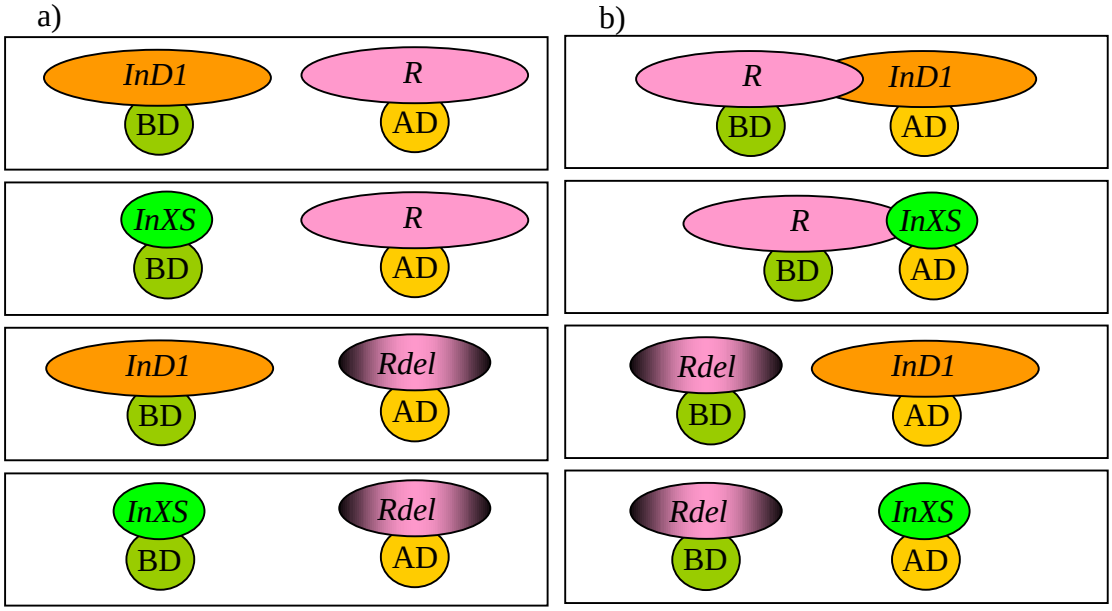

Abbildung 49: Interaktion der Fusionsproteine *InD1*, *InXS*, *R* und *Rdel*

Das BD-*R* Fusionsprotein kann sowohl mit AD-*InD1* als auch mit AD-*InXS* interagieren. Im reziproken Ansatz, d.h. mit den AD-*R* und AD-*Rdel* Fusionsproteinen in Kombination mit BD-*InD1* oder mit BD-*InXS* Fusionsproteinen, wurden davon abweichende Ergebnisse erhalten.
In Spalte (b) sind die reziproken Kombinationen von Spalte (a) gezeigt. Interagierende Fusionsproteine sind überlappend dargestellt.
AD von Gal4 (Aktivierungsdomäne, gelber Kreis), BD von Gal4 (DNA Bindedomäne, grüner Kreis)

In Untersuchungen mit Transformanten, welche *C1*, *InXS* und *InFus* Fusionsproteine zur Bildung von Homodimeren (AD-X + BD-X) enthalten, wurden keine aktiven Reportergene festgestellt. Dies deutet darauf hin, daß diese Fusionsproteine keine aktivierenden Homodimere bilden können (Abbildung 50). Von *InD1* scheinen dagegen Homodimere gebildet werden (Abbildung 50) zu können, da bei diesen Transformanten eine sehr schwache Aktivität des *HIS3* Reportergen nachgewiesen wurde. Eine Aktivität des zweiten Reportergens *lacZ*, wurde dagegen nicht beobachtet.

Bei Transformanten mit den allein aktivierenden BD-*R* Fusionsprotein in Kombination mit dem AD-*R* Fusionsprotein wurde eine Reduktion der Reportergenaktivität von *lac*Z beobachtet. Das läßt vermuten, daß ein *R*-Dimer gebildet wird (Abbildung 50), welches die Genaktivierung durch das BD-*R* hemmen kann.

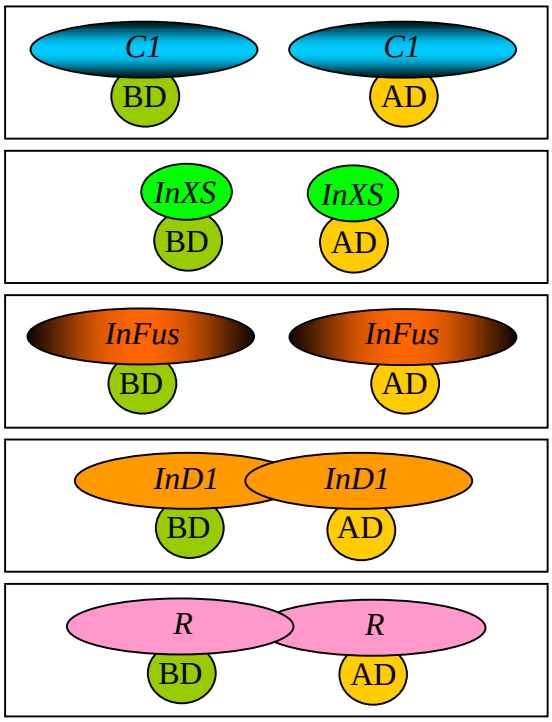

Abbildung 50: Bildung von Homodimeren

Transformanten mit *C1*, *InXS* oder *InFus* (als AD und BD-Fusionsproteine) zeigen keine aktiven Reportergene und können demzufolge keine aktivierenden Homodimere bilden. Von *InD1* scheinen Homodimere gebildet zu werden, die eine unterschiedliche Expression der Reportergene *HIS3* und *lacZ* verursachen. Die Transformanten die BD-*InD1* und AD-*InD1* Fusionsproteine synthetisieren, besitzen nur ein aktives Reportergen. Im Gegensatz zu dem *HIS3* Gen wurde, in diesen Transformanten, das *lacZ* Reportergens nicht aktiviert.
In Transformanten mit BD-*R* und AD-*R* wurde eine Reduktion der Reportergenaktivität von *lac*Z beobachtet. Das läßt vermuten, daß ein *R*-Dimer gebildet wird, welches die Genaktivierung durch das BD-R hemmen kann.
AD von Gal4 (Aktivierungsdomäne, gelber Kreis), BD von Gal4 (DNA Bindedomäne, grüner Kreis)

Die Ergebnisse der Untersuchungen zur *in vivo* Interaktion sind in Tabelle 14 zusammengefasst.

Tabelle 14 : Tabellarische Darstellung der Ergebnisse der *in vivo* Interaktion der BD-Fusionsproteine mit den AD-Fusionsproteinen

		AD-Fusionsproteine						
		AD-*R*	AD-*Rdel*	AD-*InXS*	AD-*InFus*	AD-*InD*1	AD-*C1*	*AD-C1-I*
BD Fusionsproteine	BD-*R*		NA		NA		NA	NA
	BD-*Rdel*	NA	NA	=	NA	=	NA	NA
	BD-*InXS*	-	-	-	NA	-	-	-
	BD-*InFus*	-	-	NA	-	-	-	+
	BD-*InD*1	-	-	-	-	+ nur *HIS*3	-	+
	BD-*C1*	+++	+++	-	+	+	-	NA
	BD-*C1-I*	++	++	-	+	+	NA	NA

Farbcode: Stärke der Aktivierung des Reportergens *lac*Z	**Redukt.**	ca 80 %	ca. 40 %	ca 20 %	ca. 10 %	ca. 5 %	0 %

+	Aktivierung der Reportergene *HIS*3 und *lac*Z, Anzahl der + gibt die Stärke an
-	keine Aktivierung der Reportergene *HIS*3 und *lac*Z
=	unverändert
NA	nicht analysiert

Es wurde der Einfluss verschiedener AD-Fusionsproteine auf die allein aktivierenden BD-*R* und BD-*Rdel* Fusionsproteine getestet. Ein hemmender Einfluss auf die Expression des *lacZ* Reportergens ist durch ein schraffiertes Feld markiert. Eine unveränderte Expression des *lacZ* Reportergens ist durch das Zeichen „ = “ markiert.

3.6.9 Two Hybrid cDNA Bank

In den hier vorgestellten Two Hybrid Experimenten konnte eine Interaktion des *InD1* Proteins mit *C1* und *C1-I* nachgewiesen werden. Diese Interaktion scheint dabei deutlich schwächer zu sein, verglichen mit der Interaktion zwischen *R* oder *Rdel* mit *C1* und *C1-I*. Dieser Unterschied könnte darauf zurückzuführen sein, daß *C1* und *C1-I* nicht die optimalen Interaktionspartner für *InD1* sind.

Um weitere und eventuell bessere Interaktionspartner für *InD1* zu finden, wurde eine Two Hybrid cDNA Bank hergestellt. Mit dieser Two Hybrid cDNA Bank ist es möglich, die Interaktion zwischen einem bekannten Protein und einer großen Anzahl unbekannter Proteine zu testen.

Hierfür wurde die poly-A+ RNA von Körnern der Wildtyp Linie LC isoliert, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Pollinierung geerntet wurden (0-22 DAP). Von dieser poly-A+ RNA wurde cDNA hergestellt und diese anschließend in den „Two Hybrid System“ Vektor pAD einkloniert. Diese pAD-cDNA Plasmide wurden freundlicherweise von Dr. Karsten Frenzel und Preeti Garg (AMP I , Universität Hamburg) zur Verfügung gestellt.

Diese pAD-cDNA Plasmide wurden in kompetente Zellen des BD-*InD1* Hefestammes transformiert und daraus eine „Two Hybrid cDNA Bank“ Dauerkultur hergestellt (2.2.5.4).

Die Analyse der Two Hybrid cDNA Bank hinsichtlich möglicher Interaktionspartner, erfolgt mit Hilfe der Reportergene *HIS*3 und *lac*Z. Diese Tests konnten im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr durchgeführt werden.

3.7 Untersuchungen zur *in vivo* Lokalisation des *Intensifier* Genproduktes

In den in dieser Arbeit vorgestellten Two Hybrid Experimenten wurde im begrenzten Umfang die Interaktion des *Intensifier* Genproduktes sowohl mit dem *C1* Protein als auch mit dem *R* Protein nachgewiesen. Es ist daher vorstellbar, daß das *Intensifier* Genprodukt mit *R* um das *C1* Protein konkurrieren könnten und so eine Regulation der *in vivio* Aktivität der Zielgene erfolgt.

Die Ergebnisse der Two Hybrid Experimente müssen nicht unbedingt der Situation in der Pflanzenzelle entsprechen. Es ist möglich, daß zwei Proteine miteinander interagieren können, diese aber in der lebenden Zelle niemals in Kontakt miteinander treten, da sie in verschiedenen Geweben, zu unterschiedlichen Zeiten oder in verschiedenen subzellulären Kompartimenten exprimiert werden.

Shieh *et al*. (1993) führten bereits zelluläre Lokalisationsstudien mit *R* durch. Sie fusionierten *R* mit dem Reporterprotein β-Glucoronidase (GUS) und transformierten Tabak und Zwiebelzellen. Hiermit konnte gezeigt werden, daß die *R*-GUS Fusionsproteine aufgrund von drei Kernlokalisierungssequenzen (NLS) aktiv in den Zellkern transportiert werden.

Sequenzvergleiche der *Intensifier* Proteine *In* und *InD* mit *R* und anderen myc-homologen Proteinen belegen eine große Ähnlichkeit dieser Proteine zueinander. Speziell in dem Bereich der basischen Helix-Loop-Helix Region, in der die mediale NLS von *R* liegt, besteht eine hohe Homologie. Die anderen zwei NLS sind dagegen nicht in den *In* und *InD* Aminosäuresequenzen konserviert (Abbildung 3, Seite 8).

Das Vorhandensein einer möglichen NLS in den *In* und *InD* Aminosäuresequenzen deutet darauf hin, daß diese Proteine ebenfalls im Zellkern lokalisiert sein könnten. Um festzustellen, ob sie und die *R* Proteine im selben Kompartiment der Zelle vorliegen, wurden *in vivo* Lokalisationsstudien mit dem grünen fluoreszierenden Protein (GFP) als Reporterprotein durchgeführt.

Die möglichen Funktionen des *Intensifer* Genproduktes werden kontrovers diskutiert. Das Genprodukt hat einen regulatorischen Einfluß auf die Strukturgene *C2* und *Whp*, die für das Schlüsselenzym Chalkonsynthase (CHS) des Anthocyanbiosyntheseweges kodieren. Ob dieser Einfluß auf der Ebene der Transkription, der post-Transkription oder auf der Ebene der Translation erfolgt ist noch nicht geklärt. Eine Lokalisation des *Intensifer* Genproduktes im Zellkern könnte sowohl auf einen Einfluß auf der Ebene der Transkription, als auch auf einen Einfluß auf der Ebene der post-Transkription hinweisen.

3.7.1 Herstellung der Expressionsplasmide

Die Lokalisation der *Intensifier* Proteine *In* und *InD1*, in Bezug auf den Kernimport, sollte mit zwei anderen Proteinen verglichen werden. Das *Zea mays* L. Strukturgen *C2* (Wienand *et al.*, 1986) kodiert für die Chalkonsynthase, dessen Aminosäuresequenz keine bekannten NLS enthält. Das *C2* Protein ist dadurch als negative Kontrolle für die Lokalisation im Zellkern geeignet. Als positive Kontrolle dient das, bereits für die Two Hybrid Experimente verwendete und charakterisierte, kernlokalisierte *R* Protein (Shieh *et al.*, 1993).

Eine Fusion der zu untersuchenden Proteine mit dem GFP Reporterprotein ist sowohl an das carboxyterminale Ende des GFP oder an das aminoterminale Ende des GFP Proteins möglich. Shieh *et al*. (1993) konnten mit aminoterminalen Fusionen (*R*-GUS) einen effizienteren Transport des Proteins in den Zellkern nachweisen, als mit carboxyterminalen Fusionen (GUS-R). Offensichtlich ist die Lage der NLS im transportierten Protein wichtig. Eine ähnliche Schlussfolgerung wurde aus den Untersuchungen mit dem *Opaque*-2 Protein gezogen (Varagona *et al*., 1992). Aus diesem Grund wurden die Fusionen der zu untersuchenden Proteine mit dem GFP ebenfalls aminoterminal durchgeführt.

Für diese Fusion mussten die STOPP Codons der cDNAs der korrespondierenden Proteine entfernt werden, um einen durchgängigen Leserahmen zu erhalten. Hierfür wurden ausschließlich die kodierenden Bereiche der cDNAs von *R*, *C2* und *InD1* mittels PCR und Pfx-DNA Polymerase amplifiziert (2.2.3.5). In Tabelle 15 sind die benötigten cDNAs, Primer und die Größen der amplifizierten Fragmente aufgelistet. Die hergestellten Fragmente wurden in die *Eco*RV/*Sma*I geschnittene (2.2.2.3) Plasmid DNA (2.2.2.2) des Vektors pBluescript II SK+ ligiert und vollständig sequenziert (2.2.4).

Dieser Weg über den pBluescript II SK+ wurde einer direkten Klonierung in den GFP Vektor pMon30049 vorgezogen. Wären bei der Sequenzierung des amplifizierten Fragmentes Fehler detektiert worden, so hätte dieser Bereich des DNA Fragmentes entfernt und durch DNA aus dem entsprechenden cDNA Plasmid ersetzt werden können. Dafür wären Schnittstellen benötigt worden, die nicht in dem GFP Vektor enthalten sind, sondern ausschließlich in dem zu klonierenden Fragment. Daher war eine direkte Subklonierung der PCR Produkte in den GFP Vektor nicht möglich.

Tabelle 15: Hergestellte GFP Expressionplasmide

DNA	5‘ Primer	3‘ Primer	amp. Frag. in kb	Restrikt. zur Orientierung	resultierendes Expressionsplasmid
pC2LCc46	Nat-Ol-29	Nat-Ol-30	1.5	*Sma*I	C2-GFP #443
pRLC2.5kb	Nat-Ol-26	Nat-Ol-31	2.2	*Bgl*II	R-GFP #577
2.1 InD	Nat-Ol-27	Nat-Ol-28	2.2	*Sma*I	InD1-GFP #474

Auflistung der für die PCR benötigten cDNAs, Primer und die Länge der amplifizierten Fragmente (amp. Frag.). Die Orientierung der Fragmente im GFP Vektor pMon30049 wurde durch Restriktion der Plasmid DNA festgestellt.

In den Sequenzen der amplifizierten Fragmente wurden keine Fehler festgestellt und die Fragmente konnten subkloniert werden.

Durch die in der PCR verwendeten Primer wurden zusätzliche *Bam*HI Schnittstellen eingeführt. Hierdurch konnten die Fragmente mittels *Bam*HI Restriktion aus der Plasmid DNA (2.2.2.1) des Vektor pBluescript II SK+ ausgeschnitten (2.2.2.3) und anschließend isoliert werden (2.2.3.3). Nach der Bestimmung der DNA Menge (2.2.2.5) erfolgte die Ligation (2.2.3.6) in die *Bam*HI geschnittene (2.2.2.3) Plasmid DNA (2.2.2.2) des GFP Vektors pMon30049.

Aufgrund der ungerichteten Klonierung in den Expressionsvektor (Abbildung 51) ergaben sich zwei mögliche Orientierungen des Fragmentes im Vektor. Um diese Orientierung festzustellen wurden aus 24 unabhängigen Bakterientransformanten die Plasmid DNA isoliert (2.2.2.1) und mit *Sma*I oder *Bgl*II geschnitten (2.2.2.3). Die Restriktionsfragmente wurden anschließen elektorphoretisch aufgetrennt (2.2.2.4) und anhand des verwendeten Standards bestimmt (2.2.2.5).

Die resultierenden Expressionsplasmide der positiven Bakterientransformanten und die Fusionsproteine wurden als *C2*-GFP (Plasmid #443), *R*-GFP (Plasmid #577) und *InD1*-GFP (Plasmid # 474) bezeichnet (Tabelle 15).

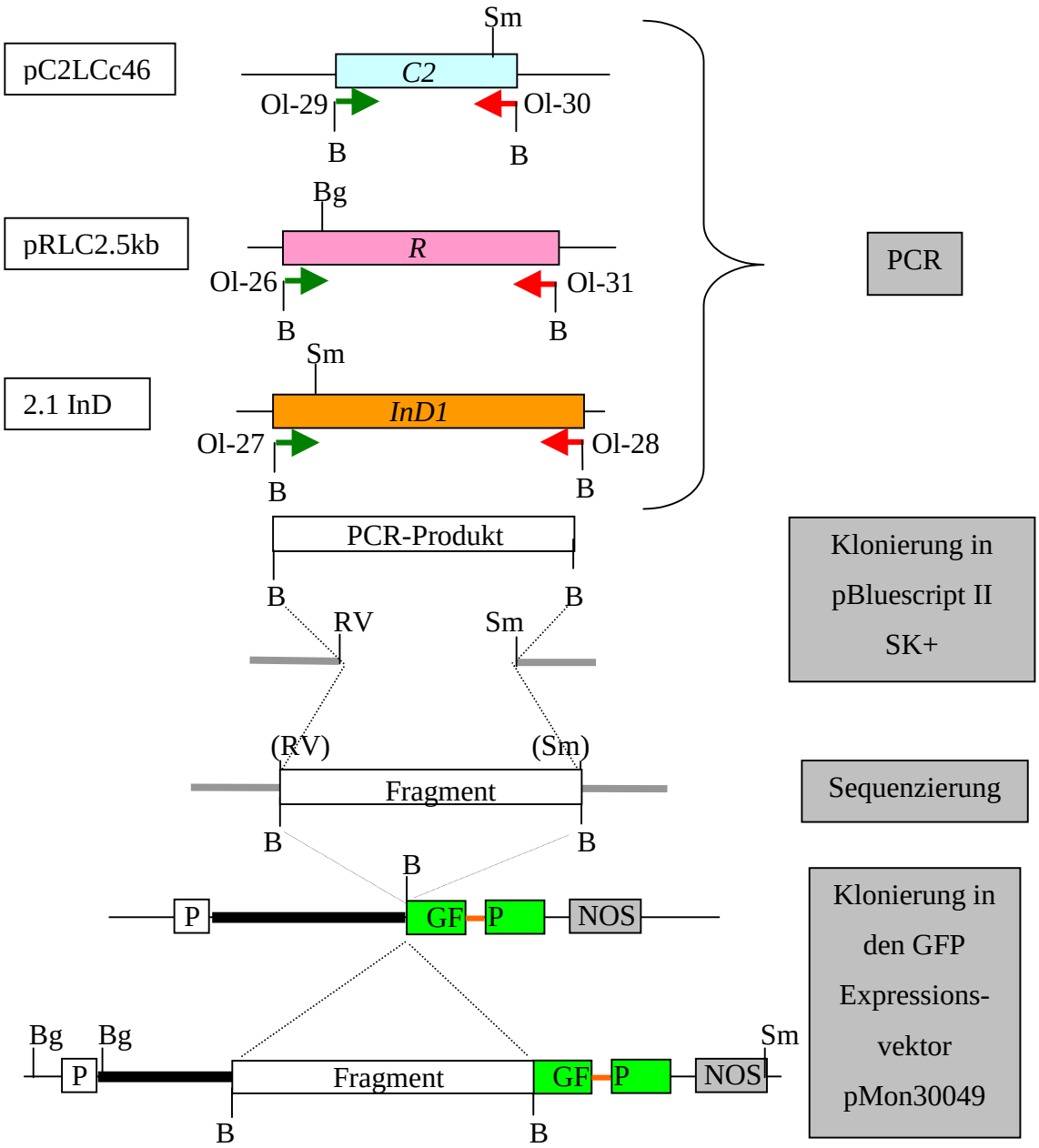

Abbildung 51: Herstellung der GFP Expressionsplasmide von *C2*, *R* und *InD1*

Der kodierende Bereich von *C2* (hellblaue Box), *R* (rosa Box) und *InD1* (orange Box) wurde aus den entsprechenden cDNAs (pC2LCc46, pRLC2.5kb, 2.1 InD) per PCR amplifiziert. Hierfür wurden die Primer (rote und grüne Pfeile) Ol-26 bis Ol-31 verwendet, die eine zusätzliche *Bam*HI (B) Schnittstelle enthalten. Die PCR Produkte wurden in die *Eco*RV (RV)/ *Sma*I (Sm) Schnittstelle von pBluescript II SK+ einkloniert und vollständig sequenziert. Anschließend wurden die Fragmente mit *Bam*HI ausgeschnitten und ungerichtet in die *Bam*HI Schnittstelle des GFP Expressionsvektors pMon30049 kloniert. Die Orientierung der Fragmente im Vektor wurde durch Restriktion mit *Sma*I oder *Bgl*II (Bg) festgestellt. Die resultierenden Expressionsplasmide und Fusionsproteine wurden als *C2*-GFP, *R*-GFP und *InD1*-GFP bezeichnet.
Das GFP (GFP) steht unter der Kontrolle des verstärkten 35S CaMV Promotors (P) und ist zwischen dem Hsp70 Intron (fette Linie) und dem Nopalin Synthase Terminator (NOS) lokalisiert. Das GFP enthält das zusätzliche pflanzliche Intron ST-LS1 (rote Linie). Die für die Klonierung benötigten Schnittstellen sind in den kodierenden Bereichen und in den Vektoren markiert.

Für die Herstellung des *InFus* Expressionsplasmids wurde das bereits für die Two Hybrid Experimente verwendete Fusionskonstrukt (aus Teilen von *In* und *InD*) verwendet (Abbildung 12, Seite 53). Das ca. 2,2 kb lange *InFus* Konstrukt wurde aus der DNA (2.2.2.1) des Plasmids #685 mittels *Bam*HI Restriktion ausgeschnitten (2.2.2.3) und das entsprechnde Fragment isoliert (2.2.3.3). Nach der Bestimmung der DNA Menge (2.2.2.5) erfolgte die ungerichtet Ligation (2.2.3.6) in die *Bam*HI (2.2.2.3) geschnittene Plasmid DNA (2.2.2.2) des GFP Vektors pMon30049.

Aufgrund der ungerichteten Klonierung in die *Bam*HI Schnittstelle des Expressionsvektors ergaben sich zwei mögliche Orientierungen des Fragmentes (Abbildung 52). Um diese Orientierung festzustellen wurden aus 24 unabhängigen Bakterientransformanten die Plasmid DNA isoliert (2.2.2.1) und mit *Sma*I geschnitten (2.2.2.3). Die Restriktionsfragmente wurden anschließen elektorphoretisch aufgetrennt (2.2.2.4) und anhand des verwendeten Standards bestimmt (2.2.2.5).

Das resultierende Expressionsplasmid des positiven Bakterientransformanten und das Fusionsprotein wurde als *InFus*-GFP (Plasmid # 808) bezeichnet.

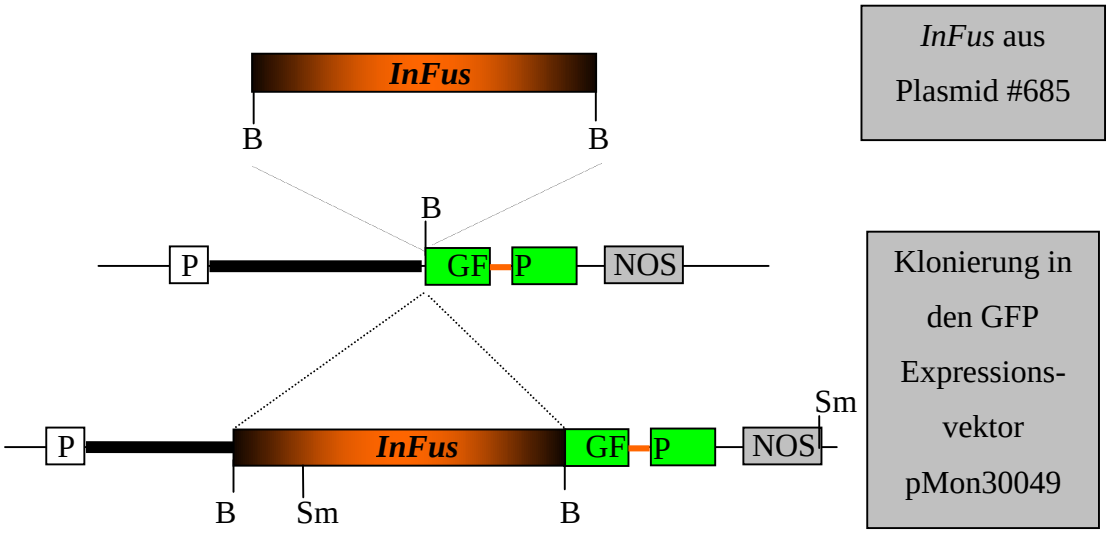

Abbildung 52: Herstellung des GFP Expressionsplasmids von *InFus*

Für die Herstellung des *InFus* Expressionsplasmids wurde das bereits für die Two Hybrid Experimente verwendete Fusionskonstrukt *InFus* (aus Teilen von *In* und *InD*) verwendet (Abbildung 12, Seite 53). Das ca. 2,2 kb lange *InFus* Konstrukt wurde aus dem Plasmid #685 mittels *Bam*HI (B) Restriktion ausgeschnitten und ungerichtet in die *Bam*HI Schnittstelle des GFP Vektors pMon30049 einkloniert. Die Orientierung des Fragmentes im Vektor wurde durch die Restriktion mit *Sma*I (Sm) festgestellt.
Das GFP (GFP) steht unter der Kontrolle des verstärkten 35S CaMV Promotors (P) und ist zwischen dem Hsp70 Intron (fette Linie) und dem Nopalin Synthase Terminator (NOS) lokalisiert. Das GFP enthält das zusätzliche pflanzliche Intron ST-LS1 (rote Linie). Die für die Klonierung benötigten Schnittstellen sind in den kodierenden Bereichen und in den Vektoren markiert.

Um die korrekte Klonierung im richtigen Leserahmen zu gewährleisten, wurden alle im Rahmen dieser Arbeit hergestellten GFP Expressionsplasmide durch Sequenzierung der Fusionsstelle überprüft. Die resultierenden GFP Fusionsproteine sind in Abbildung 53 schematisch dargestellt.

Expressions plasmide	**Fusionsproteine**	**MW in kDa**
C2-GFP	*C2* GFP	~ 71
R-GFP	*R* GFP	~ 94
InD1-GFP	*InD1* GFP	~ 102
InFus-GFP	*InFus* GFP	~ 103
GFP	GFP	~ 27

Abbildung 53: Schematische Darstellung der GFP Fusionsproteine

Die Proteine *C2*, *R*, *InD1* und *InFus* wurden mit dem aminoterminalen Ende des GFP Proteins fusioniert. Die Molekulargewichte (MW) der Fusionsproteine sind in Kilo Dalton (kDA) angegeben. Die gelbe Markierung in den *R*, *InD1* und *InFus* Proteinen markiert die basische Helix-Loop-Helix Region. Hier befindet sich eine charakterisierte Kernlokalisierungssequenz (Shieh *et al*.,1993) in der Aminosäuresequenz von *R*.

3.7.2 Nachweis der GFP Fusionsproteine in transient transformiertem Maisscutellumgewebe durch Fluoreszenzmikroskopie

Die verschiedenen GFP Expressionsplasmide wurden mittels biolistischer Transformation (2.2.7) zunächst in Maisscutellum getestet, da es sich hierbei um embryogenes stoffwechselaktives Gewebe handelt. Des weiteren waren hierfür die optimalen Bedingungen bereits in der Arbeitsgruppe standardisiert (Brettschneider *et al.*, 1997). Die transiente Expression der GFP Proteine ohne zusätzliches Fusionsprotein diente als Kontrolle für die erfolgreiche Transformation der Zellen.

Für jede Transformation wurden 10-15 Maisembryonen (14-26 DAP) steril isoliert, auf osmotischem Medium mit der Scutellumseite nach oben ausgelegt und vier Std. bei RT inkubiert. In direktem Anschluss erfolgte die biolistische Transformation. Nach einer 18-24 stündigen Inkubation erfolgte der Nachweis der Expression der Proteine (GFP, *C2*-GFP, *R*-GFP, *InD*-GFP) durch Fluoreszenzmikroskopie mit dem Zeiss Axioskop bei 50 und 100 facher Vergrößerung (2.2.8).

Die Gewebe zeigen unterschiedlich starke Fluoreszenz. Im Vergleich zum nichttransformierten Scutellumgewebe (Abbildung 54), sind mit dem GFP Protein viele und große grünliche Punkte zu sehen, die sich deutlich vom hellgrünen Hintergrund abheben (Abbildung 55).

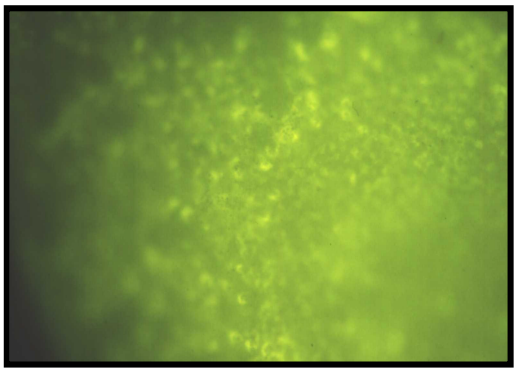

Abbildung 54: nichttransformiertes Maisscutellumgewebe

Das Scutellumgewebe zeigt bei Anregung mit UV-Licht eine geringe gelbgrüne Autofluoreszenz.
Das nichttransformierte Mais Scutellumgewebe ist in 100 facher Vergrößerung dargestellt.

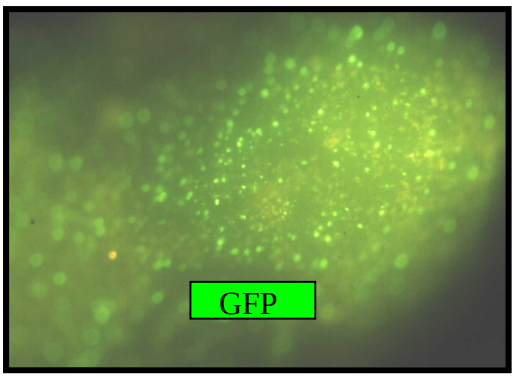

Abbildung 55: GFP exprimierendes Maisscutellumgewebe

Mais Scutellumgewebe wurde mit dem GFP Plasmid transient transformiert und anschließend auf Expression des GFP Proteins (farbige Box) untersucht. Die exprimierenden Zellen sind als leuchtend grüne Punkte zu identifizieren.
Das transformierte Mais Scutellumgewebe ist in 100 facher Vergrößerung dargestellt.

Vermutlich verteilen sich die GFP Proteine in dieser Region in der ganzen Zelle. Die teilweise verschwommenen Punkte sind Signale, die sich, aufgrund der gewölbten Form des Scutellums, ausserhalb des Fokus befinden.

Mit dem *C2*-GFP Fusionsprotein wurden, bezüglich der Fluoreszenzintensität und Anzahl, die gleichen Beobachtungen, wie mit dem nichtfusionierten GFP Protein gemacht.

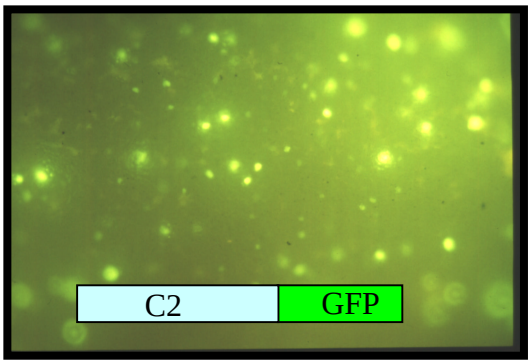

Abbildung 56: *C2*-GFP exprimierendes Maisscutellumgewebe

Mais Scutellumgewebe wurde mit dem *C2*-GFP Plasmid transient transformiert und anschließend auf das synthetisierte C2-GFP Fusionsprotein (farbige Box) untersucht. Die exprimierenden Zellen sind als leuchtend grüne Punkte zu identifizieren. Die Signalstärke und Anzahl zeigen keinen Unterschied im Vergleich zum nichtfusionierten GFP (Abbildung 55).
Das transformierte Mais Scutellumgewebe ist in 100 facher Vergrößerung dargestellt.

Im Gegensatz hierzu wurden in *R*-GFP exprimierendem Maisscutellum nur sehr kleine und wenige Punkte beobachtet (Abbildung 57). Die Intensität der Fluoreszenz ist deutlich schwächer, verglichen mit den Maisscutellumgeweben in welchen die GFP oder *C2*-GFP Fusionproteine synthetisiert werden.

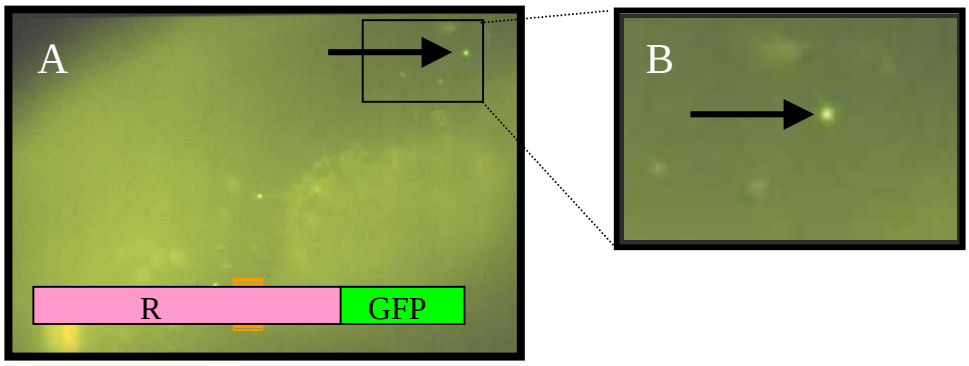

Abbildung 57: *R*-GFP exprimierendes Maisscutellumgewebe

Mais Scutellumgewebe wurde mit dem *R*-GFP Plasmid transient transformiert und anschließend auf das synthetisierte *R*-GFP Fusionsprotein (farbige Box) untersucht. Im Gegensatz zu GFP und C2-GFP sind die *R*-GFP exprimierenden Zellen nur als wenige und schwach leuchtende grüne Punkte zu identifizieren (A,B). Die Ursache für die geringe Größe der Signale könnte an der Lokalisation der *R*-GFP Fusionsprotein in der Zelle liegen. Hierbei handelt es sich um ein kernlokalisiertes Protein, die sich demzufolge nur in einem kleinen Bereich der Zelle ansammelt.
Das transformierte Mais Scutellumgewebe ist in 100 facher Vergrößerung dargestellt. (B) zeigt eine Ausschnittsvergrößerung von (A).

Die geringe Größe der Signale mit dem *R*-GFP Fusionsprotein könnte an der Lokalisation des *R* Proteins in der Zelle liegen. Es handelt sich hierbei um ein kernlokalisiertes Protein, das sich demzufolge nur in einem kleinen Bereich der Zelle ansammelt.
Auch bei wiederholten Versuchen konnten nur wenige Signale detektiert werden. Möglicherweise liegen in der Zelle Mechanismen vor, die überexprimierte *R* (-GFP) Proteine oder RNAs abbauen, da die Zellfunktion sonst gestört würde. Dieser Abbau könnte demzufolge detektierbares (R-) GFP Protein reduzieren und die nur selten beobachteten fluoreszierenden Punkte erklären.

In *InD1*-GFP exprimierendem Maisscutellum wurden ebenfalls nur sehr wenige und kleine grüne Punkte beobachtet. Offensichtlich ist das *InD1*-GFP Fusionsprotein nicht wie die GFP oder *C2*-GFP Fusionsproteine in der ganzen Zelle, sondern nur in einem Teil der Zelle vorhanden. Diese Beobachtungen entsprechen den Ergebnissen, die mit dem *R*-GFP Fusionsprotein gemacht wurden und weisen auf eine Kernlokalisation des *InD1*-GFP Fusionsproteins hin.

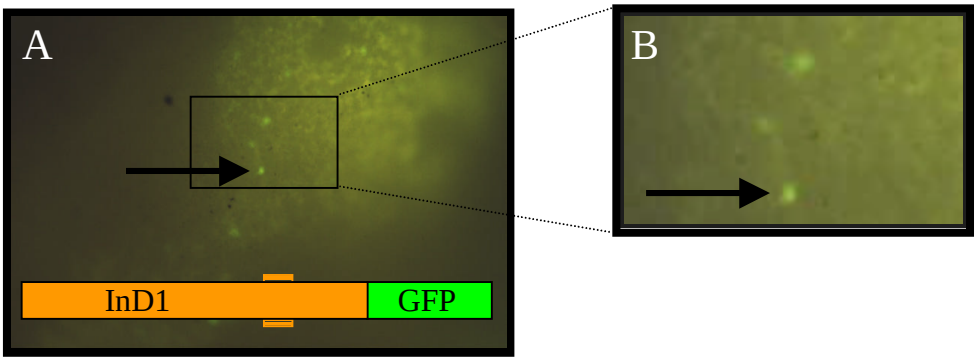

Abbildung 58: *InD1*-GFP exprimierendes Maisscutellumgewebe

Mais Scutellumgewebe wurde mit dem *InD1*-GFP Plasmid transient transformiert und anschließend auf das synthetisierte *InD1*-GFP Fusionsprotein (farbige Box) untersucht. Die *InD1*-GFP exprimierenden Zellen sind nur als wenige und schwach leuchtende grüne Punkte zu identifizieren (A, B). Diese Beobachtungen entsprechen den Ergebnissen, die mit dem *R*-GFP Fusionsprotein gemacht wurden (Abbildung 57) und weisen auf eine Kernlokalisation des *InD1*-GFP Fusionsproteins hin.
Das transformierte Mais Scutellumgewebe ist in 100 facher Vergrößerung dargestellt. (B) zeigt eine Ausschnittsvergrößerung von (A).

Das *InFus*-GFP Expressionsplasmid lag erst zu einem Zeitpunkt vor, an dem die Versuche mit Maisscutellumgewebe bereits abgeschlossen waren. Das *InFus*-GFP Expressionsplasmid wurde daher nicht in Maisscutellumgewebe getestet.

3.7.3 Nachweis der GFP Fusionsproteine in transient transformierten Geweben durch Fluoreszenzmikroskopie

Da das Maisscutellum ein dichter Gewebeverband ist, konnten einzelne Zellen nicht genauer analysiert werden. Es war darum nicht möglich Strukturen wie z.B. den Zellkern zu identifizieren. Für die Untersuchung von Einzelzellen wurde daher nach anderen Geweben für die transiente Transformation gesucht. Zunächst wurden typische Gewebe für transiente Expressionsstudien wie Tabakblätter (Nicotiana tabaccum) und eine Maissuspensionskultur (Allen *et al*., 1993) verwendet. Für diese Vorversuche wurde nur der GFP Vektor pMon30049 transient transformiert.

Es wurde vermutet, daß die zu untersuchenden GFP Fusionsproteine Co-Faktoren benötigen die nicht in Tabak vorhanden sind. Daher wurden zusätzlich auch Maisblätter getestet. Als weiteres Maisgewebe wurden die Narbenfäden von unbestäubten Maiskolben getestet. Es konnte beobachtet werden, das die Narbenfäden innerhalb eines Tages mehrere Zentimeter wachsen können. Bei ihnen handelt es sich demzufolge um sehr teilungs- und stoffwechselaktives Gewebe. Da sie leicht und in großen Mengen zu erhalten sind, boten sie sich als Gewebe für die transiente Expression an.

Shieh *et al*. (1993) konnten nach der Transformation von epidermalen Zellen der Zwiebel (*Allium cepa*), bereits die Kernlokalisation des *In* homologen Proteins *R* nachweisen. Die Zellen der Zwiebelepidermis eignen sich besonders gut für die Kernlokalisationsstudien, da diese groß und relativ transparent sind und als einzelne Zellschicht vorliegen. Aus diesen Gründen wurden ebenfalls Zwiebelzellen getestet.

Von steril angezogenen Tabakpflanzen wurden junge Blätter abgeschnitten und auf Wasseragar ausgelegt. Von ca. 14 Tage alten Maispflanzen wurden 1,5 cm lange Blattstücke abgeschnitten und ebenfalls mit der Blattunterseite auf 8 %igem Wasseragar ausgelegt. Anschließend erfolgte die biolistische Transformation (2.2.7). Wenn nicht extra aufgeführt, gelten die gleichen Parameter für die biolistische Transformation, die für die transiente Transformation von Maisembryonen verwendet wurden.

Nach der biolistischen Transformation erfolgte der Nachweis der Expression durch Fluoreszenzmikroskopie bei 200 facher Vergrößerung (2.2.8). Bei den Mais- und Tabakblättern konnte eine hohe Autofluoreszenz durch das Chlorophyll beobachtet werden. Trotz dieser roten Hintergrundfluoreszenz konnten GFP exprimierende Zellen gut durch die grüne Fluoreszenz identifiziert werden. Um zu dokumentieren, daß es sich bei den grünen Signalen um Einzelzellen handelt, wurde das Gewebe unter Weisslicht betrachtet. Aufgrund

des Blattaufbaus wurde festgestellt, daß mehrere Zellschichten übereinander lagen und keine befriedigende Dokumentation unter Weisslicht möglich war (Daten nicht gezeigt). Aufgrund dieser Ergebnisse wurden die Blätter für die transienten Expressionanalysen nicht weiter eingesetzt.

Ca. 5 ml einer Maissuspensionskultur der Linie „Black Mexican Sweet“ wurden durch Pipettieren auf steriles, trockenes Whatmanpapier von dem Medium befreit. Nach der biolistischen Transformation wurden die Zellen wieder in eine Petrischale mit Medium überführt. Die Analysen bei UV Licht ergaben, dass die Zellen der Maissuspensionskultur zu große Aggregate bilden, wodurch auch hier keine Einzelzellen erkennbar waren. Sie waren deshalb für die Untersuchung ebenfalls nicht geeignet (Daten nicht gezeigt).

Von unbestäubten Maiskolben verschiedener Linien (LC, H99, A188, Q2) wurde ein ca. 10 cm langer Bereich der Narbenfäden abgeschnitten und als ca. 1,5 cm lange Segmente parallel auf osmotischem Medium ausgelegt. Nach vier Std. Inkubation erfolgte die biolistische Transformation. Die Analyse, bei 200-400 facher Vergrößerung im UV Licht, zeigt eine hohe Autofluoreszenz, wie sie auch bei den Mais- und Tabakblättern beobachtet wurde. Hinter diesem roten Hintergrund wurden einzelne sehr langgezogene grün fluoreszierende Zellen identifiziert (Abbildung 59). Das GFP wurde im Zytoplasma und auch im Bereich der Zellkerne detektiert. Aufgrund des mehrschichtigen Gewebes war keine befriedigende Dokumentation unter Weisslicht möglich (Daten nicht gezeigt).

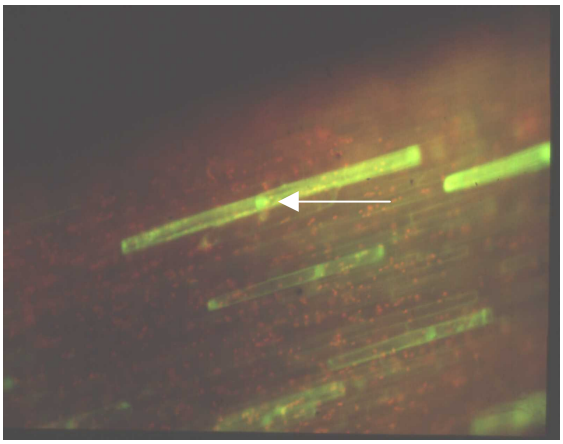

Abbildung 59: GFP Expression in Narbenfäden von Mais

Narbenfäden von Mais wurden mit dem GFP Vektor transient transformiert und anschließend auf das synthetisierte GFP Protein untersucht. Bei Anregung mit UV-Licht konnte eine hohe Autofluoreszenz durch das Chlorophyll beobachtet werden. Trotz dieser roten Hintergrundfluoreszenz konnten die GFP Protein synthetisierenden Zellen als einzelne grün fluoreszierende Signale identifiziert werden. Die Lage eines Zellkerns ist mit einem Pfeil markiert. Das Gewebe ist in 200 facher Vergrößerung dargestellt.

In einigen Fällen wurde eine GFP Expression in Trichomzellen beobachtet. Diese fluoreszierten nur grün, da sie aufgrund fehlender Chloroplasten, keine Autofluoreszenz zeigten. Es konnte hierbei eine GFP Protein Anhäufung im Zytoplasma und im Bereich der Zellkerne beobachtet werden. Die Trichome der Linien LC und H99 bestehen aus wenig verzweigten Zellen und ihre Transformationsrate war dadurch relativ gering. Der Bereich der GFP exprimierenden Zellen lag zudem oftmals aus der fokussierenden Ebene heraus, so dass nur ein Teil der Zelle zu dokumentieren war. Geeignete Zellen wurden deshalb nur selten

beobachtet, so dass die Narbenfäden der Linien LC und H99 für weitere Analysen ungeeignet erschienen (Abbildung 60).

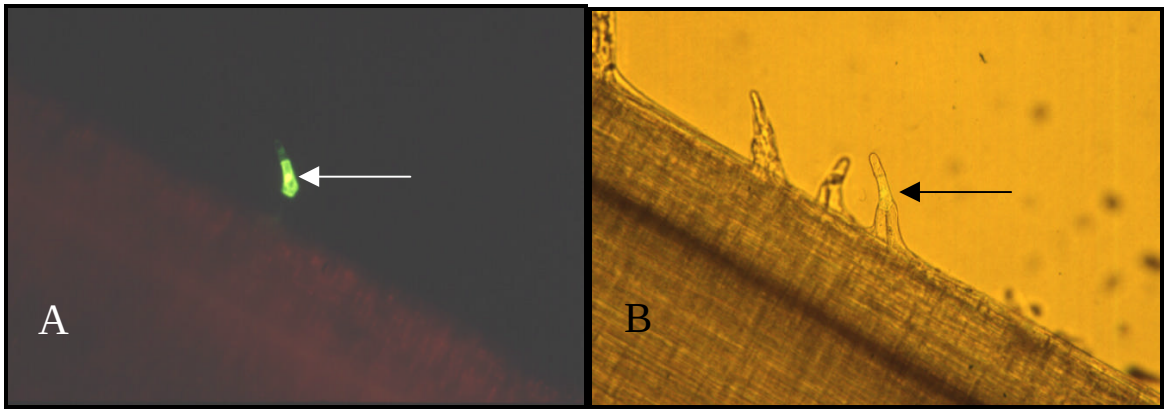

Abbildung 60: GFP Expression in Narbenfäden von Mais der Linie LC

Narbenfäden von Mais wurden mit dem GFP Vektor transient transformiert und anschließend auf das synthesierte GFP Protein untersucht. Bei Anregung mit UV-Licht konnten die GFP Protein synthetisierenden Trichomzellen als einzelne grün fluoreszierende Signale identifiziert werden (A). Im normalen Weißlicht sind die Zellen der wenig verzweigten Trichome gut zu erkennen (B).
Die Lage eines Zellkerns ist mit einem Pfeil markiert. Das Gewebe ist in 200 facher Vergrößerung dargestellt.

Die Trichomzellen der Linien A188 und Q2 sind, im Vergleich zu LC und H99, stark verzweigt, wodurch eine bessere Transformationsrate beobachtet wurde. Hier wurde, wie auch schon bei den Linien LC und H99, eine Anhäufung der GFP Proteine im Zytoplasma und im Bereich der Zellkerne beobachtet. Die Trichomzellen stehen jedoch dicht beieinander, womit sie den Charakter eines mehrschichtigen Gewebes haben. Dadurch sind Einzelzellen bei Weisslicht nicht zu dokumentieren. Diese Linien waren dadurch ebenfalls nicht für weitere Untersuchungen geeignet (Abbildung 61).

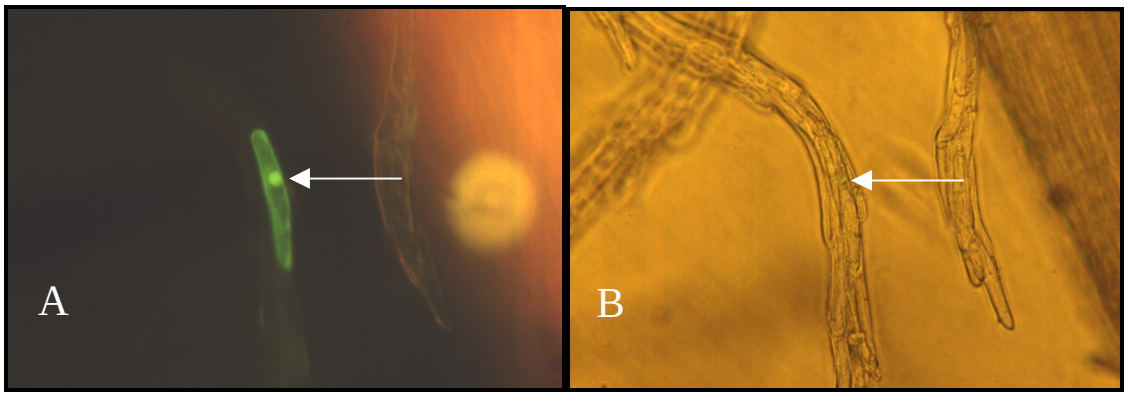

Abbildung 61: GFP Expression in Narbenfäden von Mais der Linie Q2

Narbenfäden von Mais wurden mit dem GFP Vektor transient transformiert und anschließend auf synthetisierte GFP Protein untersucht. Bei Anregung mit UV-Licht konnten die GFP Protein synthetisierenden Trichomzellen als einzelne grün fluoreszierende Signale identifiziert werden (A). Dagegen sind im normalen Weißlicht keine Einzelzellen zu erkennen (B). Der Grund hierfür liegt in der starken Verzweigung der Trichome, woadurch sie den Charakter eines mehrschichtigen Gewebes haben. Die Lage eines Zellkerns ist mit einem Pfeil markiert. Das Gewebe ist in 200 facher Vergrößerung dargestellt.

Von Zwiebelschalen wurde die epidermale transformierte Zellschicht abgezogen und bei 100 facher Vergrößerung unter UV Licht betrachtet. Pro Zwiebelhaut konnten ca. 2-5 transformierte Zellen beobachtet werden (Abbildung 62). Die GFP Proteine wurden, wie auch bei den Narbenfäden beobachtet, im Zytoplasma und im Bereich der Zellkerne detektiert. Die Zellen zeigten unterschiedliche Intensitäten der GFP Fluoreszenz, vermutlich aufgrund unterschiedlicher Expressionsstärken des GFP-Gens. Die umgebenden Zellen zeigten hierbei nur eine sehr geringe Autofluoreszenz. Strukturen wie Zellkern oder Zellwand waren gut zu identifizieren. Aufgrund dieser Ergebnisse wurden die Zwiebelzellen als Modellsystem für die weitere Untersuchung der Lokalisation der Proteine *C2*-GFP, *R*-GFP, *InD*1-GFP und *InFus*-GFP verwendet.

Damit möglichst viele Zellen untersucht und miteinander verglichen werden konnten, musste zunächst die Transformationsrate des Gewebes erhöht werden.

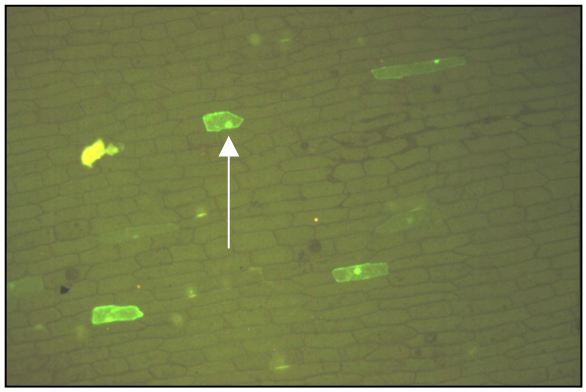

Abbildung 62: GFP Expression in den Epidermiszellen der Zwiebel

Epidermale Zwiebelzellen wurden mit dem GFP Vektor transient transformiert und anschließend auf das synthetisierte GFP Protein untersucht. Bei Anregung mit UV-Licht konnten die GFP Protein synthetisierenden Zellen als einzelne grün fluoreszierende Signale identifiziert werden. Die Lage eines Zellkerns ist mit einem Pfeil markiert. Das Gewebe ist in 50 facher Vergrößerung dargestellt.

3.7.4 Bestimmung der Parameter für die biolistische Transformation von epidermalen Zwiebelzellen

Die Transformationseffizienz der Particle Gun kann durch verschiedene Parameter optimiert werden. Hierzu gehören die Goldpartikelgröße, der Druck, das Vakuum und die Abstände zwischen Berstscheibe, Stoppnetz und Probenplatte (Sanford *et al*., 1993). Zudem fanden sich für die Transformation von Zwiebelzellen in der Literatur verschiedene Angaben zur Herstellung der Goldpartikel und der DNA-Menge, die an die Goldpartikel gebunden wurde.

Nach dem Vergleich verschiedener Literaturquellen wurde beschlossen, die Goldsuspension mit 5 µg DNA pro Schuss nach der Methode von Unseld *et al*. (2001) herzustellen. Zusätzlich wurden die Parameter Goldpartikelgröße (0,3 µm, 1 µm, 1,6 µm) und Abstand der Berstscheibe zum Gewebe (Etage 4 oder 5) variiert. Das Vakuum (28 inch) und der Druck (1100 psi) wurden nicht verändert.

18-24 Std. nach der biolistischen Transformation (2.2.7) wurde die epidermale Zwiebelhaut bei UV Licht betrachtet (2.2.8). Hierbei konnte mit Goldpartikeln von 1,6 µm und Etage 5 die höchste Transformationsrate (10-50 Zellen pro Zwiebelhaut) festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Mit diesen Bedingungen wurden anschließend alle GFP Plasmide transient exprimiert.

3.7.5 Nachweis der GFP Fusionsproteine in transient transformierten Epidermiszellen der Zwiebel durch Fluoreszenzmikroskopie

Epidermale Zwiebelzellen wurden mit den verschiedenen GFP Plasmiden transient transformiert und anschließend auf die Synthese der Proteine (GFP, *C2*-GFP , *R*-GFP , *InD*-GFP, *InFus*-GFP) durch Fluoreszensmikroskopie untersucht.

In transient transformierten Zwiebelzellen wurde eine starke GFP Protein Anhäufung im Zytoplasma und im Bereich der Zellkerne beobachtet. Die stärkste Ansammlung wurde hierbei im Bereich der Zellkerne detektiert. (Abbildung 63). Das GFP Protein hat ein Molekulargewicht von nur 27 kDa. Aufgrund dieser geringen Größe ist es in der Lage, auch passiv in den Zellkern zu diffundieren. Ein möglicher Grund für eine verstärkte Anhäufung im Zellkern könnte in einer beeinträchtigten Diffusion der GFP Proteine aus dem Zellkern liegen.

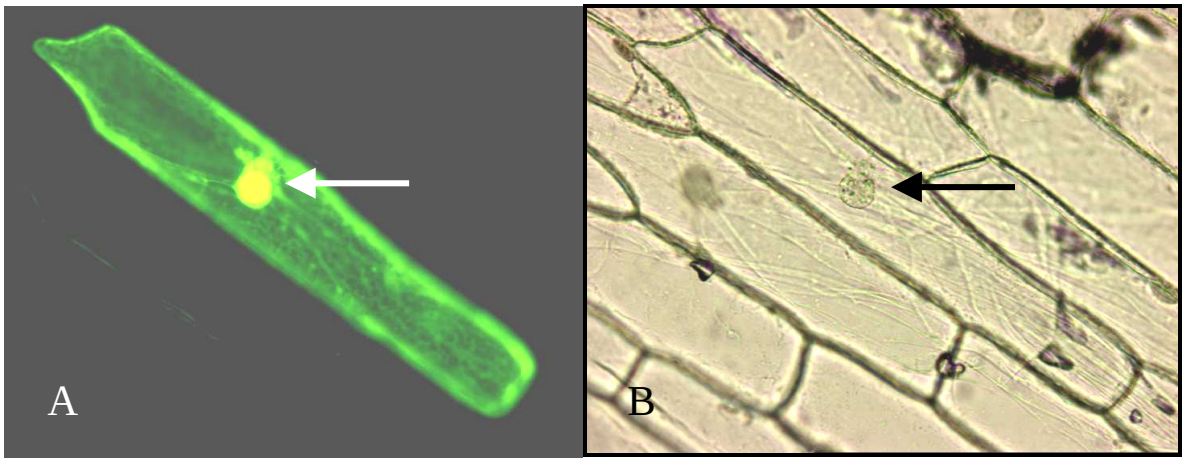

Abbildung 63: GFP Expression in den Epidermiszellen der Zwiebel

Epidermale Zwiebelzellen wurden mit dem GFP Vektor transient transformiert und anschließend auf das synthetisierte GFP Protein untersucht. Es wurde eine GFP Protein Anhäufung im Zytoplasma und im Zellkern beobachtet (A). Aufgrund der geringen Größe der GFP Proteine sind diese in der Lage passiv in den Zellkern zu diffundieren.
Das Bild A zeigt die transformierte Epidermiszelle der Zwiebel bei UV-Licht, das Bild B zeigt die Zelle im Zellverband bei normalem Weisslicht. Die Lage eines Zellkerns ist mit einem Pfeil markiert. Das Gewebe ist in 200 facher Vergrößerung dargestellt.

Im Vergleich zu dem GFP Protein zeigten Zwiebelzellen mit dem *C2*-GFP Fusionsprotein eine schwächere Ansammlung der Proteine im Zytoplasma. Des weiteren wurde nur eine schwache Ansammlung des *C2*-GFP Fusionsproteins im Bereich der Zellkerne festgestellt, deren Intensität der Fluoreszenz im Bereich des Zytoplasmas entsprach (Abbildung 64).

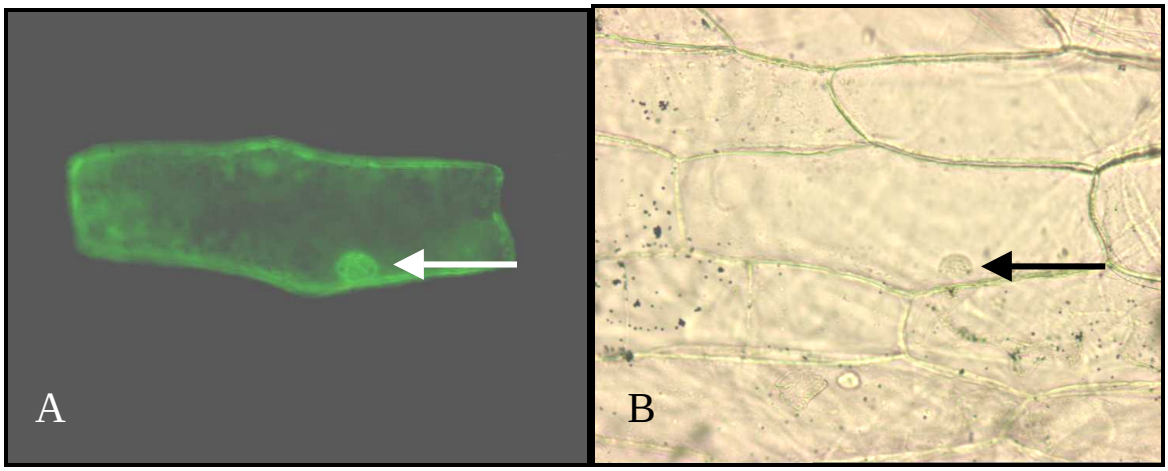

Abbildung 64: *C2*-GFP Expression in den Epidermiszellen der Zwiebel

Epidermale Zwiebelzellen wurden mit dem *C2*-GFP Expressionsplasmid transient transformiert und anschließend auf das synthetisierte *C2*-GFP Protein untersucht. Im Vergleich zu dem GFP Protein wurde eine schwächere Anhäufung der *C2*-GFP Fusionsproteine im Zytoplasma und im Bereich des Zellkerns festgestellt. Die Fluoreszenz im Bereich des Zellkerns entsprach der Intensität im Bereich des Zytoplasmas. Aufgrund der Größe der *C2*-GFP Fusionsproteine sind sie nicht in der Lage passiv in den Zellkern zu diffundieren. Die Proteine besitzen keine Signalsequenz für den aktiven Kerntransport und gelangen demzufolge nicht in den Zellkern.
Das Bild A zeigt die transformierten Epidermiszelle der Zwiebel bei UV-Licht, das Bild B zeigt die Zelle im Zellverband bei normalem Weisslicht. Der Zellkern ist mit einem Pfeil markiert. Das Gewebe ist in 200 facher Vergrößerung dargestellt.

Das putative *C2*-GFP Fusionsprotein hat ein Molekulargewicht von 94 kDa, wodurch es zu groß ist, um passiv in den Zellkern zu diffundieren. Proteine, die größer als 40 kDa sind, benötigen bestimmte Signalsequenzen für den aktiven Transport. Das *C2*-GFP Fusionsprotein scheint keine dieser Signalsequenzen zu enthalten und gelangt daher nicht in den Zellkern. Die schwache Fluoreszenz der Zellkerne wird vermutlich nur durch das den Zellkern umgebende Zytoplasma hervorgerufen, in welchem sich die fluoreszierenden *C2*-GFP Fusionsproteine befinden.

Im Gegensatz zu den Beobachtungen mit dem *C2*-GFP Fusionsprotein wurde eine Anhäufung der *R*-GFP Fusionsproteine ausschließlich im Bereich der Zellkerne beobachtet (Abbildung 65). Aufgrund der bekannten Signalsequenzen in dem *R*-GFP Fusionsprotein wird es aktiv in den Zellkern transportiert. In einigen Fällen konnte zusätzlich eine Ansammlung im Zytoplasma beobachtet werden, jedoch nur wenn der Zellkern sehr stark fluoreszierte (Daten nicht gezeigt).

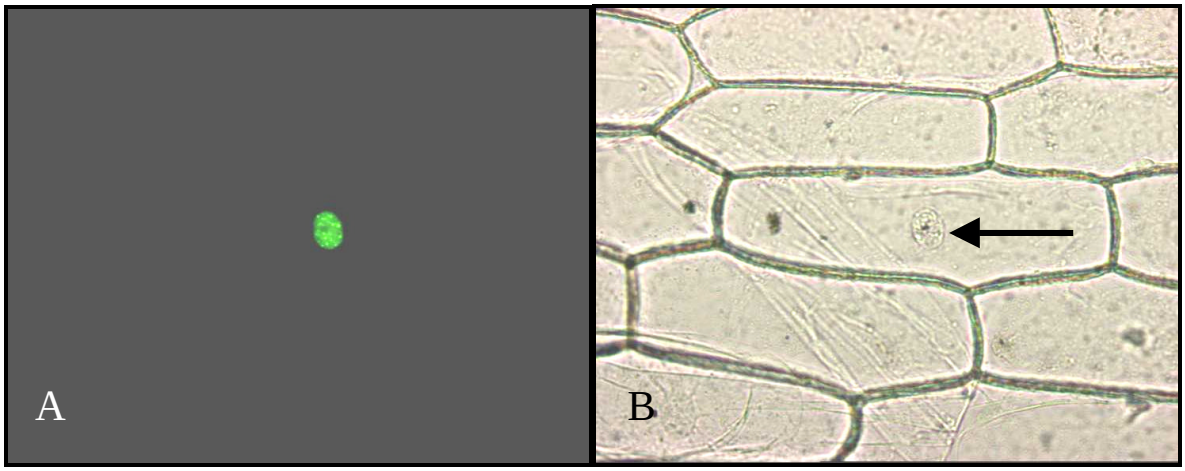

Abbildung 65:*R*-GFP Expression in den Epidermiszellen der Zwiebel

Epidermale Zwiebelzellen wurden mit dem *R*-GFP Expressionsplasmid transient transformiert und anschließend auf das synthetisierte *R*-GFP Fusionsprotein untersucht. Es wurde ausschließlich eine Anhäufung im Bereich des Zellkern beobachtet. Aufgrund der Signalsequenzen im Protein, wird es aktiv in den Zellkern transportiert.
Das Bild A zeigt die transformierte Epidermiszelle der Zwiebel bei UV-Licht, das Bild B zeigt die Zelle im Zellverband bei normalem Weisslicht. Der Zellkern ist mit einem Pfeil markiert. Das Gewebe ist in 200 facher Vergrößerung dargestellt.

Diese Anhäufung der *R*-GFP Fusionsproteine im Zytoplasma ist vermutlich auf eine sehr starke *R*-GFP Überexpression zurückzuführen. Vermutlich sind die Proteine limitiert, die den Kerntransport vermitteln, so daß *R*-GFP Fusionsproteine im Zytoplasma verbleiben. Zu keinem Zeitpunkt wurde jedoch eine vergleichbare Fluoreszenz wie mit den *C2*-GFP Fusionsproteinen oder GFP Proteinen im Zytoplasma beobachtet.

Die *InD1*-GFP und *InFus*-GFP Fusionsproteine wurden ausschließlich im Bereich der Zellkerne nachgewiesen. In einigen Fällen wurde eine geringe Ansammlung der *InD1*-GFP und *InFus*-GFP Fusionsproteine im Zytoplasma beobachtet. Diese Fluoreszenz im Zytoplasma trat jedoch nur bei einer starken Fluoreszenz der Zellkerne auf (Daten nicht gezeigt). Die Ergebnisse entsprechen damit den Beobachtungen, die mit den *R*-GFP Fusionsproteinen gemacht wurden.

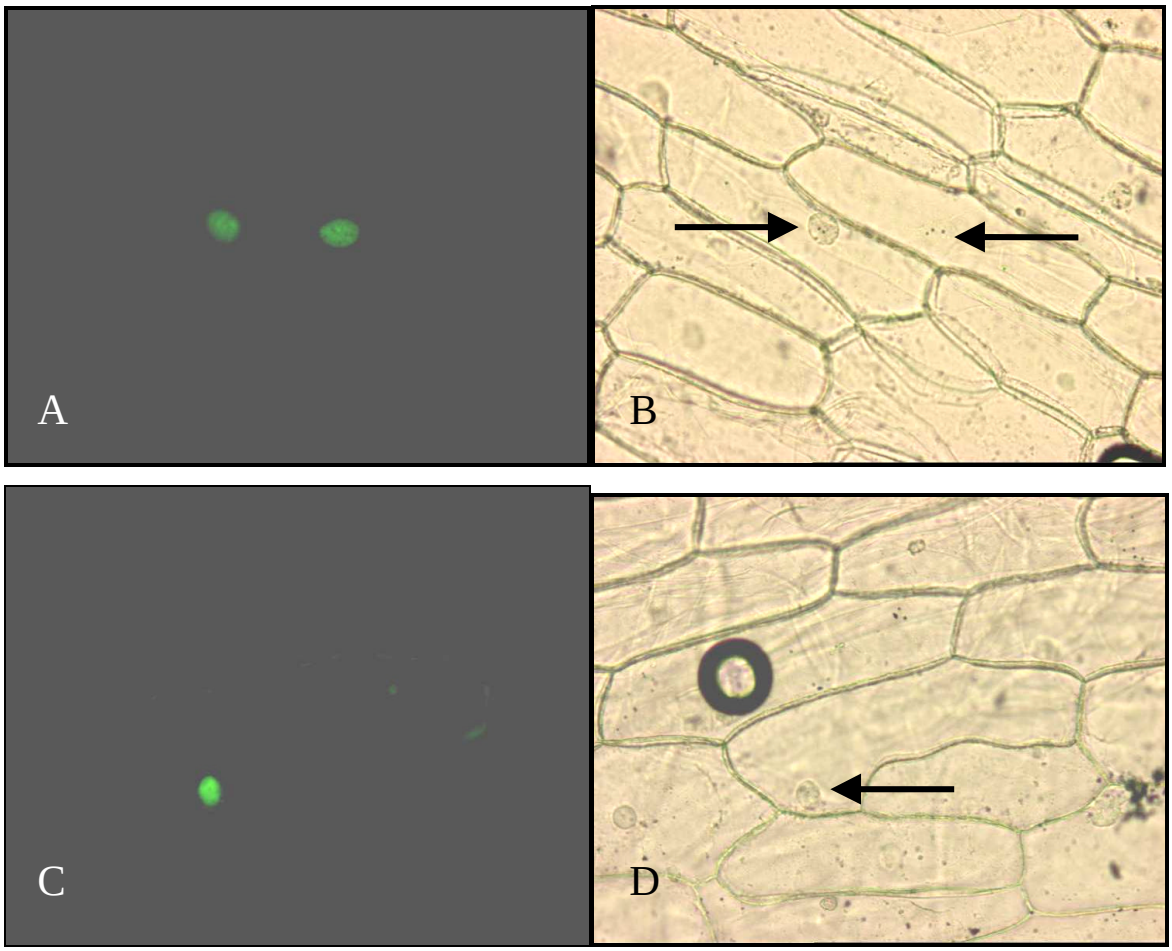

Abbildung 66: *InD1*-GFP und *InFus*-GFP Expression in den Epidermiszellen der Zwiebel

Epidermale Zwiebelzellen wurden mit den *InD1*-GFP und *InFus*-GFP Plasmiden transient transformiert und anschließend auf die synthetisierten *InD1*-GFP und *InFus*-GFP Fusionsproteine untersucht. Bei Anregung mit UV-Licht konnte eine Anhäufung der *InD*1-GFP (A) und der *InFus*-GFP (C) Proteine ausschließlich im Zellkern beobachtet werden. Da die Proteine zu groß (ca. 103 kDa) für die passive Diffusion in den Zellkern sind, könnten sie Signalsequenzen für den aktiven Transport enthalten.
Die transformierten Epidermiszellen der Zwiebel sind in 200 facher Vergrößerung dargestellt. Die Bilder A und C zeigen die Zellen bei UV-Anregung, die Bilder B und D zeigen die Zellen im Zellverband bei normalem Weisslicht. Die Zellkerne sind mit Pfeilen markiert.

Die Proteine *InD1*-GFP und *InFus*-GFP scheinen in den Zellkern transportiert zu werden. Proteine bis 40 kDa diffundieren passiv in den Zellkern, Proteine die größer sind, müssen aktiv in den Zellkern transportiert werden. Die passive Diffusion der *InD1*-GFP und *InFus*-GFP Fusionsproteine in den Zellkern kann ausgeschlossen werden, da sie mit ca. 103 kDa dafür zu groß sind.

Aufgrund der Beobachtungen daß die Fusionsproteine *InD*1-GFP und *InFus*-GFP trotz ihrer Größe in den Zellkern gelangen, wurde die Vermutung bestätigt, daß sie mindestens eine Signalsequenz für den aktiven Kerntransport enthalten. Mit der Herstellung von Deletionsproteinen wurde versucht, den hierfür verantwortlichen Bereich einzugrenzen. Die entsprechenden Deletionsplasmide sollten etwa die Hälfte der *In* und *InD* kodierenden Sequenz enthalten.

3.7.6 Herstellung von Deletionsplasmiden

Für die Herstellung der Deletionsplasmide, wurden die bereits für die Two Hybrid Experimente hergestellten PCR Fragmente *In*-am und *InD*-carb verwendet (Abbildung 12, Seite 53). Das ca. 1,2 kb lange *In*-am Fragment kodiert für den aminoterminalen Bereich des *Intensifier* Proteins *In* (Aminosäuren 1-366). Das ca. 1 kb lange *InD*-carb Fragment kodiert für den carboxyterminalen Bereich des *Intensifier* Proteins *InD1* (Aminosäuren 373-690). Die Aminosäuresequenzen des carboxyterminalen Bereiches von *InD1* und *InFus* stimmen überein, daher musste der carboxyterminale Bereich von *InFus* nicht extra analysiert werden.

3.7.7 Herstellung des *In*-am-GFP Expressionsplasmids

(siehe Abbildung 67)

Das ca 1,2 kb lange *In*-am Fragment wurden mittels *Bam*HI/*Mlu*I Restriktion (2.2.2.3) aus der Plasmid DNA #623 (2.2.2.1) ausgeschnitten. Damit die Enden des Fragmentes und des Vektors kompatibel zueinander sind, mußten sowohl die Enden des Fragmentes als auch die Enden des Vektors aufgefüllt werden. Nach der Isolierung des Fragmentes erfolgte die Bestimmung der DNA Menge und die Ligation (2.2.3.6) in die *Bam*HI (2.2.2.3) geschnittene Plasmid DNA (2.2.2.2) des GFP Vektors pMon30049.

Aufgrund der ungerichteten Klonierung ergaben sich zwei mögliche Orientierungen des Fragmentes im Vektor. Um die Orientierung festzustellen wurde aus 24 unabhängigen Bakterientransformanten die Plasmid DNA isoliert (2.2.2.1) und mit *Sma*I restringiert (2.2.2.3). Die Restriktionsfragmente wurden anschließen elektorphoretisch aufgetrennt (2.2.2.4) und anhand des verwendeten Standards bestimmt (2.2.2.5).

Das resultierende Expressionsplasmid der positiven Bakterientransformanten und das Fusionsprotein wurde als *In*-am-GFP (Plasmid #730) bezeichnet.

3.7.8 Herstellung des *InD*-carb-GFP Expressionsplasmids

(siehe Abbildung 67)

Für die Amplifikation des *InD*-carb Fragmentes aus der cDNA von *InD1* wurden die Primer OL-53 und OL-28 verwendet. Durch sie wurden zusätzliche *Bam*HI Schnittstellen für die Subklonierung in den GFP Vektor eingeführt. Des weiteren wurde, durch den Primer Ol-53, ein zusätzliches ATG Triplett für den Translationsstart eingefügt.

Das ca 1,1 kb lange *InD*-carb Fragment wurde mittels *Bam*HI Restriktion (2.2.2.3) aus der Plasmid DNA # 659 (2.2.2.1) ausgeschnitten und isoliert (2.2.3.3). Nach der Bestimmung der DNA Menge (2.2.2.5) erfolgte die ungerichtete Ligation (2.2.3.6) in die *Bam*HI geschnittene Plasmid DNA (2.2.2.2) des GFP Vektors pMon30049.
Aufgrund der ungerichteten Klonierung ergaben sich zwei mögliche Orientierungen des Fragmentes im Vektor. Um die Orientierung festzustellen wurde aus 24 unabhängigen Bakterientransformanten die Plasmid DNA isoliert (2.2.2.1) und mit mit *Mlu*I/ *Eco*RI restringiert (2.2.2.3). Die Restriktionsfragmente wurden anschließen elektorphoretisch aufgetrennt (2.2.2.4) und anhand des verwendeten Standards bestimmt (2.2.2.5).

Das resultierende Expressionsplasmid der positiven Bakterientransformanten und das Fusionsprotein wurde als *InD*-carb-GFP (Plasmid #750) bezeichnet.

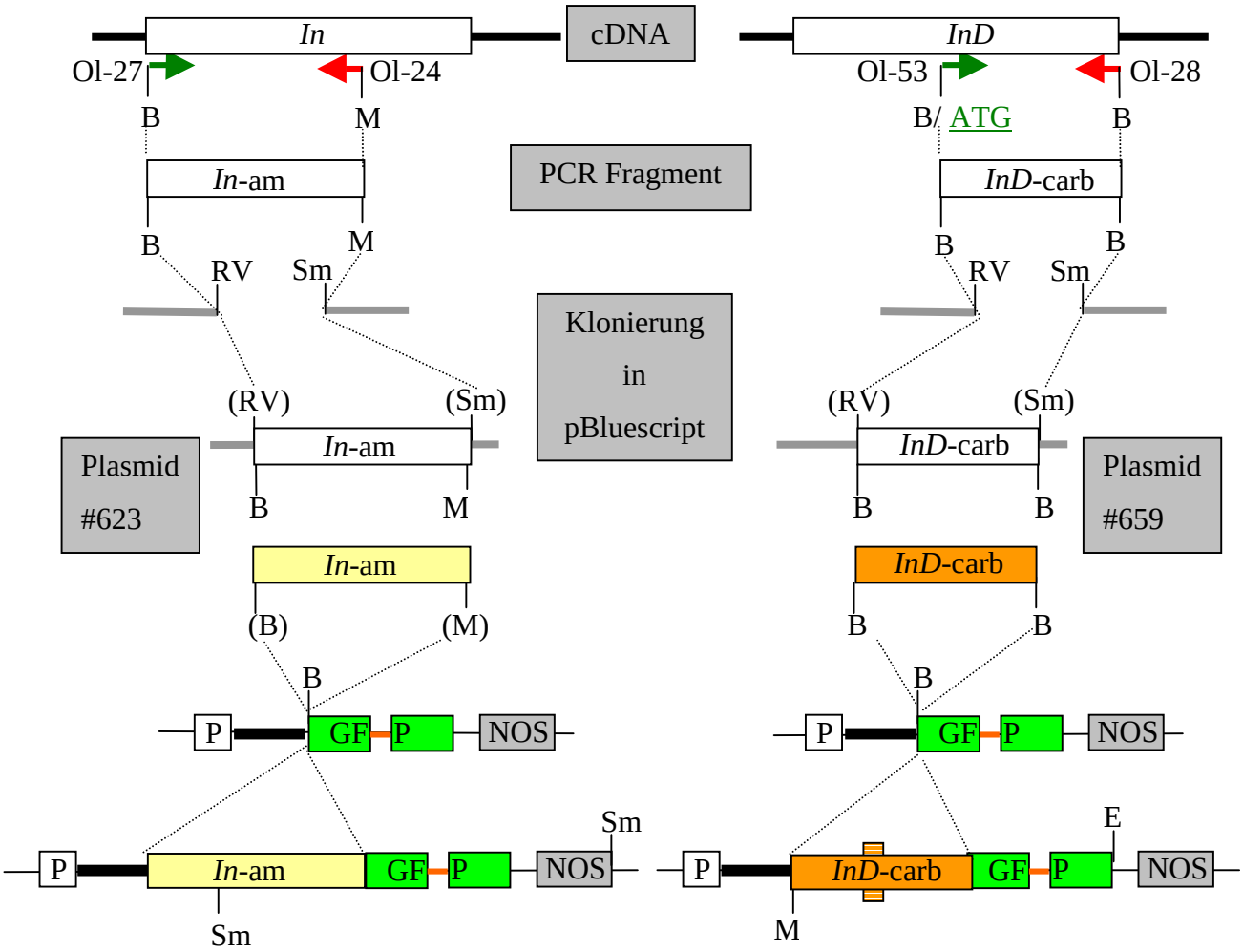

Abbildung 67: Herstellung der *In*-am-GFP und *InD*-carb-GFP Expressionsplasmide

Für die Herstellung der Deletionsplasmide wurden die bereits für die Two Hybrid Experimente hergestellten PCR Fragment *In*-am und *InD*-carb verwendet (Abbildung 12, Seite 53). Das ca. 1,2 kb lange *In*-am Fragment kodiert für den aminoterminalen Bereich des *Intensifier* Proteins *In* (Aminosäuren 1-366). Das ca. 1 kb lange *InD*-carb Fragment kodiert für den carboxyterminalen Bereich des *Intensifier* Proteins *InD1* (Aminosäuren 373-690).
Die Primer (grüne und rote Pfeile) Ol-27 und Ol-28 und Ol-53 enthielten eine zusätzliche *Bam*HI (B) Schnittstelle, der Primer Ol-53 enthielt des weiteren eine zusätzliche *Mlu*I Schnittstelle (M). Durch den Primer Ol-53 wurde ein zusätzliches ATG Triplett (grün) für den Translationsstart eingeführt.
Das *In*-am Fragment wurde mittels Restriktion mit *Mlu*I/*Bam*HI aus dem Plasmid #623 ausgeschnitten. Damit die Enden des Fragmentes und des Vektors kompatibel zueinander waren, mußten diese aufgefüllt werden. Das Fragment wurde anschließend ungerichtet in die aufgefüllte *Bam*HI Schnittstelle des Vektors pMon30049 einkloniert. Die Orientierung des Fragmentes im GFP Vektor wurde durch Restriktion mit *Sma*I (Sm) festgestellt.
Das *InD*-carb Fragment wurde mittels Restriktion mit *Bam*HI aus dem Plasmid #659 ausgeschnitten und ungerichtet in die *Bam*HI Schnittstelle des Vektors pMon30049 einkloniert. Die Orientierung des Fragmentes im GFP Vektor wurde durch Restriktion mit *Mlu*I/*Eco*RI (E) festgestellt.
Die resultierenden Expressionsplasmide wurden als *In*-am-GFP und *InD*-carb-GFP bezeichnet.

3.7.9 Herstellung des *InD*-am-GFP Expressionsplasmids

(siehe Abbildung 68)

Ein 1,2 kb langer Bereich wurde aus dem Plasmid 2.1 InD1 mittels PCR und Pfx-DNA Polymerase (2.2.3.5) amplifiziert. Durch die verwendeten Primer Ol-27 und Ol-54 wurden zusätzliche *Bam*HI und *Mlu*I Schnittstellen eingefügt, die eine spätere Subklonierung ermöglichten. Das PCR Produkt wurde in die *Eco*RV/*Sma*I geschnittene (2.2.2.3) Plasmid DNA (2.2.2.2) des Vektors pBluescript II SK+ ligiert und vollständig sequenziert (2.2.4).

Das ca 1,2 kb lange *InD*-am Fragment wurden mittels *Bam*HI/*Mlu*I Restriktion (2.2.2.3) aus der Plasmid DNA ausgeschnitten und isoliert 2.2.3.3. Damit die Enden des Fragmentes und des Vektors kompatibel zueinander sind, mußten sowohl die Enden des Fragmentes als auch die Enden des Vektors aufgefüllt werden. Nach der Isolierung des Fragmentes erfolgte die Bestimmung der DNA Menge und die Ligation (2.2.3.6) in die *Bam*HI (2.2.2.3) geschnittene Plasmid DNA (2.2.2.2) des GFP Vektors pMon30049.

Aufgrund der ungerichteten Klonierung ergaben sich zwei mögliche Orientierungen des Fragmentes im Vektor. Um die Orientierung festzustellen wurde aus 24 unabhängigen Bakterientransformanten die Plasmid DNA isoliert (2.2.2.1) und mit *Sma*I restringiert (2.2.2.3). Die Restriktionsfragmente wurden anschließen elektorphoretisch aufgetrennt (2.2.2.4) und anhand des verwendeten Standards bestimmt (2.2.2.5).

Das subklonierte PCR-Fragment kodiert für die Aminosäuren 1-372 von *InD1*. Das *InD*-am Fragment entspricht, in der Länge und der kodierenden Region, dem *In*-am Fragment (Abbildung 67). Das resultierende Expressionsplasmid der positiven Bakterientransformanten und das Fusionsprotein, wurden als *InD*-am-GFP (Plasmid #816) bezeichnet.

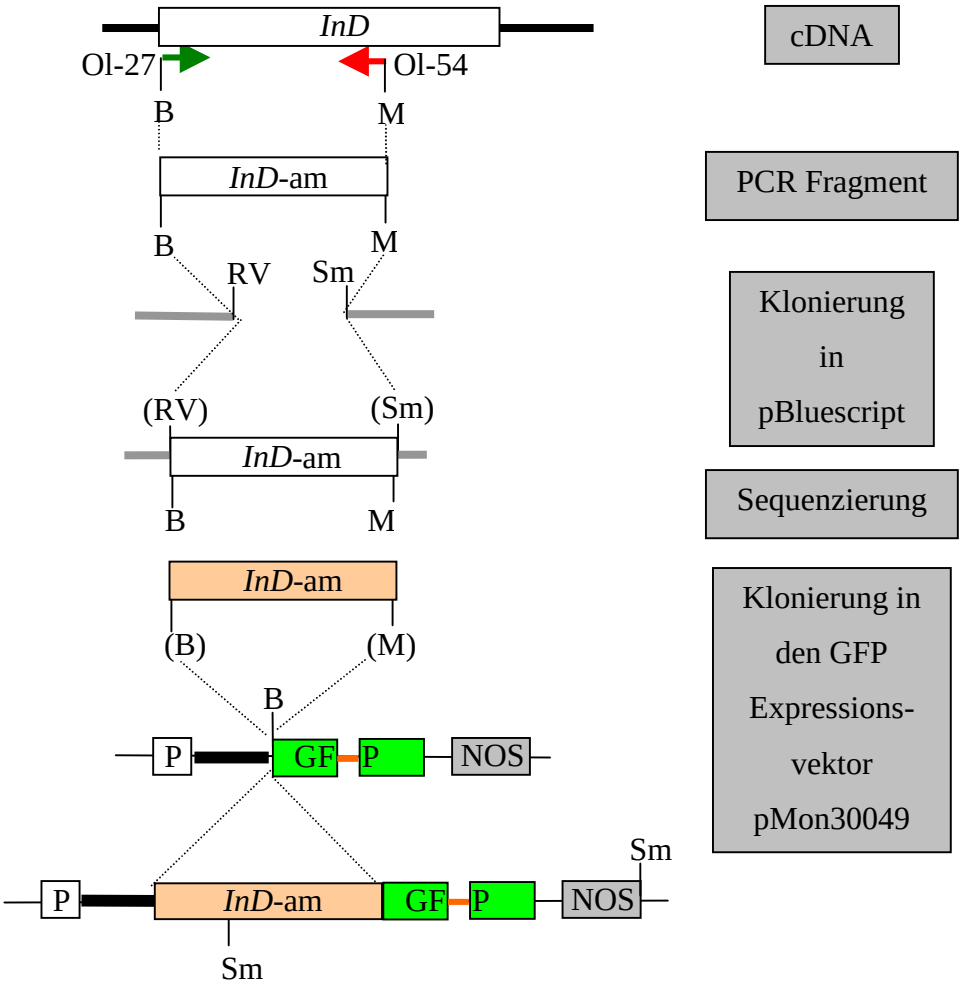

Abbildung 68: Herstellung des *InD*-am-GFP Expressionsplasmids

Ein 1,2 kb langer Bereich (*InD*-am) wurde aus der cDNA 2.1 InD per PCR amplifiziert. Hierfür wurden die Primer Ol-54 und Ol-53 (roter und grüner Pfeil) verwendet. Die Primer enthielten eine zusätzliche *Bam*HI (B) und eine zusätzliche *Mlu*I (M) Schnittstelle, die eine spätere Subklonierung ermöglichten. Das PCR Produkt wurde in die kompatible *Eco*RV (RV)/ *Sma*I (Sm) Schnittstelle von pBluescript II SK+ einkloniert und vollständig sequenziert. Anschließend wurde das *InD*-am Fragment mittels Restriktion mit *Mlu*I/*Bam*HI aus dem Vektor pBluescript II SK+ ausgeschnitten. Damit die Enden des Fragmentes und des Vektors kompatibel zueinander waren, mußten diese aufgefüllt werden. Das Fragment wurde anschließend ungerichtet in die aufgefüllte *Bam*HI Schnittstelle des Vektors pMon30049 kloniert. Die Orientierung des Fragmentes im GFP Vektor wurde durch Restriktion mit *Sma*I (Sm) festgestellt.
Das resultierenden Expressionsplasmid wurden als *InD*-am-GFP bezeichnet. Das *InD*-am Fragment entspricht, in der Länge und der kodierenden Region, dem *In*-am Fragment (Abbildung 67).

Um die korrekte Klonierung im richtigen Leserahmen zu gewährleisten, wurden alle hergestellten GFP Expressionsplasmide durch Sequenzierung der Fusionsstelle überprüft. Die resultierenden GFP Fusionsproteine *In*-am-GFP, *InD*-am und *InD*-carb sind im Vergleich zu *InD*-GFP und *InFus*-GFP in Abbildung 69 schematisch dargestellt.

Expressions plasmide	**Fusionsproteine**	**MW in kDa**
InD-GFP	*InD1* GFP	~ 102
InFus-GFP	*InFus* GFP	~ 103
InFus	*In*-am *InD*-carb	
In-am-GFP	*In*-am GFP	~ 69
InD-am-GFP	*InD*-am GFP	~ 68
InD-carb-GFP	*InD*-carb GFP	~ 61

Abbildung 69: Schematische Darstellung der deletierten *Intensifier* GFP-Fusionsproteine

Es konnte gezeigt werden, daß die Fusionsproteine *InD1*-GFP und *InFus*-GFP trotz einer Größe von ca. 103 kDa in den Zellkern gelangen. Damit wurde die Vermutung bestätigt, daß sie Signalsequenzen für den aktiven Kernimport enthalten. Mit der Herstellung von Deletionsproteinen wurde versucht, den hierfür verantwortlichen Bereich einzugrenzen. Die Proteine sollten dazu zu etwa 50% deletiert werden.
Die resultierenden GFP Fusionsproteine *In*-am-GFP, *InD*-am und *InD*-carb sind im Vergleich zu *InFus*-GFP und *InD*-GFP dargestellt.
Die Molekulargewichte (MW) der Fusionsproteine sind in Kilo Dalton (kDa) angegeben. Die gelbe Markierung, in den *InD1*, *InFus* und *InD*-carb Proteinen, markiert die basische Helix-Loop-Helix Region. Hier befindet sich eine charakterisierte Kernlokalisierungssequenz (Shieh *et al*.,1993) in der Aminosäuresequenz von *R*

3.7.10 Nachweis der Deletionsproteine in transient transformierten Epidermiszellen der Zwiebel durch Fluoreszenzmikroskopie

Nach der biolistischen Transformation (2.2.7) erfolgte der Nachweis der Expression durch Fluoreszenzmikroskopie (2.2.8) bei 200 facher Vergrößerung.

Das *InD*-carb-GFP Fusionsprotein wurde vorwiegend im Bereich der Zellkerne lokalisiert (Abbildung 70). Zusätzlich wurde eine schwache Fluoreszenz des Zytoplasmas festgestellt, wenn die Zellkerne sehr stark fluoreszierten (Daten nicht gezeigt). Das *InD*-carb-GFP Fusionsprotein (61kDa) verhält sich damit wie die *R*-GFP (Abbildung 65), *InD*-GFP und *InFus*-GFP (Abbildung 66) Proteine und scheint ebenfalls im Zellkern lokalisiert zu sein.
Proteine die größer als 40 kDa sind, benötigen bestimmte Signalsequenzen für den aktiven Transport in den Zellkern. Eine passive Diffusion des *InD*-carb-GFP Fusionsproteins in den Zellkern kann ausgeschlossen werden, da das Protein größer als 40 kDa ist. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, das der *InD*-carb Bereich mindestens eine Signalsequenz für den aktiven Transport in den Zellkern enthält.

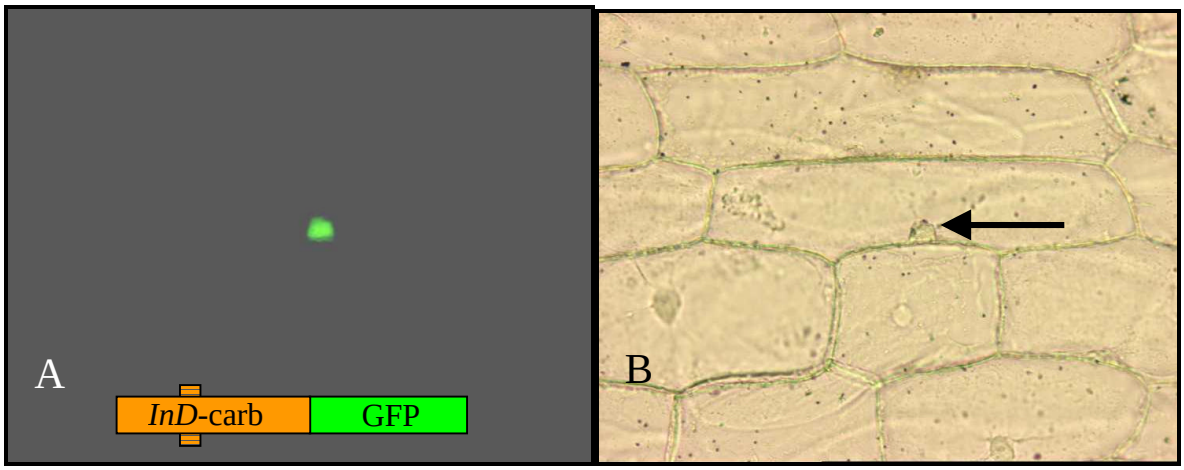

Abbildung 70: *InD*-carb-GFP Expression in den Epidermiszellen der Zwiebel

Epidermale Zwiebelzellen wurden mit dem *InD*-carb-GFP Expressionsplasmid transient transformiert und anschließend auf die Expression des Fusionsproteins untersucht. Bei Anregung mit UV-Licht konnte eine Ansammlung des *InD*-carb-GFP Fusionsproteins ausschließlich im Bereich des Zellkerns beobachtet werden. Das Fusionsprotein verhält sich damit wie die *R*-GFP (Abbildung 65), *InD*-GFP und *InFus*-GFP (Abbildung 66) Fusionsproteine. Da das *InD*-carb-GFP Fusionsprotein zu groß (ca 61 kDa) für die passive Diffusion in den Zellkern ist, könnte es Signalsequenzen für den aktiven Transport enthalten.
Das Bild A zeigt die transformierte Epidermiszellen der Zwiebel bei UV-Licht, das Bild B zeigt die Zelle im Zellverband bei normalem Weisslicht. Die Lage des Zellkerns ist mit einem Pfeil markiert. Das Gewebe ist in 200 facher Vergrößerung dargestellt.

Transformierte Zwiebelzellen die *In*-am-GFP und *InD*-am-GFP Fusionsproteine synthetisieren zeigten, daß diese Proteine im Zytoplasma akkumulieren. Des weiteren wurde

nur eine schwache Fluoreszenz durch die *In*-am-GFP und *InD*-am-GFP Fusionsproteine im Bereich der Zellkerne festgestellt, die der Intensität der Fluoreszenz im Zytoplasma entsprach. Die schwache Fluoreszenz des Zellkerns wird vermutlich nur hervorgerufen durch das den Zellkern umgebende Zytoplasma, in welchem sich die *In*-am-GFP und *InD*-am-GFP Fusionsproteine befinden. Die *In*-am-GFP und *InD*-am-GFP Fusionsproteine haben ein Molekulargewicht von 69 kDa, wodurch sie zu groß sind um passiv in den Zellkern zu diffundieren. Sie verhalten sich wie die *C2*-GFP Fusionsproteine (Abbildung 64) und scheinen keine Signalsequenzen für den aktiven Kerntransport zu enthalten.

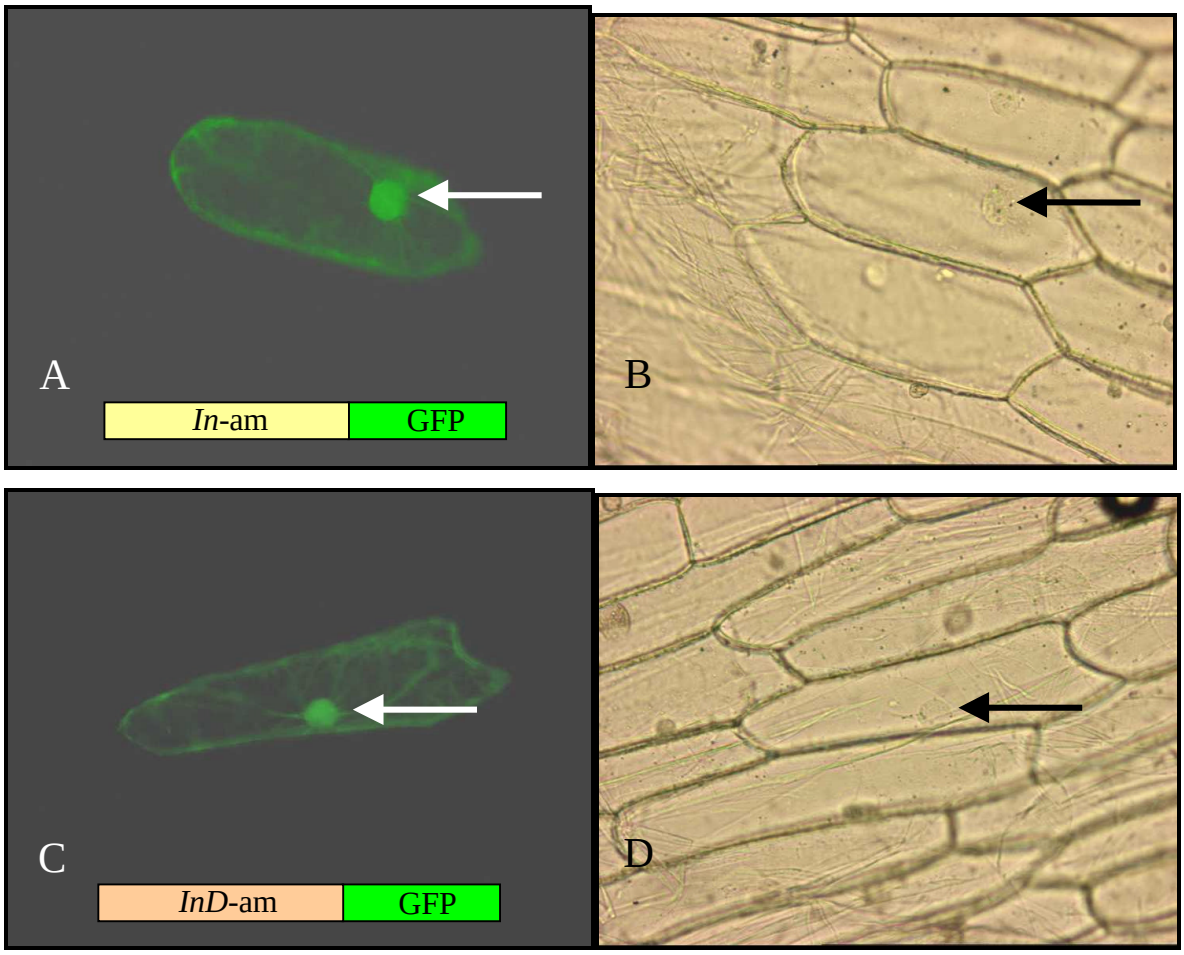

Abbildung 71: *In*-am-GFP und *InD*-am-GFP Expression in den Epidermiszellen der Zwiebel

Epidermale Zwiebelzellen wurden mit den *In*-am-GFP und *InD*-am-GFP Expressionsplasmiden transient transformiert und anschließend auf die Expression der *In*-am-GFP (A, B) und *InD*-am-GFP (C, D) Fusionsproteine untersucht. Es wurde eine schwache Ansammlung der Fusionsproteine im Zytoplasma und im Bereich des Zellkerns festgestellt (A, C). Die Fluoreszenz im Bereich des Zellkerns entsprach der Intensität des Zytoplasmas.
Die *In*-am-GFP und *InD*-am-GFP Fusionsproteine haben ein Molekulargewicht von 69 kDa, wodurch sie zu groß sind um passiv in den Zellkern zu diffundieren. Sie verhalten sich wie die *C2*-GFP Fusionsproteine (Abbildung 64) und scheinen keine Signalsequenzen für den aktiven Kerntransport zu enthalten.
Die Bilder A und C zeigen die transformierten Epidermiszellen der Zwiebel bei UV-Licht. Die Bilder C und D zeigen die Zelle im Zellverband bei normalem Weisslicht. Die Zellkerne sind mit einem Pfeil markiert. Das Gewebe ist in 200 facher Vergrößerung dargestellt.

3.7.11 Zusammenfassung der *in vivo* Lokalisation

In den in dieser Arbeit vorgestellten Two Hybrid Experimenten wurde die Interaktion der *Intensifier* Proteine (*InD1* und *InFus*) sowohl mit dem *C1* Protein als auch mit dem *R* Protein nachgewiesen. Es ist vorstellbar, daß die *Intensifier* Proteine mit *R* um das *C1* Protein konkurrieren könnten und so eine Regulation der *in vivo* Aktivität der Zielgene erfolgt.
Um festzustellen ob die postulierte Interaktion auch *in planta* erfolgen könnte, wurde untersucht ob diese Proteine zumindest im selben Zellkompartiment (Zellkern) vorliegen. Hierzu wurden *in vivo* Lokalisationsstudien mit dem grünen fluoreszierenden Protein (GFP) als Reporterprotein durchgeführt.
Für den Vergleich mit einem experimentell nachgewiesenen kernlokalisierten Protein (Shieh *et al*., 1993) wurde die entsprechende cDNA von *R* mit dem GFP Reportergen fusioniert (*R*-GFP). Für den Vergleich mit einem Protein, welches keine bekannten Kernlokalisierungssequenzen enthält, wurde ein GFP Fusionskonstrukt mit der cDNA von *C2* (*C2*-GFP) hergestellt (Abbildung 53). Die entsprechenden *Intensifier* cDNAs wurden ebenfalls mit dem GFP Reportergen fusioniert (*InFus*-GFP, *InD1*-GFP).

Die hergestellten Plasmide wurden in verschiedene Gewebe transient transformiert und die Lokalisation der expremierten Fusionsproteine mittels Fluoreszenzmikroskopie nachgewiesen. Hierbei konnte gezeigt werden, das Tabakblätter, Maisblätter, Maisscutellum, Narbenfäden von Mais und die Zellen einer Maissuspensionskultur keine geeigneten Gewebe für die *in vivo* Lokalisation darstellen. Die mehrschichtigen Gewebe ließen keine befriedigende Dokumentation zu. Mit der optimierten Transformation von epidermalen Zwiebelzellen war dagegen eine sehr gute Dokumentation möglich. Diese Zellen sind groß und relativ transparent und liegen als einzelne Zellschicht vor. Sie wurden daher für detailierte Studien zur *in vivo* Lokalisation verwendet.

In transient transformierten Zwiebelzellen erfolgte eine Anhäufung des GFP Proteins, aufgrund der geringen Größe von 27 kDa, sowohl im Zellkern als auch im Zytoplasma (Abbildung 63, Seite 127). Im Vergleich zu dem GFP Protein zeigten Zwiebelzellen mit dem *C2*-GFP Fusionsprotein auch eine Ansammlung der Proteine im Zytoplasma (Abbildung 64, Seite 127). Das *C2*-GFP Fusionsprotein scheint keine Signalsequenz für den aktiven Kernimport zu enthalten und gelangt daher nicht in den Zellkern. Im Gegensatz zu den Beobachtungen mit dem *C2*-GFP Fusionsprotein wurde eine Anhäufung der *R*-GFP Fusionsproteine ausschließlich im Bereich der Zellkerne beobachtet (Abbildung 65, Seite

128). Aufgrund der bekannten Signalsequenzen in dem *R*-GFP Fusionsprotein (Shieh *et al*., 1993) wird es aktiv in den Zellkern transportiert.
Die *InD1*-GFP und *InFus*-GFP Fusionsproteine wurden ausschließlich im Bereich der Zellkerne nachgewiesen (Abbildung 66, Seite 129). Hierdurch wurde die Vermutung bestätigt, daß diese Fusionsproteine Signalsequenzen für den aktiven Kernimport enthalten. Mit der Herstellung von Deletionsproteinen wurde versucht, den hierfür verantwortlichen Bereich einzugrenzen. Die entsprechenden Deletionsproteine *In*-am-GFP, *InD*-am-GFP und *InD*-carb-GFP enthielten, ausgehend vom aminoterminalen Ende (am) oder carboxyterminalen Ende (carb), etwa die Hälfte der *InFus* oder *InD1* Proteine (Abbildung 69).

Das *InD*-carb-GFP Fusionsprotein wurde vorwiegend im Bereich der Zellkerne lokalisiert (Abbildung 70, Seite 137). Im Gegensatz hierzu wurden die *In*-am-GFP und *InD*-am-GFP Fusionsproteine ausschließlich im Zytoplasma lokalisiert (Abbildung 71, Seite 138). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, daß nur der *InD*-carb Bereich mindestens eine Signalsequenz für den aktiven Transport in den Zellkern enthält. Dabei handelt es sich vermutlich um die, aufgrund des Proteinvergleiches postulierte Signalsequenz, in der basischen Helix-Loop-Helix Region.

Zusammenfassend weisen die Ergebnisse aus den *in vivo* Lokalisationsstudien darauf hin, daß die *Intensifier* Proteine in den Zellkern transportiert werden können. Dies deutet darauf hin, daß diese Proteine eine Funktion als Transkriptionsfaktoren haben könnten und auch *in planta* sowohl mit *C1* als auch *R* interagieren könnten.

4 Diskussion

4.1 Vorbemerkung

Die Pigmentierung der Maispflanze erfolgt unter anderem durch die Ansammlung der gelben bis orangen Carotinoide und der roten bis blauen Anthocyane. Der Anthocyanbiosyntheseweg konnte mit Hilfe von radioaktiv markierten Vorstufen weitgehend aufgeklärt werden. Viele an dieser Synthese beteiligten Strukturgene und regulative Gene wurden bereits identifiziert. Der zentrale Schritt der Anthocyanbiosynthese wird durch die Chalkonsynthase katalysiert. Die Chalkonsynthase wird von den duplizierten Strukturgenen *C2* und *Whp* (*white pollen*) kodiert. Damit eine Expression der Chalkonsynthase erfolgt, müssen verschiedene Produkte regulierender Gene vorliegen. Es müssen unter anderem ein Vertreter der myc-homologen Proteine (*R*, *B*) und ein Vertreter der myb-homologen Proteine (*C1*, *Pl*) zusammenwirken. In den meisten Pflanzenteilen wirken *B*+*Pl*, dagegen wirken *R*+*C1* in den Antheren, in der Coleoptile und in der triploiden Aleuronschicht.

Die Ansammlung der Anthocyane in der Aleuronschicht wird auch durch das, ebenfalls myc-homologe (Abbildung 2, Seite 5), Produkt des *Intensifier* Gens beeinflusst. Die Produkte der verschiedenen *Intensifier* Allele *In*, *InD* und *in* scheinen einen negativ regulierenden Einfluß auf das Schlüsselenzym Chalkonsynthase der Anthocyanbiosynthese zu haben. (Abbildung 4, Seite 9). Franken *et al*. (1991) vermuten, daß das *Intensifier* Genprodukt nur auf eines der duplizierteten Chalkonsynthasegene wirkt. Sie konnten zeigen, daß hierbei die Expression des *Whp* Gens beeinflußt wird.

Welchen Wirkungsmechanismus hierbei das *Intensifier* Genprodukt hat, ist noch nicht geklärt. Aufgrund der Homologie zu den myc-homologen Transkriptionsfaktoren vermuten Burr *et al*. (1996), daß das *Intensifier* Genprodukt auf der Ebene der Transkription als Repressor wirkt. Im Gegensatz hierzu vermuten Franken *et al*. (1991) und Rojek (1996) einen regulierenden Einfluß auf der Ebene der post-Transkription.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, ob das negativ regulierende *Intensifier* Genprodukt ein möglicher Interaktionspartner des positiv regulierenden myc (*R*) oder des myc (*C1*) homologen Proteins sein könnte (Abbildung 5, Seite 10) und dadurch die Expression der Chalkonsynthase beeinflusst. Dies könnte seine mögliche Funktion als Repressor erklären.

Anhand der durchgeführten Untersuchungen mit den im Two Hybrid System verwendeten Proteinen (*R*, *Rdel*, *C1*, *C1-I*, *InD1*, *InFus*, *InXS*) wird diskutiert, ob diese Proteine eine

transkriptionsaktivierende Domäne besitzen und welcher Bereich der Proteine für Interaktionen verantwortlich sein könnte. Hierzu wird auf die Methode des Two Hybrid Systems eingegangen. Anhand der Untersuchungen zur *in* vivo Lokalisation mit den verwendeten Proteinen (*R*, *C2*, *InD1*, *InFus*) wird diskutiert, ob es sich bei dem *Intensifier* Genprodukt möglicherweise um einen Transkriptionsfaktor handeln könnte.
Anschließend wird eine mögliche Wirkungsweise des *Intensifer* Genprodukts diskutiert, bezüglich der Expression der Strukturgene. Abschließend wird ein Ausblick über weitere Versuche mit dem *Intensifier* Genprodukt gegeben.

4.2 Untersuchungen mit dem Two Hybrid System

Für die Untersuchungen mit dem Two Hybrid System (Abbildung 7, Seite 11) wurden drei verschiedene putative *Intensifier* Proteine getestet: das Protein eines korrekt gespleißten Transkriptes des *InD* Allels (Kopie *InD1*) und das Protein eines nicht-korrekt gespleißten Transkriptes des *In* Allels (*InXS*). Das vollständige *In* Protein konnte nicht untersucht werden, da kein entsprechendes Transkript verfügbar war. Statt dessen wurde ein *In*-ähnliches Fusionsprotein aus Teilen von *In* und *InD1* hergestellt. Dieses wurde als *InFus* bezeichnet.

Als Interaktionspartner dieser *Intensifier* Proteine wurden das myc-homologe *R* Protein und das myb-homologe *C1* Protein verwendet. Es wurde vermutet, daß die endogene transkriptionsaktivierende Domäne von *C1* eine hohe Hintergrundaktivität der Reportergene des Two Hybrid Systems verursachen würde. Daher wurde beschlossen, zusätzlich zu dem *C1* Protein ein mutiertes Protein zu verwenden, welches keine transkriptionsaktivierende Domäne besitzt. Es wurde erwartet, daß mit diesem *C1-I* Protein (Paz-Ares *et al*., 1990) keine Hintergrundaktivität festzustellen ist. Des weiteren konnte hiermit untersucht werden, ob diese transkriptionsaktivierende Domäne für eine Interaktion mit dem *Intensifier* Protein essentiell ist. Dies könnte Hinweise darüber geben, ob das *Intensifer* Protein seine negativ regulierende Funktion durch Bindung an die transkriptionsaktivierende Domäne von *C1* ausüben könnte.

Goff *et al*. (1992) konnten eine Interaktion zwischen dem *C1* Protein und dem *R*-homologen *B* Protein nur mit einem deletierten *B* Protein nachweisen. Sie verwendeten ein *B* Protein, aus welchem der Bereich mit der basischen Helix-Loop-Helix-Region entfernt wurde. Da erwartet wurde, daß mit dem *R* Protein ähnliche Ergebnisse erhalten werden, wurde für die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen, ein ähnlich verkürztes Protein von *R* (*Rdel*) verwendet. Hiermit könnten Hinweise darüber erhalten werden, ob die Interaktion des

Intensifier Genproduktes mit dem carboxyterminalen Ende des *R* Proteins oder mit einem anderen Bereich des *R* Proteins erfolgen kann.

Die auf Interaktion zu testenden Proteine (*R*, *Rdel*, *C1*, *C1-I*, *InD1*, *InXS*, *InFus*) wurden sowohl an das carboxyterminale Ende der Aktivierungsdomäne (AD) als auch an das carboxyterminale Ende der DNA Bindedomäne (BD) von Gal4 fusioniert (Abbildung 72).
In den Untersuchungen mit dem Two Hybrid System wurde speziell darauf geachtet, ob es Unterschiede in dem Verhalten der Proteine als BD-Fusion oder AD-Fusion gibt. Beispielsweise könnte sich eine Interaktion der zu testenden Proteine nur nachweisen lassen, wenn das eine Protein mit der AD und das andere Protein mit der BD fusioniert ist, aber nicht in der anderen Orientierung.

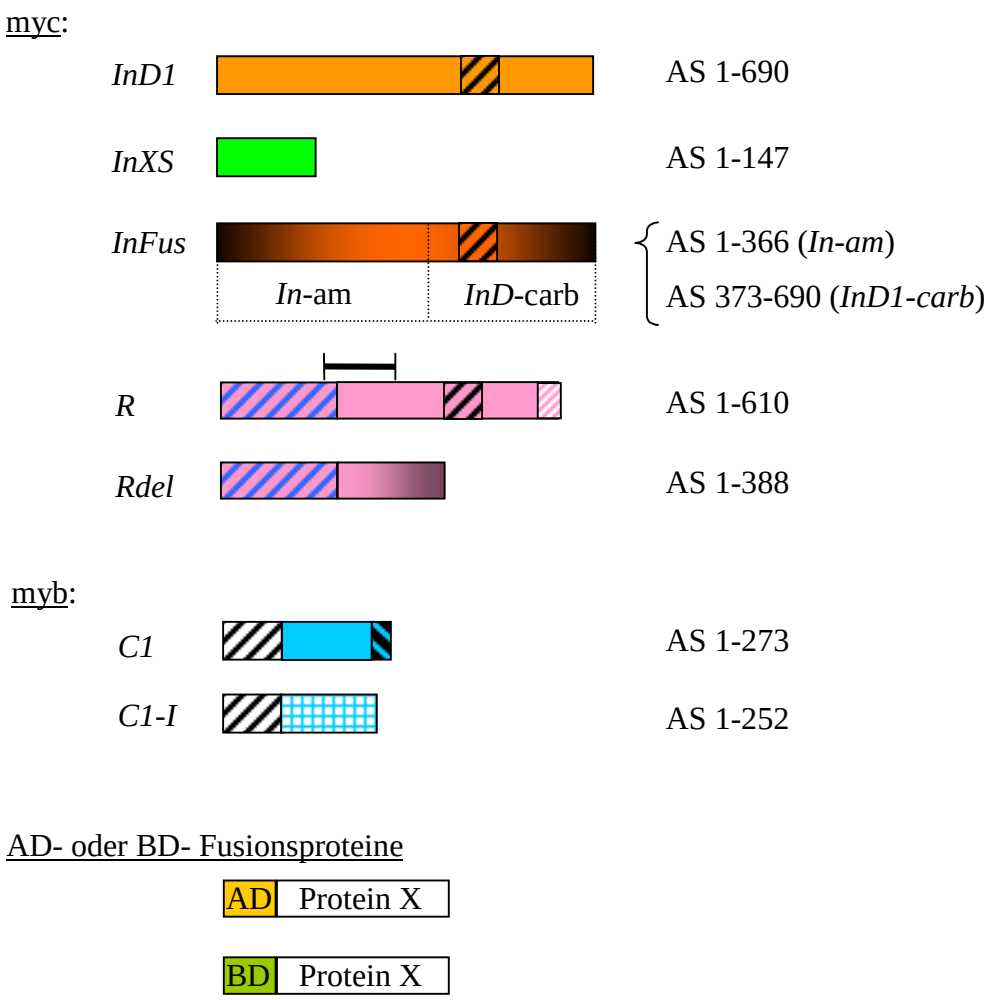

Abbildung 72: Auf *in vivo* Interaktion getestete myc- und myb-homologe Proteine

Für die Untersuchung auf eine mögliche Interaktion wurden verschiedene putative *Intensifier* Proteine getestet: das vollständige putative Protein des *InD* Allels (Kopie *InD1*) und das verkürzte putative Protein eines nicht-korrekt gespleißten Transkriptes des *In* Allels (*InXS*); das vollständige putative Protein des *In* Allels war nicht verfügbar. Es wurde daher ein *In*-ähnliches Fusionsprotein (*InFus*) aus Teilen von *In* und *InD1* hergestellt. Der Aminosäuresequenzvergleich von *InD1*, *InXS* und *InFus* befindet sich im Anhang (Abbildung 78, Seite 172).
Die schwarz/ orange schraffierte Region markiert die basische Helix-Loop-Helix Region in den *Intensifier* Proteinen. Die Funktion der am carboxyterminalen Ende gelegenen Region von *R* (rosa/ weiß schraffiert), ist noch unklar. Der Balken über dem *R* Protein markiert die saure Domäne, die typisch für diese Klasse von Transkriptionsfaktoren ist. Dem *Rdel* Protein fehlt der carboxyterminale Bereich mit der basischen Helix-Loop-Helix Region (schwarz/ rosa schraffiert). Das *Rdel* und das vollständige Protein *R* enthalten den Bereich (rosa/ blau schraffiert), der für die Interakion mit dem Bereich (schwarz/ weiß schraffiert) von *C1* oder *C1-I* Protein benötigt wird. Dem *C1-I* Protein fehlt die endogene transkriptionsaktivierende Domäne (schwarz/ blau schraffiert).
Die Anzahl der Aminosäuren (AS) der Proteine ist angegeben Die Proteine wurden sowohl an das carboxyterminale Ende der Aktivierungsdomäne (AD) als auch an das carboxyterminale Ende der DNA Bindedomäne (BD) von Gal4 fusioniert.

4.2.1 Transkriptionsaktivierende Domäne in den myc-homologen Proteinen

Bei Transformanten, welche die BD-*R* oder BD-*Rdel* Fusionsproteine enthalten, wurde eine hohe Hintergrundaktivität der Reportergene *HIS3* und *lacZ* festgestellt (Kapitel 3.5.1). Das läßt darauf schließen, daß sowohl das vollständige BD-*R* Fusionsprotein als auch das verkürzte BD-*Rdel* Fusionsprotein eine endogene transkriptionsaktivierende Domäne besitzt. Hierbei scheint die Region 253-388 für die Funktion der Domäne essentiell zu sein, da ein entsprechend verkürztes Fusionsprotein BD-*R* ($Rdel_{Grotewold}$), in den von Grotewold *et al.* (2000) durchgeführten Two Hybrid Experimenten, keine transkriptionsaktivierende Eigenschaft zeigte (Abbildung 73).

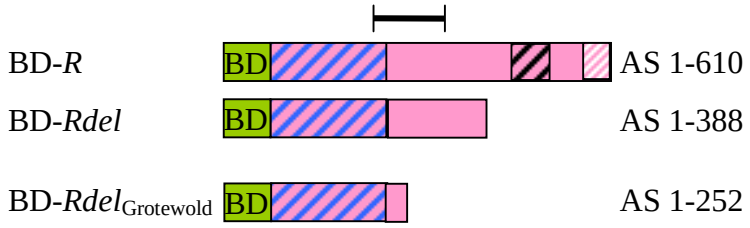

Abbildung 73: Vergleich der verschiedenen BD-*R* Fusionsproteine für die Untersuchungen mit dem Two Hybrid System

Die Fusionsproteine BD-*R* und BD-*Rdel* enthalten einen transkriptonsaktivierenden Bereich, der in dieser Arbeit nachgewiesen werden konnten. Das von Grotewold *et al.* (2000) verwendete BD-$Rdel_{Grotewold}$ Fusionsprotein zeigte dagegen keinen transkriptionsaktivierenden Effekt. Der Balken über dem *R* Protein markiert die saure Domäne des Transkriptionsfaktors.
Der für die Interaktion mit *C1* benötigte Bereich ist rosa/blau schraffiert. Die schwarz/ rosa schraffierte Region markiert die basische Helix-Loop-Helix Region, die für die Dimerisierung und DNA-Bindung benötigt wird. Am carboxyterminalen Ende (weiß/ rosa schraffiert) befindet sich eine Region unbekannter Funktion. Die in den Fusionsproteinen enthaltenen Aminosäuren von *R* sind angegeben.
BD (DNA-Bindedomäne von Gal4, grün).

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß das BD-*R* Fusionsprotein eine transkriptionsaktivierende Domäne besitzen könnte. Vemutlich handelt es sich hierbei um die von Ludwig *et al.* (1989) postulierte saure Domäne, im Bereich der AS 188-318 von *R*.

Bei Transformanten, welche die verschiedenen *Intensifer*-Proteine synthetieren (*InFus*, *InD1*, *InXS* in Fusion mit der AD oder BD), wurde keine Hintergrundaktivität der Reportergene beobachtet (Kapitel 3.5.1). Dies könnte darauf hinweisen, daß die verschiedenen *Intensifier* Proteine keine transkriptionsaktivierende Domäne enthalten oder daß durch die Fusion mit den Domänen von Gal4, eine mögliche transkriptionsaktivierende Domäne aufgrund sterischer Behinderung funktionslos wird. Die Theorie, daß die *Intensifier* Proteine keine transkriptionsaktivierende Domäne enthalten, wird durch erst kürzlich durchgeführte

transiente Expressionsstudien mit dem *InD1* Protein unterstützt, bei denen die Promotoren der Strukturgene *C2* und *Whp* des Anthocyanbiosyntheseweges untersucht wurden. Hierbei konnte gezeigt werden, daß das vollständige Protein des *Intensifier* Allels *InD1* nicht in der Lage ist, die Expression des nachgeschalteten Reportergens zu aktivieren (Kirsch, 2002).

4.2.2 Die *Intensifier* Proteine als mögliche Interaktionspartner des myc-homologen Proteins *R*

Die Ergebnisse aus den Untersuchungen der Transformanten die zusätzlich zum AD-*R* oder AD-*Rdel* Fusionsprotein das BD-*InD1* (Kapitel 3.6.5) oder das BD-*InXS* (Kapitel 3.6.3) Fusionsprotein synthetisieren weisen darauf hin, daß zwischen diesen Proteinen keine Interaktion erfolgt (Abbildung 49, Seite 109).

Bei dem reziproken Versuchsansatz wurden davon abweichende Ergebnisse erhalten (Kapitel 3.6.6). Durch die Verwendung von Transformanten, die das allein aktivierende BD-*R* Fusionsprotein enthalten, konnte gezeigt werden, daß die Aktivität des Reportergens *lacZ* durch die Gegenwart des AD-*InXS* oder AD-*InD1* Fusionsproteins beeinflußt wird. Sowohl das AD-*InXS* als auch das AD-*InD1* Fusionsprotein scheinen demzufolge mit dem BD-*R* Fusionsprotein zu interagieren (Abbildung 49, Seite 109) und dadurch die aktivierende Funktion des BD-*R* Fusionsproteins zu hemmen. Hierbei wurde mit dem AD-*InXS*, im Vergleich zu dem AD-*InD1*, eine schwächere Reduktion der durch BD-*R* verursachten Hintergrundaktivität des *lacZ* Reportergens festgestellt. Das deutet darauf hin, daß das AD-*InD1*, im Gegensatz zu dem AD-*InXS*, die aktivierende Funktion des BD-*R* Fusionsproteins effektiver beeinflussen kann.

Durch die Verwendung von Transformanten, die das allein aktivierende BD-*Rdel* Fusionsprotein enthalten, konnte gezeigt werden, daß die Aktivität des Reportergens *lacZ* durch die Gegenwart des AD-*InXS* oder AD-*InD1* Fusionsproteins <u>nicht</u> beeinflußt wird. Hierdurch kann abgeleitet werden, daß zwischen diesen Fusionsproteinen vermutlich keine Interaktion besteht (Abbildung 49, Seite 109).

Die Ergebnisse weisen darauf hin, daß ein vollständiges *Intensifier* Genprodukt besser mit dem *R* Protein interagieren kann, als ein verkürztes *Intensifier* Genprodukt. Des weiteren deuten sie darauf hin, daß die Interaktion des *Intensifier* Genproduktes mit dem carboxyterminalen Ende des *R* Proteins erfolgt. Im carboxyterminalen Ende des *R* Proteins befindet sich die basische Helix-loop-Helix Region, die für die DNA-Bindung benötigt wird.

Hierdurch läßt sich sich eine mögliche Wirkungsweise des *Intensifier* Genproduktes ableiten: Durch die Interaktion des *Intensifier* Genproduktes mit der carboxyterminalen Region von *R*

könnte die DNA Bindung des *R* Proteins an Promotoren gehemmt werden. Hierdurch wäre das *R* Protein nicht mehr in der Lage, die Expression dieser Gene zu aktivieren.

4.2.3 Die *Intensifier* Proteine als mögliche Interaktionspartner der myb-homologen Proteine *C1 und C1-I*

Die Ergebnisse aus den Untersuchungen der Transformanten die zusätzlich zum BD-*C1* Fusionsprotein das AD-*R*, das AD-*InD1* oder das AD-*InFus* Fusionsprotein synthetisieren, weisen auf eine Interaktion des BD-*C1* mit diesen Proteinen hin. Im Gegensatz hierzu scheint zwischen dem BD-*C1* und dem AD-*InXS* Fusionsprotein keine Interaktion zu erfolgen (Kapitel 3.6.1, Abbildung 28, Seite 77).

Wird die Stärke der Interaktion anhand der Expression des Reportergens *lacZ* gemessen, so scheint sie zwischen BD-*C1* und AD-*R* am stärksten zu sein. Wesentlich schwächer scheint sie zwischen AD-*InD1* und BD-*C1* und am schwächsten zwischen AD-*InFus* und BD-*C1* zu sein (Abbildung 74).

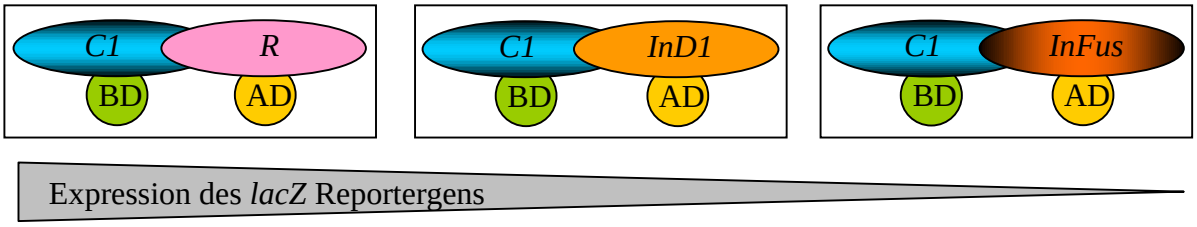

Abbildung 74: Mögliche Interaktionsstärke einiger Fusionsproteine

Dient die Expression des *lacZ* Reportergens als Maß für die Stärke der Interaktion, so scheint die Interaktion zwischen AD-*R* und BD-*C1* am stärksten zu sein. Am geringsten scheint sie zwischen AD-*InFus* und BD-*C1* zu sein. Interagierende Proteine sind überlappend dargestellt. AD (Aktivierungsdomäne von Gal4, gelber Kreis), BD (DNA-Bindedomäne von Gal4, grüner Kreis)

Aus weiteren Untersuchungen geht hervor, daß die gleichen Proteine, die mit dem BD-*C1* Fusionsprotein interagieren können, vermutlich auch mit dem BD-*C1-I* Protein interagieren können (Kapitel 3.6.2). Auch hier scheint die Interaktion mit AD-*R* am stärksten zu sein. Wesentlich schwächer scheint die Interaktion mit AD-*InD1* und am schwächsten mit AD-*InFus* zu sein.

Dem *C1-I* Protein fehlt, im Gegensatz zu dem *C1* Protein, die transkriptionsaktivierende Domäne am carboxyterminalen Ende. Hierdurch deuten die Ergebnisse darauf hin, daß die *Intensifier* Proteine nicht mit der transkriptionsaktivierenden Domäne von *C1* interagieren, sondern mit einer anderen Region des *C1* Proteins.

Der Aminosäuresequenzvergleich des *InFus* (ähnelt dem *In* Protein) und des *InD1* Proteins mit anderen myc-homologen Proteinen zeigt einen stark konservierten Bereich. Dieser Bereich liegt, relativ zu der Sequenz von *In*, zwischen den Aminosäuren 1-228 (Abbildung 2,

Seite 5). Da dieser Bereich nicht vollständig im *InXS* Protein vorhanden ist, könnte dadurch eine Interaktion ausbleiben.

Aus den dargestellen Ergebnissen läßt sich eine weitere mögliche negativ regulierende Wirkungsweise des *Intensifier* Genproduktes ableiten: das *Intensifier* Genprodukt scheint sowohl mit *R* als auch mit *C1* interagieren zu können. Möglicherweise konkurriert das *Intensifier* Genprodukt mit *R* sogar um dieselbe Interaktionsstelle im *C1* Protein. Hierbei scheinen die Produkte der verschiedenen *Intensifier* Allele eine unterschiedlich starke Bindung mit *C1* eingehen zu können. Die stärkste Interaktion scheint aber zwischen *R* und *C1* zu bestehen.

4.2.4 Homo- und Heterodimerisierung

Die Ergebnisse aus den verschiedenen Untersuchungen mit den *C1*, *InXS* und *InFus* Fusionsproteinen (Kapitel 3.6.1, 3.6.3, 3.6.4) deuten darauf hin, daß diese Proteine keine aktivierenden Homodimere (z.B. AD-*InXS* + BD-*InXS* oder AD-*InFus* + BD-*InFus*) bilden können. Des weiteren scheinen ebenfalls keine aktivierenden Heterodimere aus den *InXS*, *InFus* und *InD1* Fusionsproteinen gebildet zu werden (z.B. AD-*InXS* + BD-*InFus*) (3.6.3, 3.6.4, 3.6.5).

Bei den Untersuchungen zur Homodimeriserung des *InD1* Fusionsproteins (AD-*InD* + BD-*InD*) wurden widersprüchliche Ergebnisse erhalten. Hier wurde die Expression nur eines der beiden Reportergene, des *HIS3*, festgestellt (Kapitel 3.6.5). Des weiteren scheint das *HIS3* nur sehr schwach aktiviert zu werden, da bei den entsprechenden Hefezellen ein sehr schlechtes Wachstum auf Histidinmangelmedium festgestellt wurde. Sie bildeten kleinere Kolonien im Vergleich zu der Kontrolle, die ein normales Wachstum zeigte. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, daß das *InD1* Fusionsprotein anscheinend Dimere bilden kann, diese aber mit dem Two Hybrid System nur schwer nachzuweisen sind. Die Ursache für die unterschiedliche Expression der Reportergene *HIS3* und *lacZ* könnte hierbei an einer sehr schwachen Interaktion der *InD1* Fusionsproteine oder an einer zeitlich begrenzten Interaktion der *InD1* Fusionsproteine liegen. Beide Möglichkeiten würden vermutlich dazu führen, daß zu wenig funktionelle Gal4 Transkriptionsfaktoren vorliegen, die für eine konstitutive Expression der Reportergene *HIS3* und *lacZ* benötigt werden.
Des weiteren wäre möglich, daß zwar eine starke Interaktion zwischen diesen Fusionsproteine vorliegt, diese gebildeten Dimere aber die Reportergene nicht aktivieren können. Das

Ausbleiben der Reportergenaktivierung könnte beispielsweise dadurch erfolgen, daß bei diesen Dimeren die Funktion des Gal4 nicht vollständig wiederhergestellt wird.
Hinweise auf diese Möglichkeit geben die Experimente, bei denen untersucht wurde ob das *R* Fusionsprotein Homodimere bilden kann (AD-*R* + BD-*R*) (Kapitel 3.6.6). Hierbei wurde festgestellt, daß die durch das BD-*R* verursachte Hintergrundaktivität des *lacZ* Reportergens, durch die Gegenwart des AD-*R* Fusionsproteins reduziert wird.

4.2.5 Die *Intensifier* Proteine als möglicher Interaktionspartner des gebildeten Komplexes von *R+C1*

Die bisher vorgestellten Untersuchungen zeigen eine Interaktion zwischen dem *R* Fusionsprotein und dem *C1* oder *C1-I* Fusionsprotein (Abbildung 42, Seite 100). Des weiteren weisen sie auf eine Interaktion der *Intensifier* Fusionsproteine sowohl mit dem *C1* oder *C1-I* Fusionsprotein hin als auch auf eine Interaktion mit dem *R* Fusionsprotein (Abbildung 42, Seite 100). Daher stellte sich die Frage, ob die *Intensifier* Fusionsproteine die Komplexbildung zwischen dem *R* Fusionsprotein und dem *C1* oder *C1-I* Fusionsprotein beeinflussen können (Abbildung 43, Seite 101).
Bei den hierzu durchgeführten Untersuchungen (Kapitel 3.6.7) wurden starke Schwankungen der Meßdaten festgestellt. Daher ist es nicht möglich diese zu interpretieren (Messdaten siehe Anhang Tabelle 16, Seite 169).

4.3 Korrelation zwischen der Stärke der Reportergenexpression und der Stärke der Interaktion

Es sind bereits einige Hefeproteine charakterisiert worden, die myb- oder myc- ähnliche Domänen aufweisen. Dazu gehören z.B. das *Rap1* Protein, das *Ino4* Protein und das *Sin3* Protein. Das *Rap1* Protein enthält eine carboxyterminal gelegene transkriptionsaktivierende Domäne und zwei aminoterminal gelegene myb-ähnliche Subdomänen. Das *Rap1* Protein ist ein multifunktionelles Protein, welches in die Aktivierung und die Hemmung verschiedener Gene involviert ist (Graham, *et al*., 1999).
Das *Ino4* Protein gehört zu der Familie der basischen Helix-loop-Helix Proteine. Es kann an DNA binden und kann Heterodimere mit anderen basischen Helix-Loop-Helix Proteinen bilden. Das *Ino4* Protein ist in die Regulierung verschiedener Gene des Phospholipid-biosyntheseweges involviert (Robinson *et al*., 2000).
Das *Sin3* Protein enthält eine Helix-Loop-Helix Domäne, die aus vier amphipatischen Helix Motiven gebildet wird. Wang *et al*. (1990) vermuten, daß das *Sin3* Protein die Expression des

Endonuklease *HO* Gens durch direkte Protein-Protein Interaktion mit anderen Transkriptionsfaktoren und nicht durch eine DNA Bindung reguliert.

Proteine wie diese, könnten mit den in dieser Arbeit untersuchten Proteinen in Wechselwirkung treten. Sie könnten einerseits eine bestehende Interaktion stören oder andererseits eine Interaktion vermitteln und könnten somit die Expression der Reportergene beeinflussen. Die Ergebnisse der Untersuchungen mit dem Two Hybrid System sollten daher kritisch betrachtet werden.

Es kann nicht ausgeschlossen werden, daß die unterschiedliche Expression der Reportergene auf fehlende posttranskriptionelle Modifikationen oder auf eine veränderte Konformation der interagierenden Proteine zurückzuführen ist. Manche Interaktionen zwischen den Proteinen sind abhängig von posttranslationalen Modifikationen, die nicht oder nur unzureichend in Hefezellen durchgeführt werden. Diese Modifikationen treten häufig auf und beinhalten die Bildung von Disulfidbrücken, Glykosylierungen und Phosphorylierungen (Van Crieckinge und Beyaert, 1999).
Möglicherweise wird durch die Fusion mit den Domänen von Gal4, die korrekte Faltung der zu testenden Proteine behindert. Hierdurch könnte eine nur unzureichende Interaktion und Reportergenaktivierung erfolgen. Falls die zu testenden Proteine hierdurch in der Hefezelle nicht der Konformation *in planta* entsprechen, könnte das zu einer Fehlinterpretation der Ergebnisse führen.

Im folgenden wird diskutiert, wie diese Faktoren die Expression der Reportergene in den Two Hybrid Untersuchungen beeinflußt haben könnten.

Bei den Untersuchungen wurde eine starke Hintergrundaktivierung der Reportergene durch das BD-*R* und das BD-*Rdel* Fusionsprotein festgestellt (Kapitel 3.5.1). Es ist hierbei möglich, das diese Fusionsproteine alleine für die Aktivierung verantwortlich sind oder daß sie mit einem endogenen, myb-ähnlichen, aktivierenden Hefe-Faktor interagierten.
Mit dem verkürzten BD-*Rdel* Fusionsprotein wurde, im Vergleich zu dem vollständigen BD-*R* Fusionsprotein, eine etwa doppelt so starke Hintergrundaktivität der Reportergene festgestellt (Kapitel 3.5.1). Diese unterschiedliche Aktivierung könnte auf verschiedene Ursachen zurückzuführen sein: das BD-*R* Fusionsprotein enthält zwei DNA-Bindedomänen, wobei eine aus der endogenen basischen Helix-Loop-Helix-Region und die andere von Gal4

stammt. Im Gegensatz hierzu enthält das BD-*Rdel* Fusionsprotein nur die DNA-Bindedomäne von Gal4. Es kann vermutet werden, daß die DNA-Bindedomäne von *R* die Reportergenaktivierung stört. Möglicherweise konkurrieren beide DNA-Bindedomänen um die richtige Faltung, so daß statistisch betrachtet nur in etwa 50% der Fälle eine für die Reportergenaktivierung benötigte funktionierende DNA-Bindedomäne von Gal4 vorliegt.
Des weiteren wäre denkbar, daß der nur im BD-*R* vorhandene carboxyterminale Bereich mit einem endogenen Hefe-Faktor interagieren kann. Diese Interaktion könnte dazu führen, daß die Bindung des BD-*R* Fusionsproteins an den Promotor der Reportergene gehemmt wird oder daß die endogene aktivierende Domäne im BD-*R* Fusionsprotein in seiner Funktion gestört wird.

Durch die Fusion mit der DNA-Binde- oder Aktivierungsdomäne von Gal4 scheint eine veränderte Konformation der auf Interaktion getesteten Proteine zu erfolgen. In einigen Fällen wurde die Interaktion nur nachgewiesen, wenn das eine Protein mit der AD von Gal4 fusioniert war und das Protein mit der BD von Gal4, aber nicht in der anderen Orientierung (Abbildung 48, Seite 108). So wurde zwischen AD-*InD1* + BD-*C1* eine Interaktion festgestellt (Kapitel 3.6.1), jedoch nicht zwischen BD-*InD1* und AD-*C1* (Kapitel 3.6.5). Das gleiche gilt für die Interaktion zwischen *InFus* und *C1* (Kapitel 3.6.1, Kapitel 3.6.4). Im Gegensatz hierzu wurde mit dem *C1-I* Fusionsprotein, dem die endogene transkriptionsaktivierende Domäne fehlt, immer eine Interaktion mit dem *InD1* oder *InFus* Fusionsprotein festgestellt (Kapitel 3.6.2, Kapitel 3.6.5, Kapitel 3.6.4).
Diese Beobachtungen lassen darauf schließen, daß die bei BD-*R*, im Vergleich zu BD-*Rdel* festgestellte reduzierte Hintergrundaktivität der Reportergene (Kapitel 3.5.1) nicht auf endogene Hefe-Faktoren, sondern auf die Konformation des Fusionsproteins zurückzuführen sein könnte. Untersuchungen von Goff *et al*. (1992) scheinen diese Theorie zu unterstützen. Sie verwendeten das Two Hybrid System, um die Interaktion zwischen dem *C1* und dem *R*-homologen *B* Protein zu untersuchen. Sie fusionierten hierzu das *B* Protein, im Gegensatz zu den in dieser Arbeit durchgeführten Fusionen, an das aminoterminale Ende der DNA-Bindedomäne von Gal4 (*B*-BD).
So konnten sie eine Interaktion erst zwischen dem AD-*C1* und *B*-BD Fusionsprotein feststellen, als sie ein im Bereich der basischen Helix-Loop-Helix Region deletiertes *B* Fusionsprotein verwendeten (Abbildung 75 b). Dieses widerspricht den in dieser Arbeit vorgestellten Experimenten, bei denen eine Interaktion zwischen BD-*C1* und dem vollständigen AD-*R* Protein festgestellt wurde (Kapitel 3.6.1). Des weiteren konnten sie mit

einem, im aminoterminal verkürzten Fusionsprotein, BD-*C1del* (Abbildung 75 b), eine sehr starke Hintergrundaktivierung der Reportergene *HIS3* und *lacZ* feststellen. Dieses widerspricht ebenfalls den in dieser Arbeit vorgestellten Experimenten bei denen keine Hintergrundaktivierung des BD-*C1* oder AD-*C1* Proteins festgestellt wurde (Kapitel 3.5.1).

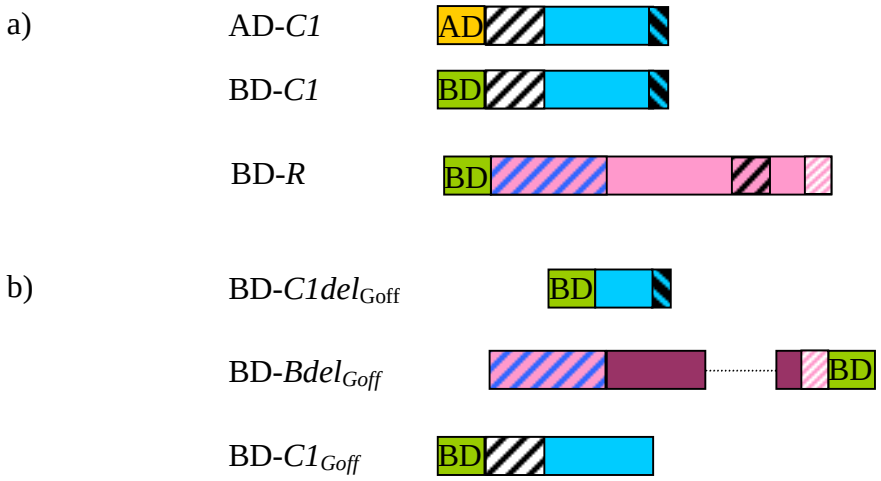

Abbildung 75: Schematische Darstellung der verschiedenen Fusionsproteine

Die Abbildung zeigt die (a) in dieser Arbeit und die (b) von Goff *et al*. (1992) verwendeten Fusionsproteine.
Die AD-*C1* und BD-*C1* Fusionsproteine enthalten das vollständige *C1* Protein. Diese Fusionsproteine zeigten keine transkriptionsaktivierende Eigenschaft, obwohl sie eine endogene transkriptionsaktivierende Domäne besitzen. Diese Domäne wurde von Goff *et al*. (1992), mit dem im aminoterminalen Bereich deletierten BD-$C1del_{Goff}$ Fusionsprotein, experimentell bestätigt.
In den in dieser Arbeit vorgestellten Untersuchungen wurde eine Interaktion zwischen dem BD-*C1* und dem vollständigen AD-R Fusionsprotein festgestellt. Goff *et al*. (1992) konnten dagegen eine Interaktion nur zwischen *C1* und einem deletierten *B* Protein nachweisen (pflaume, *R* homolog).
Diese Ergebnisse weisen darauf hin, daß die Konformation der Fusionsproteine eine Interaktion zwischen zwei Proteinen beeinflussen kann.
Farbcode: Aktivierungsdomäne von Gal4 (gelbe Box), DNA-Bindedomäne von Gal4 (grüne Box) Region für die Interaktion mit *C1* (rosa/ blau schraffiert), Region für die Interaktion mit *R* (schwarz/ weiß schraffiert), endogene transkriptionsaktivierende Domäne von *C1* (ist im BD-$C1_{Goff}$ Protein deletiert), carboxyterminale Region mit unbekannter Funktion (rosa/ weiß gestreift), basische Helix-Loop-Helix-Region (rosa/ schwarz schraffiert)

Estojak *et al*. (1995) und Legrain *et al*, (1994) verglichen die Ergebnisse zur Interaktion aus Untersuchungen mit dem Two Hybrid System und aus Affinitätsmessungen. Hierbei konnten sie zeigen, daß die Stärke der Reportergenexpression nicht der Stärke der Affinität (hoch, mittel, schwach) zwischen den Proteinen entsprach. Die Stärke der Expression der verschiedenen Reportergene war sehr unterschiedlich. Abhängig vom Reportergen wurde mit den selben interagierenden Proteinen sowohl eine 200 fach geringere, 7 fach geringere als auch 2 fach stärkere Affinität ermittelt. Estojak *et al.* (1995) schließen daraus, daß es nicht zulässig ist Unterschiede in der Reportergenexpression als Maßstab für die Stärke der Interaktion zu verwenden. Sie postulieren, daß keine Korrelation zwischen den Ergebnissen aus Two Hybrid Untersuchungen und aus Affinitätsmessungen besteht.

Anhand der oben aufgeführten Beobachtungen scheint das verwendete Two Hybrid System nicht die optimale Methode für eine Untersuchung zur *in vivo* Interaktion zu sein. Die unter 4.2.3 aufgestellte Behauptung, daß zwischen den *R*, *InD1*, *InFus* zu *C1* oder *C1-I* Fusionsproteinen eine stärkere Interaktion besteht, sollte daher kritisch betrachtet werden.

4.4 Lokalisation der *Intensifier* Proteine *InD1* und *InFus*

Um eine Aussage darüber machen zu können, ob die Ergebnisse der Two Hybrid Experimente auf die Situation *in planta* übertragbar sind, wurde untersucht, ob die untersuchten Proteine im gleichen subzellulären Kompartiment vorliegen.

Shieh *et al*. (1993) führten bereits zelluläre Lokalisationsstudien mit *R* durch. Sie fusionierten *R* mit dem Reporterprotein β-Glucoronidase (*R*-GUS) und transformierten Tabak und Zwiebelzellen. Hiermit konnte gezeigt werden, daß die *R*-GUS Fusionsproteine aufgrund von drei Kernlokalisierungssequenzen (NLS) aktiv in den Zellkern transportiert werden.

Der Vergleich der Aminosäuresequenzen der *In* und *InD1* Proteine mit *R* und anderen basischen myc-homologen Proteinen zeigt u.a. eine starke Homologie im Bereich der basischen Helix-Loop-Helix Region (Abbildung 3, Seite 8), in der sich die mediale NLS des *R* Proteins befindet (Shieh *et al*., 1993). Aufgrund der Homologie zu der medialen NLS wurde vermutet, daß die entsprechende Sequenz in dem *In* und dem *InD1* Protein ebenfalls eine Funktion als NLS aufweisen könnte. Die anderen zwei NLS des *R* Proteins sind dagegen nicht in der Aminosäuresequenz von *In* und *InD1* konserviert.

Um festzustellen, ob diese NLS in dem *In* und dem *InD1* Protein funktionsfähig ist, wurde sie experimimentell überprüft. Die Lokalisation der *Intensifier* Proteine *InFus* und *InD1*, in Bezug auf den Kernimport, wurde mit zwei anderen Proteinen verglichen. Das *Zea mays* L. Strukturgen *C2* (Wienand *et al.*, 1986) kodiert für die Chalkonsynthase, dessen Aminosäuresequenz keine bekannten NLS enthält. Das *C2* Protein war dadurch als negative Kontrolle für die Lokalisation im Zellkern geeignet. Als positive Kontrolle diente das, bereits für die Two Hybrid Experimente verwendete und charakterisierte, kernlokalisierte *R* Protein (Shieh *et al*., 1993).

Für die *in vivo* Lokalisationsstudien wurden die zu testenden Proteine mit dem Reporterprotein GFP (grün fluoreszierenden Protein) fusioniert und in transient transformerten Gewebe mittels Fluoreszenzmikroskopie nachgewiesen.

Mit den durchgeführten Untersuchungen wurde gezeigt, das Tabakblätter, Maisblätter, Maisscutellum, Narbenfäden von Mais und die Zellen einer Maissuspensionskultur keine geeigneten Gewebe für die *in vivo* Lokalisation darstellten. Die mehrschichtigen Gewebe

ließen keine befriedigende Dokumentation zu (Kapitel 3.7.2, Kapitel 3.7.3). Mit der optimierten Transformation von epidermalen Zwiebelzellen war dagegen eine sehr gute Dokumentation möglich (Kapitel 3.7.4). Diese Zellen sind groß, relativ transparent und liegen als einzelne Zellschicht vor. Sie wurden daher für die Studien zur *in vivo* Lokalisation verwendet.

Das *R*-GFP Fusionsprotein wurde erwartungsgemäß im Bereich des Zellkerns lokalisiert (Abbildung 65, Seite 128). Da das *C2*-GFP Fusionsprotein keine bekannten NLS Sequenzen für den Kernimport enthält, wurde es erwartungsgemäß nicht im Zellkern lokalisiert, sondern im Bereich des Zytoplasmas (Abbildung 64, Seite 127).

Die *InFus*-GFP und *InD1*-GFP Fusionsproteine wurden im Bereich der Zellkerne nachgewiesen (Abbildung 66, Seite 129). Hierdurch wurde die Vermutung bestätigt, daß diese Fusionsproteine Signalsequenzen für den aktiven Kernimport enthalten. Hierbei kann die passive Diffusion in den Zellkern ausgeschlossen werden, da die entsprechenden GFP-Fusionsproteine größer als 60 kDa sind. Eine passive Diffusion in den Zellkern erfolgt nur bei Proteinen mit einem Molekulargewicht kleiner als 40-60 kDa. Proteine die größer sind müssen in einem energieabhängigen Prozess aktiv in den Zellkern transportiert werden und benötigen dafür NLS in der Aminosäuresequenz (Garcia-Bustos *et al*, 1991; Heese-Peck und Raikhel, 1998).

Um die Region mit diesem verantwortlichen Bereich in dem *InFus* und dem *InD1* Protein einzugrenzen, wurden Deletionsproteine untersucht. Sie enthielten nur etwa 50 % des aminoterminalen oder 50 % des carboxyterminalen Endes. Die Deletionsproteine, welche nur das aminoterminalen Ende enthalten, wurden nicht im Bereich der Zellkerne lokalisiert, sondern im Zytoplasma (Abbildung 71, Seite 138). Im Gegensatz hierzu wurde das Deletionsprotein, welches das carboxyterminale Ende enthält, im Bereich des Zellkerns lokalisiert (Abbildung 70, Seite 137).

Die Untersuchungen zeigen, daß sich nur im carboxyterminalen Ende des *InD1* bzw. *InFus* Proteins mindestens eine Signalsequenz für den aktiven Transport in den Zellkern befindet. Im carboxyterminalen Bereich liegt die basische Helix-Loop-Helix Region die eine starke Homologie zu einer der drei NLS des *R* Proteins aufweist (Abbildung 3, Seite 8). Dies deutet darauf hin, daß diese entsprechende Sequenz in der *InD1* Aminosäuresequenz eine funktionsfähige NLS sein könnte. Ob speziell diese funktionsfähig ist oder ob eine NLS an anderer Stelle vorliegt, müßte durch weitere Deletionsanalysen untersucht werden.

Diese Untersuchungen zur *in vivo* Lokalisation zeigen, daß das *InD1* bzw. *InFus* Protein im selben Zellkompartiment wie das *R* Protein vorliegt. Diese Ergebnisse unterstützen damit die durch die Untersuchungen mit dem Two Hybrid System postulierte Interaktion, zwischen dem *R* Protein und dem *Intensifier* Genprodukt.

4.5 Mögliche Funktion des *Intensifier* Genproduktes

Franken *et al*. (1991) und Rojek (1996) vermuten, daß die Regulierung der verschiedenen Strukturgene des Anthocyanbiosyntheseweges, speziell der duplizierten Chalkonsynthasegene *C2*, *Whp*, durch das *Intensifier* Genprodukt auf der post-transkriptionellen Ebene stattfindet. Sie vermuten des weiteren, daß das *Intensifer* Genprodukt die Expression nur eines der duplizierten Chalkonsynthasegene, des *Whp*, beeinflusst.

Im Gegensatz dazu weisen die Ergebnisse aus den in dieser Arbeit vorgestellten Two Hybrid Untersuchungen und den *in vivo* Lokalisationsstudien darauf hin, daß das *Intensifier* Genprodukt auf der Ebene der Transkription reguliert. Diese Untersuchungen scheinen damit die von Burr *et al*. (1996) postulierte Funktion zu bestätigen. Von Kirsch (2002) durchgeführte transienten Expressionsanalysen mit den Chalkonsynthasepromotoren von *C2* und *Whp* weisen ebenfalls darauf hin, daß das *Intensifier* Genprodukt auf der Ebene der Transkription wirken kann. Kirsch (2002) konnte hierbei zeigen, daß das Produkt des *Intensifier* Alles *InD* hemmend auf die aktivierenden Komplexe aus *R+C1* und dadurch hemmend auf die Promotoren beider Chalkonsynthasegene wirkt. Die stärkste Hemmung wurde hierbei festgestellt, wenn der *Whp* Promotor zusätzlich die 5‘UTR-Region enthält. Diese Beobachtung kann auf die Notwendigkeit der 5‘ UTR-Region bei der *InD* abhängigen Repression hindeuten.

Aus den früheren und den in dieser Arbeit vorgestellten Untersuchungen läßt sich der Einfluß des *Intensifier* Genproduktes auf die Anthocyanbiosynthese und auf den Phänotyp der Maiskörner der Allele *in*, *In* und *InD* (Abbildung 4, Seite 9) in einem sehr vereinfachten Modell darstellen (Abbildung 76).

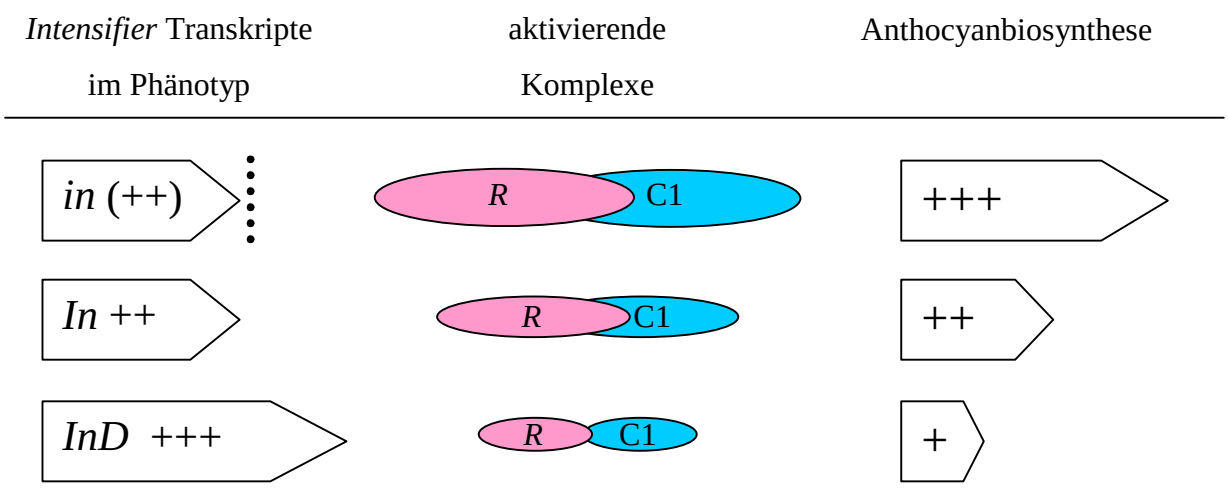

Abbildung 76: vereinfachtes Modell zum Einfluss des *Intensifier* Genproduktes auf die Anthocyanbiosynthese

Die von *in* hergestellte Transkriptmenge ist nicht bekannt. Diese Information ist aber nicht notwendig, da postuliert wird, daß die *in* Transkripte nur zu einem funktionslosen Protein führen (Herrmann, 2001). *In* und *InD* werden unterschiedlich stark exprimiert und führen zu unterschiedlichen Mengen an funktionellem Protein. Dieses ist in der Lage, die Bildung von aktivierenden *R+C1* Komplexen zu hemmen. Je weniger dieser *R+C1* Komplexe vorliegen, desto stärker ist die Hemmung der Anthocyanbiosynthese.

Wieviel Transkripte des *Intensifier* Allels *in* vorliegen ist nicht bekannt. Diese Information scheint jedoch nicht notwendig zu sein, da Herrmann postuliert (2001), daß in diesem Phänotyp nur Transkripte vorliegen, die zu einem verkürzten Protein führen, das dem in dieser Arbeit untersuchten *InXS* Protein ähnlich ist. Das *InXS* Protein scheint nicht in der Lage zu sein, mit *C1* interagieren zu können und konkurriert demzufolgen nicht mit *R* um *C1*. Des weiteren scheint *InXS* keine starke Bindung mit *R* eingehen zu können. Dem *InXS* Protein fehlt die Region mit der basischen Helix-Loop-Helix Region, von der eine Funktion in der DNA-Bindung angenommen wird (Murre *et al*., 1998; Davis *et al*., 1990). Da dieser Bereich fehlt, kann vermutet werden, daß das *InXS* Protein nicht seine hemmende Funktion ausüben kann.

Zusammenfassend folgt daraus, daß in Gegenwart des *InXS* bzw. *in* Proteins nur funktionelle *R+C1* Komplexe gebildet werden könnten und beide Chalkonsynthasegene (*C2*, *Whp*) exprimiert werden. Dieses führt zu einer starken Anhäufung der Pigmente, wodurch die violetten bis schwarzen Maiskörnern entstehen.

In dem Phänotyp *In* liegen, neben den nicht-korrekt gespleißten Transkripten, geringe Mengen (0,2 %, Burr *et al*., 1996) korrekt gespleißter Transkripte vor. Diese Transkripte

führen zu einem vollständigen Protein, ähnlich dem in dieser Arbeit untersuchten *InFus* Protein. Dieses vollständige Protein könnte im Zellkern sowohl mit *C1* als auch mit *R* eine Bindung eingehen und vermutlich zusätzlich an die 5‘UTR-Region des *Whp* Gens binden.
Zusammenfassend folgt daraus, daß in Gegenwart des *InFus* bzw. *In* Proteins die Expression beider Chalkonsynthase beeinflußt werden könnte: Zum einen wird, durch die Reduktion an funktionellem, transkriptionsaktivierendem *R+C1* Komplex, die Expression des *C2* Gens negativ beeinflußt. Zum anderen könnte, z.B. durch eine mögliche Bindung des *InFus* bzw. *In* Proteins an die 5‘UTR-Region des *Whp* Gens, speziell die Expression des *Whp* Gens gehemmt werden.
Die Folge wäre, daß im Vergleich zu der Situation im Phänotyp von *in*, eine geringere Menge an Chalkonsynthase vorliegt. Das würde zu einer schwächeren Aktivierung der Anthocyanbiosynthese führen. Hierdurch würden weniger Pigmente angehäuft werden und weniger stark gefärbten Maiskörner entstehen.
Das Allel *InD* besteht aus zwei Genkopien (*InD1*, *InD2*). Northern Analysen zeigten eine stärke Transkription des Allels *InD* im Vergleich zu dem Allel *In* (Rojek, 1996). Das läßt vermuten, daß von *InD* mehr Proteine in der Zelle vorliegen, die mit *R* und *C1* eine Bindung eingehen könnten.

Daraus folgt, daß im Vergleich zu der Situation im Phänotyp von *In*, in Gegenwart des *InD* Proteins noch weniger funktionelle *R+C1* transkriptionsaktivierende Komplexe gebildet werden könnten. Das würde zu einer stärkeren Hemmung der Expression des *C2* Gens führen. Hierdurch würde eine geringere Menge an Chalkonsynthase vorliegen, was letztendlich zu weniger gefärbten Maiskörnern führt.

Durch die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse kann nicht ausgeschlossen werden, daß das myc-homologe *Intensifier* Genprodukt trotz Lokalisation im Zellkern und der möglichen Interaktion mit dem myb-homologen *C1* Protein, auch auf der posttranskriptionalen Ebene auf die Expression von *Whp* wirkt. Diese posttranskriptionale Kontrolle könnte bereits im Zellkern erfolgen und die Bereiche der RNA Prozessierung, der RNA Stabilität und des Exports aus dem Zellkern betreffen (Sullivan und Green, 1993). Hierbei könnte die Möglichkeit bestehen, daß das *Intensifier* Genprodukt im Zellkern an die (m)RNA der Chalkonsynthase bindet und dadurch schließlich die Translation der mRNA verhindert.
Ein Mais Protein, welches sowohl an DNA als auch an RNA binden kann, ist bereits näher charakterisiert worden. Heyl *et al*. (2001) führten Untersuchungen mit dem *MEM1* Protein

(maize endosperm motif binding protein) durch. Sie verwendeten für diese Untersuchungen eine Sequenz, welche in den Promotoren verschiedener spezifisch im Endosperm expremierter Gene konserviert ist. Hiermit wurde gezeigt, daß das *MEM1* Protein eine mehr als 10 fach stärkere Affinität für die RNA als für die DNA mit gleicher Sequenz hat. Das *MEM1* zeigt hierbei jedoch keine Homologie zu dem *Intensifier* Genprodukt, sondern gehört zu einer neuen Klasse von molekularen Chaperonen. Daher bleibt fraglich, ob das myc-homologe *Intensifier* Genprodukt eine ähnliche Funktion besitzen könnte. Bislang sind keine Untersuchungen veröffentlicht worden, die den Aspekt der RNA-Bindung durch myc-homologe Proteine behandeln.

4.6 Ausblick

Mit der Verwendung des Two Hybrid Systems kann nicht ausgeschlossen werden, daß endogene Hefefaktoren die Interaktion zwischen den untersuchten Proteinen beeinflussen können. Hierdurch könnten falsche Rückschlüsse auf die bestehende oder ausbleibende Interaktion zwischen den untersuchten Proteinen gezogen werden.

Die durchgeführten Experimente mit dem Two Hybrid System weisen auf eine Interaktion des *Intensifier* Genproduktes mit dem *C1* und *R* Protein hin. Mit dieser Methode läßt sich aber keine eindeutige Aussage darüber machen, wie stark die Affinität dieser Proteine zueinander ist. Hierbei auch bezüglich der Unterschiede zwischen dem *Intensifier* Genprodukt der Allele *In* und *InD*. Diese Informationen könnten helfen aufzuklären, ob bestehende funktionslose Komplexe (aus *C1+Intensifier* oder *R+Intensifier*) in funktionelle *C1+R* Komplexe umgewandelt werden könnten.

Um zu untersuchen, ob endogene Hefefaktoren eine Interaktion beeinflusst haben könnten und wie stark die Affinität der untersuchten Proteine zueinander ist, könnten mit aufgereinigten Proteinen „Protein Affinitäts Chromatographie“ Experimente durchgeführt werden. Bei dieser Methode wird eines der auf Interaktion zu testenden Proteine (z.B. *C1*) kovalent an eine Matrix, z.B. an eine Sephadexsäule gebunden. Diese vorbereitete Matrix wird mit einer Lösung inkubiert, welche das zweite Protein (z. B *Intensifier* Genprodukt) enthält und das Eluat anschließend auf Anwesenheit des zweiten Proteins untersucht. Bindet das erste an das zweite Protein, so sollte das Eluat weniger vom zweiten Protein enthalten, als die Ausgangslösung. Durch das Waschen der Matrix mit verschiedenen Lösungen kann festgestellt werden, wie stark diese Proteine miteinander interagieren und wie groß die Bindungskonstante ist. Hierfür könnten Lösungen verwendet werden, die ein Kompetitorprotein (z.B. *R*) enthalten, wodurch die gebundenen Proteine freigesetzt werden.

Mit dieser Methode ließe sich vermutlich auch feststellen, ob das *Intensifier* Genprodukt auch mit dem bereits gebildeten Komplex aus *R+C1* interagieren kann. Anhand der in dieser Arbeit vorgestellten Experimente konnte über diese mögliche Interaktionen keine eindeutige Aussage gemacht werden.

Die durchgeführten Untersuchungen werfen die Frage auf, wo die Interaktion mit dem *C1* Protein und dem *R* Protein erfolgt. Bindet das *Intensifier* Genprodukt in der Promotorregion der Strukturgene und konkurriert mit dem *R* Protein möglicherweise um die myc-Konsensussequenz oder findet die Interaktion entfernt von der DNA statt ? Um zu untersuchen, ob das *Intensifier* Genprodukt an bestimmte DNA Sequenzen (z.B. myc-Konsensussequenz oder 5‘ UTR-Region des *Whp* Gens) binden kann, könnten „Gel-Retentionsanalysen“ durchgeführt werden. Bei dieser Methode wird das aufgereinigte Protein mit markierter DNA inkubiert. Anschließend erfolgt die Analyse durch eine Polyacrylamidelektrophorese, wobei die Wanderungsgeschwindigkeit der proteinfreien DNA mit der eines mit dem Protein komplexierten DNA-Fragmentes verglichen wird. Die Spezifität der Wechselwirkung zwischen dem Protein und des DNA Fragmentes kann durch Zugabe von unterschiedlichen Mengen an Kompetitor DNA festgestellt werden.

Rojek (1996) und Franken *et al*. (1991) vermuten, daß es sich bei dem *Intensifier* Genprodukt um einen negativ regulierenden Faktor handelt, der auf post-transkriptionaler Ebene die Synthese der Chalkonsynthase beeinflusst. Um das *Intensifier* Genprodukt auf seine Fähigkeit zur RNA Bindung zu testen, könnten Untersuchungen mit dem Tri Hybrid System (Putz *et al*., 1996) durchgeführt werden. Dieses System ist eine Modifizierung des, in dieser Arbeit verwendeten, Two Hybrid Systems.
In dem Tri Hybrid System ist die DNA-Bindedomäne von Gal4 mit dem charakterisierten RRE-RNA-Bindeprotein *RevM10* fusioniert. Die RRE-RNA ist mit der zu testenden RNA (z.B. Chalkonsynthase) fusioniert. Das auf die RNA Bindung zu testenden Protein (z.B. *Intensifier*) ist mit der Aktivierungsdomäne von Gal4 fusioniert. Können diese drei Hybridprodukte interagieren, erfolgt eine Aktivierung der Reportergene *HIS3* und *lacZ*.
Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine *InD1* Two Hybrid cDNA Bank hergestellt, mit der eine große Anzahl unbekannter Proteine auf eine Interaktion mit *InD1* untersucht werden können. Die Analyse dieser Bank konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt werden. Würde durch die Analyse dieser Bank eine Interaktion zwischen *InD1* und weiteren an der Anthocyanbiosynthese beteiligten Proteinen (z.B. Transkriptionsfaktoren *P*, *Vp1*, siehe

Einleitung) festgestellt, könnte das auf eine Funktion des *InD1* als genereller Inhibitor der Anthocyanbiosyntheseweges hinweisen.

Anhand der *in vivo* Lokalisationsstudien konnte die Vermutung bestätigt werden, daß das *Intensifier* Genprodukt mindestens eine Signalsequenz, im carboxyterminalen Bereich, für den aktiven Kernimport enthält. Sequenzvergleiche des *Intensifier* Genproduktes mit *R* und anderen myc-homologen Proteinen belegen eine große Ähnlichkeit dieser Proteine zueinander. Speziell in dem Bereich der basischen Helix-Loop-Helix Region, in der die mediale Kernlokalisierungssequenz von *R* liegt, besteht eine hohe Homologie. Durch Deletionsanalysen könnte untersucht werden, ob diese homologen Aminosäuren oder andere Aminosäuren für den aktiven Kernimport des *Intensifier* Genproduktes verantwortlich sind.

Die *in vivo* Lokalisationsstudien wurden nicht mit Maiszellen durchgeführt, sondern mit den Zellen des heterologen Systems Zwiebel. Um festzustellen, ob die erhaltenen Ergebnisse auch für Maisgewebe gelten, sollte geeignetes Gewebe mit den GFP markierten Proteinen transformiert werden. Hierfür könnten möglicherweise Maisprotoplasten verwendet werden.

Es ist unklar wieviel myc-homologes *Intensifier* Genprodukt in den Aleuronzellen des Maiskorns vorliegt. Des weiteren ist nicht bekannt wieviel *R* und *C1* Protein in diesen Zellen vorliegen. Diese Informationen könnten helfen eine Aussage darüber zu treffen wieviele funktionslose Komplexe (aus *C1+Intensifier* oder *R+Intensifier*) im Verhältnis zu funktionellem *R+C1* Komplexen vorliegen. Hierdurch könnten weitere Rückschlüsse auf den Einfluß des *Intensifier* Genproduktes auf die Anthocyanbiosynthese gezogen werden.
Um eine Vorstellung von der gebildeten Proteinmenge zu bekommen, könnten *in situ* Hybridisationen oder Western Blot Analysen von Maiskörnern der verschiedenen *Intensifier* Allele durchgeführt werden. Hierfür sollten Antikörper verwendet werden, die nur gegen ein Oligopeptid und nicht gegen das ganze *Intensifier* Genprodukt gerichtet sind. Würde das ganze Genprodukt verwendet, so wird höchstwahrscheinlich eine Kreuzhybridisierung mit anderen myc-homologen Proteinen erfolgen.

5 Zusammenfassung

Das *Intensifier* Gen aus *Zea mais* L. ist zusammen mit den beiden Transkriptionsfaktoren *C1* und *R* an der Regulation des Anthocyanbiosyntheseweges beteiligt. Die Genprodukte von *C1* und *R* sind nötig, um die Strukturgene des Biosynthesweges zu aktivieren. Sie binden an die jeweiligen Promotoren der Strukturgene und aktivieren damit deren Transkription. Das *Intensifier* Gen wirkt in diesem Aktivierungsprozeß negativ regulierend, in dem es wahrscheinlich in die Bildung des Transkriptionskomplexes von *C1* und *R* eingreift.
Diese Annahme sollte durch Untersuchungen mit dem Two Hybrid System und Lokalisationsstudien überprüft werden.

Von dem *Intensifier* Gen sind drei Allele (*in*, *In*, und *InD*) bekannt. Von diesen ist für *In* und *InD* ein negativ regulierender Effekt nachgewiesen worden, der sich phänotypisch durch eine Farbreduktion der Maiskörner erkennen läßt.

Mit der Methode des Two Hybrid Systems wurde untersucht, ob eine Interaktion des *Intensifier* Genproduktes mit dem Genprodukt von *C1* oder *R* erfolgen kann und welche Bereiche dieser Proteine dafür benötigt werden.
Hiermit wurden verschiedene Produkte von *Intensifier* Allelen untersucht: das Protein eines fehlgespleißten Transkriptes (*InXS*) und das Protein des *InD* Allels (*InD1*). Da kein vollständiges Protein des *In* Allels verfügbar war, wurde ein *In*-ähnliches Fusionsprotein (*InFus*) aus Teilen von *In* und *InD1* hergestellt. Als Interaktionspartner wurden das vollständige (*R*) und das verkürztes *R* Protein (*Rdel:* ohne basische Helix-Loop-Helix Region) verwendet. Des weiteren das vollständige *C1* Protein und das mutierte *C1* Protein (*C1-I*), welches keine transkriptionsaktivierende Domäne besitzt.
Aus den Untersuchungen mit dem Two Hybrid System kann abgeleitet werden, daß das *Intensifier* Genprodukt, im Gegensatz zum homologen *R* Protein, vermutlich keine funktionelle transkriptionsaktivierende Domäne besitzt. Die Untersuchungen weisen auf eine Interaktion des *Intensifier* Genproduktes mit dem carboxyterminalen Endes des *R* Proteins hin. Des weiteren kann das *Intensifier* Genprodukt mit dem *C1* Protein interagieren. Diese Interaktionen sind, zumindest im Two Hybrid System, allerdings sehr schwach.

In vivo Lokalisationsstudien sollten anschließend zeigen, ob das *Intensifier* Genprodukt auch in den Zellkern transportiert wird. Mit dieser Methode konnte in epidermalen Zwiebelzellen

gezeigt werden, daß das *Intensifier* Genprodukt wie das *R* Protein im Zellkern lokalisiert ist. Dieses Ergebnis weist darauf hin, daß das *Intensifier* Genprodukt wahrscheinlich nicht auf der posttranskriptionellen Ebene im Zytoplasma wirkt.

Anhand der Ergebnisse der Untersuchungen mit dem Two Hybrid System und der *in vivo* Lokalisationsstudien läßt sich vermuten, daß das Produkt des *Intensifier* Gens in den Transkriptionskomplex von *C1* und *R* eingreift. Hierbei scheinen auch die in den Allelen *In* und *InD* unterschiedlich vorliegende Transkriptionsrate des *Intensifier* Gens eine Rolle zu spielen, da der negativ regulierende Effekt beim transkriptionell stark exprimierten *InD* Allel gravierender ausgeprägt ist, als beim Allel *In*.

6 Literatur

Allen, G., Hall, G., Childs, L., Weissinger, A., Spiker, S., Thompson, W. (1993): Scaffold attachment regions increase reporter gene expression in stably transformed plant cells. *Plant Cell* **5**: 603-613

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.

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. *The Plant Cell* **8**: 1249-1259

Chandler, V.L., Radichella, J.P., Robbins, T.P., Chen, J., Turks, D. (1989): Two regulatory genes of the maize anthocyanin pathway are homologous: Isolation of *B* utilizing *R* genomic sequences. *Plant Cell* **1**:1175-1183

Clarke, H.R.G, Leigh, J.A., Douglas, C.J. (1992): Molecular signals in the interaction between plants and microbes. *Cell* **71**: 191-199

Coe, E.H. Jr., Neuffer, M.G. (1977): in: Sprague, G.F. (ed.): Corn and corn improvement, American society of agronomy Madison, WI: 111-123

Coe, E.H., McCormick, S.M., Modena, S.A. (1981). White pollen in maize. *J. Hered*. **72**: 318-320

Coe, E.H,. Hoisington, D.A., Neuffer, M.G. (1988): The genetics of corn.

Van Crieckinge, W., Beyaert, R. (1999): Yeast Two-Hybrid: State of the Art. Biological Procedures Online Vol. 2: www.science.uwaterloo.ca/bpo/

Davis, R.L., Cheng, P.F., Lassa, A.B., Weintraub, H. (1990): The MyoD DNA binding domain contains a recognition code for muscle-specific gene activation. *Cell* (60): 733-746

D'Halluin, K., Bonne, M., DeBeuckeleeer, M., Leemans, J. (1992):Transgenic maize plants by tissue electroporation. *Plant Cell* **4**: 1495-1505

Dujon, B., Alexandraki, D., Andre, B., Ansorge, W., Baladron, V., Ballesta, J.P., Banrevi, A., Bolle, P.A., Bolotin-Fukuhara, M., Bossier, P. (1994): Complete DNA sequence of yeast chromosome XI. *Nature* **369**: 371-378

Estojak, J., Brent, R., Golemis, E.A. (1995): Correlation of Two-Hybrid Affinity Data with In Vitro Measurements. *Molecular and Cellular Biology* **15**: 5820-5829

Fields, S., Song, O.K. (1989): A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* **340**: 245-246

Franken, P., Niesbach-Klösgen, 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

Garcia-Bustos, J., Heitman, J., Hall, M.N. (1991): Nuclear protein localization. Biochim. Biophys. Acta. **1071**: 83-101

Goff, S.A., Cone, K.C., Chandler, V. (1992): Functional analysis of the transcriptional activator encoded by the maize *B* gene: evidence for a direct funtional interaction between two classes of regulatory proteins. *Genes and Dev.* **6**: 864-875

Graham, I.R., Haw, R.A., Spink, K.G., Halden, K.A., Chambers, A. (1999): In vivo analysis of functinal regions within yeast Rap1p. *Molecular and Cellular Biology*: 7481-7490

Green, C.E. and Philips, R.L. (1975): A common gene regulates pigmentation pattern in diverse plant species. *Cell* **68**: 955-964

Grisebach, H. (1965): In Goodwin, T.W (Ed.): Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments. Academic Press, London: 279-308

Grotewold, E., Drummond, B.J., Bowen, B., Peterson, T. (1994): The myb-homologous *P* gene controls phlobaphene pigmentation in maize floral organs by directly activating a flavonoid biosynthetic gene subset. *Cell* **76**: 543-553

Grotewold, E., Sainz, M.B., Tagliani, L., Hernandez, J.M., Bowen, *B.*, Chandler, V. (2000): Identification of the residues in the myb domain of maize *C1* that specify the interaction with the bHLH cofactor R. *Proc. Natl. Acad. Sci*. **97**: 13579-13584

Harborne, J.B., (1988): In Goodwin, T.W. (Ed.): Plant Pigments. Academic Press. London, San Diego, New York, Berkeleyl, Boston, Sydney, Tokyo, Toronto: 299-343

Harrison, M.J., Dixon, R.A. (1994): Spatial patterns of expression of flavonoid/ isoflavonoid pathway genes during interactions between roots of *Medicago truncatula* and the mycorrhizal fungus *Glomus versiforme*. *Plant J*. **6**: 9-20

Heller, W., Forkman, G., (1988): Biosynthesis. In Harborne, J.B. (Ed.): The Flavonoids. Chapman and Hall, London: 399-425

Herrmann, H. M. (2000): Isolierung und Charakterisierung des *Intensifier*-Allels in aus *Zea mays* L.. Diplomarbeit am Fachbereich Biologie der Universität Hamburg

Heese-Peck, A., Raikhel, N.V. (1998): The nuclear pore complex. *Plant. Mol. Biol*. **38**: 145-162

Heyl, A., Muth, J., Santandrea, G., O‘ Connel, T., Serna, A., Thompson, R.D. (2001): A transkript encoding a nucleic acid-binding protein specifically expressed in maize seeds. *Mol. Genet. Genomics* **266**: 180-189

Hicks, G.R., Raikhel, N.V. (1995): Protein import into the nucleus: an integrated view. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol*. **11**: 155-188

Holmes, D. S., Quigley, M. (1981): A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal. Biochem*. **114**: 193-197

Holton, T.A., Cornish, E.C. (1995): Genetics and Biochemistry of Anthocyan Biosynthesis. *Plant Cell* **7**: 1071-1083

Horvath and Riezman, Gottschling Lab (1994): http://www.fhcrc.org/labs/hahn/ methods/biochem_meth/yeast_prot_SDS.html

Ito *et al.*(1983): J.Bact.**153**: 163-168

Kao, C.Y., Cocciolone, S., Vasil, I.K., McCarty, D. (1996): Localization and interaction of the *cis*-acting elements for abscisic acid, *Viviparous1*, and light activation of the *C1* gene of maize. *Plant Cell* **8**: 1171-1179

Kirsch, H. (2002). Dissertation am Fachbereich Biologie der Universität Hamburg

Koes, R.E., Quattrocchio, R, Mol, J.N.M (1994): The flavonoid biosynthetic pathway in plants: function and evolution. *BioEssays* **16**: 123-132

Kootstra, A. (1994): Protection form UV-B-induced DNA damage by flavonoids. *Plant Mol. Biol*. **26**: 771-774

Legrain, P., Dokhelar, M.C., Transy, C. (1994): Detection of protein-protein interactions using different vectors in the two-hybrid system. *Nucl. Acids Res*. **22**: 3241-3242

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., Eisenmann, R.N. (1990): New lights on Myc and Myb. Part I and Part II. *Genes Dev*. **4**: 2025-2035, 2235-2241

Ma, J., Ptashne, M. (1987): Deletion Analysis of GAL4 defines two transcriptional activating segments. *Cell* **48**: 847-853

Marrs, K.A., Alfenito, M.R., Lloyd, A.M., Walbot, V. (1995): A glutathion S-transferase involved in vacular transfer encoded by the maize *bronze 2*. *Nature* **375**: 379-400

Montgomery, J. Goldman, S., Deikman, J., Margossian, L., Fischer, LR. L. (1993): Identification of an ethylene-responsive region in the promoter of a fruit-ripening gene. *Proc. Natl. Acad. Sci*. USA **90**: 5939-5349

Murre, C., McCaw, O.S., Vaessin, H., Caudy, M., Jan, L.Y., Jan, Y.N., Cabrera, C.V., Buskin, J.N., Hauschka, S.D., Lassar, A.B., Weintraub, H., Baltimor, D. (1989): Interactions between heterologous helix-loop-helix proteins generate complexes that bind specifically to a common DNA sequence. *Cell* **58**: 537-544

Nicholas, K.B., Nicholas H.B. Jr., and Deerfield, D.W. II. (1997): GeneDoc: Analysis and Visualization of Genetic Variation, *EMBNEW.NEWS* 4:14

Pang, S.Z., DeBoer, D.L., Wan, Y., Ye, G., Layton, J.G., Neher, M.K., Armstrong, C.L., Fry, J.E., Hinchee, M.A.W., Fromm, M. (1996): An improved green fluoreszent Protein gene as a vital marker in plants. *Plant Phys*. Vol **112**: 893-900

Paz-Ares, J., Ghosal, D., Wienand, U., Peterson, P.A., Saedler, H. (1987): The regulatory *c1* locus of *Zea mays* encodes a protein with homology to *myb* proto-oncogen products and with structural similarities to transcriptional activators. *EMBO Journal* **6**: 3553-3558

Paz-Ares, J., Ghosal, D., Saedler, H. (1990): Molekular analysis of the *C1-I* allel from *Zea mays*: a dominant mutant of the regulatory *C1* locus. *EMBO Journal* **9**: 315-321

Pusch, I. (2000): Struktur- und Funktionsanalyse des regulativen Anthocyangens *Intensifier* aus *Zea mays* L.. Dissertation am Fachbereich Biologie der Universität Hamburg

Putz, U., Skehel, P., Kuhl, D. (1996): A tri-hybrid system for the analysis and detection of RNA-protein interactions. *Nucl. Acids Res*. **24:** 4838-4840

Raikhel N.V. (1992): Nuclear targeting in plants. *Plant Physiol*. **100**: 1627-1632

Robinson, K.A., Koepke, J.I., Kharodawala, M., Lopes, M.J. (2000): A network of yeast basic-helix-loop-helix interactions. *Nucl. Acids Res*. **28**: 4460-4466

Rojek, R.B. (1996): Molekulare Analyse des regulativen Farbgens *Intensifier* aus *Zea mays* L. Untersuchungen zur Struktur und Funktion des Allels *Intensifier dilute*. Dissertation am Fachbereich Biologie der Universität Hamburg

Sambrook, J., Fritsch, E.F., Manniatis, F. (1989): Molecular cloning: a laboratory manual. second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York

Sanford, J.C., Smith, F.D., Russel, J.A. (1993): Optimizing the biolistic process for different biological applications. *Meth. Enzymol*. **217**: 483-509

Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R. (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Acad. Sci*. USA **74**, 5463 – 5467

Shieh, M.W., Wessler, S.R., Raikhel, N.V. (1993): Nuclear Targetting of the maize R Protein requires two nuclear localization sequences. *Plant Physiol*. **101**: 353-361

Smith, H.M.S., Hicks, G.R., Raikhel, N.V. (1997): Importin α from *Arabidopsis thaliana* is a nuclear import receptor that recognizes three classes of import signals. *Plant Physio*. **114**: 411-417

Styles, E.D, Ceska, O., Seah, K.T. (1973): Developmental differences in action of R and B alleles in maize. *Can. J. Genet. Cytol*. **15**: 59-72

Sullivan, M.L, Green, P.J. (1993): Post-transcriptional regulation of nuclear-encoded genes in higher plants: the roles of mRNA stability and translation. *Plant Mol. Biol*. **23**: 1091-1104

Unseld, S., Höhnle, M., Ringel, M., Frischmuth, T. (2001): Subcellular targetting of the coat protein of africa cassava mosaic geninivirus. *Virology* **286**: 373-383

Vain, P., McMullen, M.D., Finer, J.J. (1993): Osmotic treatment enhances particle bombardment– mediated transient and stable transformation of maize. *Plant Cell Report* **12**: 84-88

Varagona, M.J., Schmidt, R.J, Raikhel, NV. (1992): Nuclear localization signal(s) required for nuclear targeting of the maize regulatory protein, Opaque-2. *Plant Cell* **4**: 1213-1227

Wang, H., Clark, I., Nicholson, P.R., Herskowitz, I., Stillman, D.J (1990): The *saccharomyces serivisiae SIN3* gene, a negative regulator of HO, contains four paired amphipathic helix motifs. *Mol. Cell Biol*. **10**: 5927-5936

Weiss, M.R. (1991): Floral colour changes as cues for pollinators. *Nature* **354**: 227-229

Wienand, U., Weydemann, U, Niesbach-Klösgen, U., Peterson, P.A., Saedler, H. (1986): Molekular cloning of the *c2* locus of *Zea mays*, the gene coding for chalcon synthase. *Mol Gen. Genet*. **203**: 202-207

Willson, M.F., Whelen, C.J. (1990): The evolution of fruit color in fleshy-fruited plants. *Am. Nat.* **136**: 790-809

7 Anhang

Tabelle 16: *lacZ*-Reportergenaktivierung der Transformanten mit drei Proteinen

Transf.	Proteine	β-Gal rel. Einh.	MW rel. Einh.	MW in %
y117	GAL4	40,27	36,64	**100**
y117	GAL4	33,02		
Y236	AD-*R** + AD + BD-*C1*	23,26		63
Y237	AD-*R** + AD + BD-*C1*	18,01		49
Y238	AD-*R** + AD + BD-*C1*	16,54		45
Y239	AD-*R** + AD-*InXS* + BD-*C1*	20,68		56
Y240	AD-*R** + AD-*InXS* + BD-*C1*	23,33		64
Y241	AD-*R** + AD-*InXS* + BD-*C1*	0,02		0
Y245	AD-*R** + AD-*InD* + BD-*C1*	13,20		36
Y246	AD-*R** + AD-*InD* + BD-*C1*	26,54		72
Y247	AD-*R** + AD-*InD* + BD-*C1*	25,56		70
Y248	AD-*R** + AD + BD-*C1-I*	4,33		12
Y249	AD-*R** + AD + BD-*C1-I*	16,28		44
Y250	AD-*R** + AD + BD-*C1-I*	34,50		94
Y251	AD-*R** + AD-*InXS* + BD-*C1-I*	46,23		126
Y252	AD-*R** + AD-*InXS* + BD-*C1-I*	22,49		61
Y253	AD-*R** + AD-*InXS* + BD-*C1-I*	15,88		43
Y257	AD-*R** + AD-*InD* + BD-*C1-I*	8,31		23
Y258	AD-*R** + AD-*InD* + BD-*C1-I*	3,88		11
Y259	AD-*R** + AD-*InD* + BD-*C1-I*	2,86		8

* = Plasmid mit funktionslosem LEU Gen

In Proteinextrakten aus Flüssigkulturen der Hefetransformanten, wurde die β-Galaktosidase Aktivität mittels quantitativem Nachweis festgestellt. Aus jedem Transformationsereignis wurden 2-3 unabhängige Transformanten (Transf.) untersucht und die erhaltenen relativen β-Galaktosidase Aktivitäten gemittelt. Die ermittelten relativen Einheiten des nativen pGal4 wurden 100% gesetzt. Alle übrigen Messungen wurden auf diesen Wert bezogen.

Die Ergebnisse zeigen starke Unterschiede innerhalb der analysierten Transformanten, die als Kontrollen dienen sollten (fett markierte Zeilen). Es wurden dabei Aktivitäten zwischen 12 % und 94 %, relativ zu der durch Gal4 hervorgerufenen Aktivität, gemessen. Aufgrund dieser Schwankungen bei den Kontrollen, ist es nicht möglich die β-Galaktosidase Messdaten der Transformanten mit AD-*R*, BD-*C1* und den AD-*InXS* oder AD-*InD1* Fusionsproteinen zu deuten.

Inkub.in min. = Inkubationszeit in Minuten, β-Gal = β-Galaktosidase; rel.Einh. = relative Einheiten; MW = gemittelter Wert

Primer

⇒ vorwärts Primer ⇐ rückwärts Primer

Tabelle 17: verwendete Primer

Primer Name	Sequenz 5´- 3´	Position/ Bemerkung	Lese-richtung
B3	gctactgctgcttgatcttctgccc	Intron 6 von *In*	⇐
F1	ccgctagtgaaaatcgtttccagga	Intron 6 von *In*	⇒
Nat – OL- 010	gcgtttggaatcactacaggga	5´ Ende von pAD Gal 4	⇒
Nat – OL- 011	gcacagttgaagtgaacttgc	3´ Ende von pAD Gal 4	⇐
Nat – OL- 012	tgagaaagcaacctgacctacagg	3´ Ende von pBD Gal 4	⇐
Nat – OL- 013	gaataagtgcgacatcatcatcgg	5´ Ende von pBD Gal 4	⇒
Nat – OL- 014	cgaattcgcagataggcgcgtgatggcg	*R-Lc* 5´ Ende	⇒
Nat – OL- 022	cgtcgactgcaaccaaacaccttatgcca	*R-Lc* 3`Ende	⇐
Nat – OL- 023	cgtcgacttttcttcagcaatctctgcggc	*R-Lc* vor der bHLH	⇐
Nat – OL- 024	gctcgagtggcgatg-ttgaggaggctgc	*In* ; eine Base fehlt !	⇐
Nat – OL- 026	cggatccgatggcgctttcagcttcccgagt	*R-LC* 5´ Ende	⇒
Nat – OL- 027	cggatccgcagcagcaggtagccatcccagcc	*In (InD)* 5´ Ende	⇒
Nat – OL- 028	aggatccgctagacatggattcttctcgca	*In (InD)* 3´ Ende ohne Stopp	⇐
Nat – OL- 029	aggatccgaggacgacgacgatggc	*C2* 5` Ende	⇒
Nat – OL- 030	aggatccgtggccgctccggtg	*C2* 3´ Ende ohne Stopp	⇐
Nat – OL- 031	cggatcccgcttccctatagctttgcgaag	*R* 3´ Ende ohne Stopp	⇐
Nat – OL- 036	gcatcaccttcaccctct	5´ GFP	⇐
Nat – OL- 53	ccatggacgcgtgccggcaaacgcga	*In* homolog (acgcgt) 3´ ga homolog zu InD	⇒
Nat – OL- 54	ccggcacgcgttggaccga	Exon 7 InD homolog	⇐

zusätzliche Schnittstellen:

gaattc = *Eco*RI ctcgag = *Xho*I ccatgg = *Nco*I

ggatcc = *Bam*HI gtcgac = *Sal* I acgcgt = *Mlu*1

```
C1  : MGRRACCAKEGVKRGAWTSKEDDALAAYVKAHGEGKWREVPQKAGLRRCG :  50
C1I : MGRRACCAKEGVKRGAWTSKEDDALAAYVKAHGEGKWREVPQKAGLRRCG :  50

C1  : KSCRLRWLNYLRPNIRRGNISYDEEDLIIRLHRLLGNRWSLIAGRLPGRT : 100
C1I : KSCRLRWLNYLRPNIRRGNISYDEEDLIIRLHRLLGNRWSLIAGRLPGRT : 100

C1  : DNEIKNYWNSTLGRRAGAGAGAGGSWVVVAPDTGSHATPAATSGACETGQ : 150
C1I : ENEIKNYWNSTLGRRAGAGAG--GSRVVVAPDTGSHATPAATSGSSETGQ : 148

C1  : NSAAHRADPDSAGTTTTSAAAVWAPKAVRCTGGLFFFHRDTTPAHAGETA : 200
C1I : KGAAPRADPDSAGTTTTSAAAVWAPKAVRCTSGLFFFHRDTTPAHAGETA : 198

C1  : TPMAGGGG--GGGGEAGSSDDCSSAASVSLRVGSHDEPCFSGDGDGDWMD : 248
C1I : TPMAGGGGVGGGGGEAGSSDDCSSAASVSPRVGSHDEPCFSGDGDGDWMD : 248

C1  : DVRALASFLESDEDWLRCQTAGQLA : 273
C1I : SWTTSF------------------- : 254
```

Abbildung 77: Aminosäuresequenzvergleich der Proteine *C1* und *C1-I*

Die Region von 1-115 markiert die basische Domäne und die Region von 249 markiert die saure Domäne, die charakteristisch für myb-Onkogen Transkriptionsfaktoren sind. Das C1-I Protein ethält keine funktionelle saure Transkriptionsaktivierende Domäne.
Die konservierten Aminosäure-Austausche sind in grün markiert, die nicht-konservierten in rot.

```
In     : MAAGGRG---EAAQKALQSVAQSTGWTYSLLWRLCPRQGALVWAEGYYNGAIRTRKTTMT :  57
InD1   : MAAGGGGGGEAAQKALQSVAQSTGWTYSLLWRLCPRQGALVWAEGYYNGAIRTRKTTMT :  60
InFus  : MAAGGRG---EAAQKALQSVAQSTGWTYSLLWRLCPRQGALVWAEGYYNGAIRTRKTTMT :  57
InXS   : MAAGGRG---EAAQKALQSVAQSTGWTYSLLWRLCPRQGALVWAEGYYNGAIRTRKTTMT :  57

In     : TVRQPAGAEDAGDEETAPRRSRQLKELYDSLAAGEAAYDGGGGVGGPQQQQ---QAAVVP : 114
InD1   : TVRQPAGAEDAGDEETALRRSRQLKELYDSLAAGEAAYDGGGGVGDPQQQQHQQQVAVVP : 120
InFus  : TVRQPAGAEDAGDEETAPRRSRQLKELYDSLAAGEAAYDGGGGVGGPQQQQ---QAAVVP : 114
InXS   : TVRQPAGAEDAGDEETAPRRSRQLKELYDSLAAGEAAYDGGGGVGGPQQQQ---QAAVVP : 114

In     : PPRRPAAALAPEDLTETEWFYLMCASYCFPPAVGLPGEAFVRRAHVWLCGANKADSKVFS : 174
InD1   : PPRRPAAALAPEDLTETEWFYLLCASYCFPPAVGLPGEAFVRRAHVWLCGANKADSKVFS : 180
InFus  : PPRRPAAALAPEDLTETEWFYLMCASYCFPPAVGLPGEAFVRRAHVWLCGANKADSKVFS : 174
InXS   : PPRRPAAALAPEDLTETEWFYLMCASYCFPPAV--------------------------- : 147

In     : RAILARSAGIQTVACIPVDDGVLEIGTTEKVEEDIFLIQHVRNIFVDQHGAHIMPTTLSG : 234
InD1   : RAILARSAGIQTVACIPVDDGVLEIGTTEKVEEDIFLIQHVRNIFVDQHGAHIMPTTLSG : 240
InFus  : RAILARSAGIQTVACIPVDDGVLEIGTTEKVEEDIFLIQHVRNIFVDQHGAHIMPTTLSG : 234
InXS   : ------------------------------------------------------------ :   -

In     : YSTSTPTTQLNH-QPFQTKTGISLNLGDERNSEMEDDDDEGRIDLENNTENDSTRRHLPQ : 293
InD1   : YSTSTPTTQLNHHQPFQTKTGISLNLGDERNSEMEDDDD-GRIDLENNTENDSTRRHLPQ : 299
InFus  : YSTSTPTTQLNH-QPFQTKTGISLNLGDERNSEMEDDDDDGRIDLENNTENDSTRRHLPQ : 293
InXS   : ------------------------------------------------------------ :   -

In     : DASAGNELETLNAESSGPMLIANLTAQDEYGQLHRFLSVDLSSKYLQSPGAEDQAAVAEN : 353
InD1   : DASVGNELETLNAESSGPMLIANLTAQDEYGPLHRFLSVDLSSKYLQSPGAEGQAAVAEN : 359
InFus  : DASAGNELETLNAESSGPMLIANLTAQDEYGQLHRFLSVDLSSKYLQSPGAEDQAAVAEN : 353
InXS   : ------------------------------------------------------------ :   -

                    ▼
In     : AHYIETVLRILRPNACRQTQAASSNLAKTYLALSKNSPFSRWNWKRKGISSMMIAEGTPQ : 413
InD1   : AHYIETVLRILRSNACRQTRAAS-NVVKTYLALSKNSPFSRWNWKRKGISSMLIPEGTPQ : 418
InFus  : AHYIETVLRILRPNACRQTRAAS-NVVKTYLALSKNSPFSRWNWKRKGISSMLIPEGTPQ : 412
InXS   : ------------------------------------------------------------ :   -

In     : RMLKSVLLGAPSSSSHRSHRGEVQSSSPEPRGDDGEGTSRSRRGPVPSQTELSASHVLKE : 473
InD1   : RMLKSVLLGAPSSSSHRSHRGEVQSSSPEPRGDDGEGTSRSRRGPVPSQTELSASHVLKE : 478
InFus  : RMLKSVLLGAPSSSSHRSHRGEVQSSSPEPRGDDGEGTSRSRRGPVPSQTELSASHVLKE : 472
InXS   : ------------------------------------------------------------ :   -
                                                          basisch

In     : RRRREKLNEGFAMLRSLVPFVTKMDRASILGDTIEYVKQLRRRIQELESRRRLVGSNQKT : 533
InD1   : RRRREKLNEGFAMLRSLVPFVTKMDRASILGDTIEYVKQLRRRIQELESRRRLVGSNQKT : 538
InFus  : RRRREKLNEGFAMLRSLVPFVTKMDRASILGDTIEYVKQLRRRIQELESRRRLVGSNQKT : 532
InXS   : ------------------------------------------------------------ :   -
                Helix           loop        Helix

In     : TMAQQPPPPAASTEERGRRQTSGGYLARAAGTGSRAAEASGNSNLGEEPPAAAASDTDTE : 593
InD1   : TMAQQPPPPAASTEERGRRQTSGGYLARAAGTGSRAAEASGNSNLGEEPPAAAASDTDTE : 598
InFus  : TMAQQPPPPAASTEERGRRQTSGGYLARAAGTGSRAAEASGNSNLGEEPPAAAASDTDTE : 592
InXS   : ------------------------------------------------------------ :   -

In     : VQVSIIGSDALLELRCPHREGLLLRVMQALHQELRLEITSVQASSAGDVLLAKLRAKVKE : 653
InD1   : VQVSIIGSDALLELRCPHREGLLLRVMQALHQELRLEITSVQASSAGDVLLAKLRAKVKE : 658
InFus  : VQVSIIGSDALLELRCPHREGLLLRVMQALHQELRLEITSVQASSAGDVLLAKLRAKVKE : 652
InXS   : ------------------------------------------------------------ :   -

In     : VHGRRSSITEVKRAIHLIVSSDWICEKNPCLA-------- : 685
InD1   : VHGRRSSITEVKRAIHLIVSSDWICEKNPCLA-------- : 690
InFus  : VHGRRSSITEVKRAIHLIVSSDWICEKNPCLA-------- : 684
InXS   : ---------------------------------------- :   -
```

Abbildung 78: Aminosäuresequenzvergleich der Proteine *In*, *InD1*, *InFus* und *InXS*

Das Protein *InFus* besteht aus Teilen von *In* (AS 1-366) und *InD1* (AS 373-690). Das Protein *InXS* besteht nur aus den ersten 147 Aminosäuren von In und entält keine basische Helix-loop-Helix Region.
Die konservierten Aminosäure-Austausche sind in grün markiert, die nicht-konservierten in rot. Die Lage der Fusionsstelle aus *In-am und InD-carb*, ist durch ein Dreieck markiert.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der Kernlokalisationsequenzen (NLS) N, M und C innerhalb der *R* Aminosäuresequenz 4
Abbildung 2: myb- und myc- homologe Proteine 5
Abbildung 3: Vergleich der *In* und *InD1* Aminosäuresequenzen mit myc-homologen Proteinen 8
Abbildung 4: Phänotyp von Körnern der drei Mais Allele *In*, *in* und *InD* 9
Abbildung 5: Schematische Darstellung der Interaktion von *R* und *C1* 10
Abbildung 6: Schematische Darstellung der möglichen Interaktion von *In* mit *R* und *C1* 10
Abbildung 7: Schematische Darstellung des Two Hybrid Systems 11
Abbildung 8: Schematische Darstellung der Herstellung der *R* Expressionsplasmide 43
Abbildung 9: Schematische Darstellung der Herstellung der *C1* und *C1–I* Expressionsplasmide 46
Abbildung 10: Schematische Darstellung der Herstellung der *InD1* und *InXS* Expressionsplasmide 49
Abbildung 11: Vergleich der Aminosäuresequenz von *In* und *InD*1 52
Abbildung 12: Schematische Darstellung der Herstellung des Fusionsklons *InFus* 53
Abbildung 13: Schematische Darstellung der Herstellung der *InFus* Expressionsplasmide ... 54
Abbildung 14: Two Hybrid System 58
Abbildung 15: Kontrollen des Two Hybrid Systems 59
Abbildung 16: *HIS3* Reportergenaktivierung der Kontrollen 60
Abbildung 17: *lacZ* Reportergenaktivierung der Kontrollen 61
Abbildung 18: Test der Fusionsproteine auf Autoaktivierung der Reportergene 62
Abbildung 19: *HIS3* Reportergenaktivierung der BD-*R* und BD-*Rdel* Transformanten 64
Abbildung 20: *lacZ* Hintergrundaktivität bei Transformanten mit BD-Fusionsproteinen 66
Abbildung 21: *lacZ* Hintergrundaktivität bei Transformanten mit AD-Fusionsproteinen 67
Abbildung 22: Test der Fusionsproteine auf Interaktion mit der AD oder BD von Gal4 69
Abbildung 23: *lacZ* Reportergenaktivierung bei Transformanten mit der AD und diversen BD-Fusionsproteinen 70
Abbildung 24: *lacZ* Reportergenaktivierung bei Transformanten mit der BD und diversen AD-Fusionsproteinen 71
Abbildung 25: reziproke Kombination der Fusionsproteine X und Y 73
Abbildung 26: *HIS3* Reportergenaktivierung der Transformanten mit BD-*C1* Fusionsprotein und verschiedenen AD-Fusionsproteinen 74

Abbildung 27: *lacZ* Reportergenaktivierung bei Transformanten mit dem BD-*C1* Fusionsprotein und verschiedenen AD-Fusionsproteinen 76
Abbildung 28: Interaktion des BD-*CI* Fusionsproteins mit verschiedenen AD-Fusionsproteinen 77
Abbildung 29: *HIS3* Reportergenaktivierung der Transformanten mit dem BD-*C1-I* Fusionsprotein und verschiedenen AD-Fusionsproteinen 78
Abbildung 30: *lacZ* Reportergenaktivierung bei Transformanten mit dem BD-*C1-I* Fusionsprotein und verschiedenen AD-Fusionsproteinen 80
Abbildung 31: Interaktion des BD-*C1-I* Fusionsproteins mit verschiedenen AD-Fusionsproteinen 81
Abbildung 32: *lacZ* Reportergenaktivierung bei Transformanten mit dem BD-*InXS* Fusionsprotein und verschiedenen AD-Fusionsproteinen 83
Abbildung 33: Interaktion des BD-*InXS* Fusionsprotein mit verschiedenen AD-Fusionsproteinen 84
Abbildung 34: *HIS3* Reportergenaktivierung der Transformanten mit BD-*InFus* Fusionsprotein und verschiedenen AD-Fusionsproteinen 86
Abbildung 35: *lac*Z-Reportergenaktivierung bei Transformanten mit BD-*InFus* Fusionprotein und verschiedenen AD-Fusionsproteinen 88
Abbildung 36: Interaktion des BD-*InFus* Fusionsproteins mit verschiedenen AD-Fusionsproteinen 89
Abbildung 37: *HIS3* Reportergenaktivierung der Transformanten mit BD-*lnD1* Fusionsprotein und verschiedenen AD-Fusionsproteinen 90
Abbildung 38: *lac*Z-Reportergenaktivierung bei Transformanten mit BD-*InD*1 Fusionprotein und verschiedenen AD-Fusionsproteinen 92
Abbildung 39: Interaktion des BD-*InD1* Fusionsproteins mit verschiedenen AD-Fusionsproteinen 94
Abbildung 40: *lacZ* Reportergenaktivierung bei Transformanten mit BD-*R* oder BD-*Rdel* Fusionsproteinen und verschiedenen AD-Fusionsproteinen..... 97
Abbildung 41: Ergebnisse der Interaktion von BD-*R* oder BD-*Rdel* mit verschiedenen AD-Fusionsproteinen 99
Abbildung 42: Interaktion von *R, C1* und den *Intensifier* Proteine..... 100
Abbildung 43: Beeinflussung der Komplexbildung von *R* und *C1* durch die *Intensifier* Proteine 101
Abbildung 44: Zu testende Kombinationen der drei Fusionsproteine 102

Abbildung 45: Selektionsmedium für Transformanten mit drei Expressionsplasmiden 104
Abbildung 46: Herstellung des funktionslosen *LEU2* Markergens..... 105
Abbildung 47: Interaktion der Fusionsproteine *R, Rdel, C1* und *C1-I*..... 108
Abbildung 48: Interaktion der Fusionsproteine *InD1, InFus, C1* und *C1-I*..... 108
Abbildung 49: Interaktion der Fusionsproteine *InD1, InXS, R* und *Rdel*..... 109
Abbildung 50: Bildung von Homodimeren..... 110
Abbildung 51: Herstellung der GFP Expressionsplasmide von *C2, R* und *InD1* 116
Abbildung 52: Herstellung des GFP Expressionsplasmids von *InFus* 117
Abbildung 53: Schematische Darstellung der GFP Fusionsproteine 118
Abbildung 54: nichttransformiertes Maisscutellumgewebe..... 119
Abbildung 55: GFP exprimierendes Maisscutellumgewebe 119
Abbildung 56: *C2*-GFP exprimierendes Maisscutellumgewebe 120
Abbildung 57: *R*-GFP exprimierendes Maisscutellumgewebe 120
Abbildung 58: *InD1*-GFP exprimierendes Maisscutellumgewebe 121
Abbildung 59: GFP Expression in Narbenfäden von Mais..... 123
Abbildung 60: GFP Expression in Narbenfäden von Mais der Linie LC 124
Abbildung 61: GFP Expression in Narbenfäden von Mais der Linie Q2 124
Abbildung 62: GFP Expression in den Epidermiszellen der Zwiebel..... 125
Abbildung 63: GFP Expression in den Epidermiszellen der Zwiebel..... 127
Abbildung 64: *C2*-GFP Expression in den Epidermiszellen der Zwiebel..... 127
Abbildung 65:*R*-GFP Expression in den Epidermiszellen der Zwiebel..... 128
Abbildung 66: *InD1*-GFP und *InFus*-GFP Expression in den Epidermiszellen der Zwiebel 129
Abbildung 67: Herstellung der *In*-am-GFP und *InD*-carb-GFP Expressionsplasmide..... 133
Abbildung 68: Herstellung des *InD*-am-GFP Expressionsplasmids 135
Abbildung 69: Schematische Darstellung der deletierten *Intensifier* GFP-Fusionsproteine . 136
Abbildung 70: *InD*-carb-GFP Expression in den Epidermiszellen der Zwiebel..... 137
Abbildung 71: *In*-am-GFP und *InD*-am-GFP Expression in den Epidermiszellen der Zwiebel 138
Abbildung 72: Auf *in vivo* Interaktion getestete myc- und myb-homologe Proteine 144
Abbildung 73: Vergleich der verschiedenen BD-*R* Fusionsproteine für die Untersuchungen mit dem Two Hybrid System 145
Abbildung 74: Mögliche Interaktionsstärke einiger Fusionsproteine 147
Abbildung 75: Schematische Darstellung der verschiedenen Fusionsproteine..... 152

Abbildung 76: vereinfachtes Modell zum Einfluss des *Intensifier* Genproduktes auf die Anthocyanbiosynthese 156
Abbildung 77: Aminosäuresequenzvergleich der Proteine *C1* und *C1-I* 171
Abbildung 78: Aminosäuresequenzvergleich der Proteine *In*, *InD1*, *InFus* und *InXS* 172

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Klonierungs- und Expressionsvektoren 22
Tabelle 2: Verwendete cDNAs und Fragmente 22
Tabelle 3: Verwendete Mikoorganismen 23
Tabelle 4: Übersicht der zu testenden Expressionsplasmide und ihrer Fusionsproteine 55
Tabelle 5: Durchgeführte Kombinationen für den Test auf *in vivo* Interaktion 72
Tabelle 6: Interaktion des BD-*C1* Fusionsproteins mit verschiedenen AD-Fusionsproteinen 77
Tabelle 7: Interaktion des BD-*C1-I* Fusionsproteins mit verschiedenen AD-Fusionsproteinen 81
Tabelle 8: Interaktion des BD-*InXS* Fusionsprotein mit verschiedenen AD-Fusionsproteinen 84
Tabelle 9: Interaktion des BD-*InFus* Fusionsproteins mit verschiedenen AD-Fusionsproteinen 89
Tabelle 10: Interaktion des BD-*InD1* Fusionsproteins mit verschiedenen AD-Fusionsproteinen 93
Tabelle 11 : Test auf *in vivo* Interaktion der Fusionsproteine BD-*R* und BD-*Rdel* mit verschiedenen AD-Fusionsproteinen 95
Tabelle 12: Beeinflussung der β-Galaktosidaseaktivität in Transformanten mit BD-*R* oder BD-*Rdel* Fusionsproteinen und verschiedenen AD-Fusionsproteinen 98
Tabelle 13 : Transformanten mit drei Fusionsproteinen 106
Tabelle 14 : Tabellarische Darstellung der Ergebnisse der *in vivo* Interaktion der BD-Fusionsproteine mit den AD-Fusionsproteinen 111
Tabelle 15: Hergestellte GFP Expressionplasmide 115
Tabelle 16: *lacZ*-Reportergenaktivierung der Transformanten mit drei Proteinen 169
Tabelle 17: verwendete Primer 170

Danksagung

Hiermit möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Udo Wienand bedanken, daß er mir die Gelegenheit gab das „*In*“teressante Thema „*In*“tensiv zu bearbeiten, für die „*In*“haltliche Beratung und das Korrekturlesen.
Bedanken möchte ich mich auch bei Prof. Dr. Schäfer, der trotz vollem Terminkalender als Zweitgutachter zur Verfügung stand.

Mein besonderer Dank gilt Dr. René Lorbiecke für sein unermüdliches Korrekturlesen, selbst zur Weihnachtzeit und für seine konstruktive Kritik beim Erstellen der schriftlichen Arbeit.

Ebenfalls möchte ich mich besonders bei Dr. Brian Scheffler bedanken, der mir die Geheimnisse des molekularbiologischen Arbeitens gezeigt hat, für seine Geduld und seine stete Diskussionsbereitschaft.
Mein Dank für die freundschaftliche Atmosphäre und wertvollen Ratschläge, gilt allen lieben Kollegen der Arbeitsgruppe AMP I, die mir das Arbeiten in dieser Abteilung ungemein erleichtert haben. Hierbei geht mein ganz besonderer Dank an meine direkten Laborkollegen Jelena Kirsch, Dr. Inka Pusch und Sylke Wahlandt, für die Zusammenarbeit und Hilfsbereitschaft immer selbstverständlich waren. Weiterhin möchte ich mich speziell bei Dr. h.c. Back Edelgard Brinkmann und Elke Peleikis für die Kuchen und Keksversorgung bedanken, sowie bei allen Schokoladensüchtigen, die regelmäßig die Notfall-Keksdose aufgefüllt haben.

Sören Witt und Dr. Stefan Scholten danke ich für die Hilfe bei der Fluoreszenzmikroskopie.

Darüber hinaus bedanke ich mich bei meinen Eltern Traute und Peter Techen, die mich während des ganzen Studiums moralisch und finanziell unterstützt haben.
Mein ganz besonders herzlicher Dank gilt Lars Schulze, der mit mir durch dick und dünn durch das Studium und diese Arbeit gegangen ist.

LEBENSLAUF

PERSÖNLICHE DATEN

Name:	Natascha Techen
Geburtsdatum und –ort:	22. Februar 1969, Hamburg
Familienstand:	ledig

SCHULBILDUNG

Aug. 1975 – Jul. 1979	Grundschule Lohkampstraße, Hamburg
Aug. 1979 – Jul. 1987	Gesamtschule Julius Leber, Hamburg
Aug. 1987 – Jun. 1989	Oberstufe an der Gesamtschule Jahnschule, Hamburg Abschluß: **allgemeine Hochschulreife**

STUDIUM

Okt. 1990 – Jul. 1997	Studium der Biologie an der Universität Hamburg Schwerpunkte: Molekularbiologie, Biochemie, Botanik Abschluß: **Diplom** bei Prof. Dr. U. Wienand Thema der Diplomarbeit: Expressionsanalyse des regulativen Gens *Intensifier* aus *Zea mays* L.
Sep. 1997 – Feb. 2002	**Promotion** an der Universität Hamburg bei Prof. Dr. U. Wienand Thema der Dissertation: Molekulare Untersuchungen zur Funktion des regulativen Gens *Intensifier* aus *Zea mays* L.

TÄTIGKEITEN ZUR FINANZIERUNG DES STUDIUMS

Jul. 1989 – Feb. 1991	Teilzeitkraft in der Küche des Altenheims EPIPHANIEN, Hamburg
Mär. 1991 – Apr. 1991	Verkaufstätigkeit im Damenbekleidungsgeschäft ANNE-CHRISTINE, Hamburg
Mai 1991 – Sep. 1995	Teilzeitkraft für Studiotechnik und Bild beim NORDDEUTSCHEN RUNDFUNK, Hamburg
Okt. 1995 – Feb. 1996	Verkaufstätigkeit in dem Spielwarenfachgeschäft FICTION FACTORY, Hamburg
Mär. 1996 – Sep. 1997	Teilzeitkraft als wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Arbeitsgruppe ANGEWANDTE MOLEKULARBIOLOGIE DER PFLANZEN 1 im Institut für Allgemeine Botanik, Universität Hamburg