

**Molekulare Analyse des *Etched1* Gens aus *Zea mays* L.
unter Einbeziehung von Transposon
induzierten Mutanten**

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

vorgelegt von

Martina Waßmann
aus Hamburg

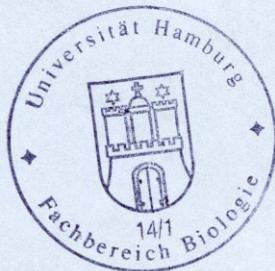
Hamburg 2002

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: 29. November 2002

Hamburg, den 15. November 2002



A handwritten signature in black ink, appearing to read "Frühwald".

Professor Dr. A. Frühwald
Prodekan

Inhaltsverzeichnis	I-VI
Abkürzungsverzeichnis	VII-VIII

1 Einleitung

1.1 Transponierbare Elemente	2
1.2 Struktur und Entwicklung des Maikorns und des Endosperms	4
1.2.1 Befruchtung, Entwicklung und Keimung des Maiskorns	4
1.2.2 Endosperm-Mutanten	8
1.3 Entwicklung/Funktion der Plastiden	8
1.4 Mutationen die Pigmente und den Photosyntheseapparat betreffen	8
1.5 Die <i>etched1</i> Mutationen	10
1.6 Zusammenfassung bisheriger Forschungsergebnisse	13
1.7 Ziel der Arbeit	16

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Enzyme	18
2.1.2 Puffer und Nährmedien	18
2.1.3 Antibiotika	21
2.1.4 Biologisches Material	20
2.1.4.1 Mikroorganismen	20
2.1.4.2 Pflanzenmaterial	21
2.1.4.3 Vektoren	21
2.1.4.4 Oligonukleotide	21
2.1.5 Arbeitsgeräte	23

2.2 Methoden

2.2.1 DNA	25
2.2.1.1 DNA-Präparation (genomisch)	25
2.2.1.2 Plasmid-DNA-Präparation	26
2.2.1.3 NucleoSpin System	26
2.2.1.4 Restriktion von DNA	26
2.2.1.5 Spin column	27
2.2.1.6 Inhibition von Enzymaktivität	27

2.2.1.7 Agarose Gelelektrophorese von DNA	27
2.2.1.8 Southernblot	28
2.2.1.9 Isolierung von Fragmenten aus Agarosegelen	28
2.2.1.10 Extraktion von DNA mit Phenol/Chloroform	29
2.2.1.11 Fällung von DNA	29
2.2.1.12 Mengenbestimmung von Nukleinsäuren	30
2.2.1.13 Klonierung von PCR-Fragmente mittels des TOPO TA Cloning Kits [®]	32
2.2.2 RNA	32
2.2.2.1 <i>RNase</i> -Inaktivierung	32
2.2.2.2 Isolierung von Gesamt-RNA aus pflanzlichen Gewebe	32
2.2.2.3 RNA-Auftrennung in Formaldehyd-Gelen	33
2.2.2.4 Northernblot	33
2.2.3 Proteine	34
2.2.3.1 Proteinisolierung	34
2.2.3.2 Analyse von Proteinen durch Gelelektrophorese und Westernblots	34
2.2.3.2.1 SDS-PAGE	34
2.2.3.2.2 Coomassie-Färbung	35
2.2.3.2.3 Silberfärbung	35
2.2.3.2.4 Westernblots	36
2.2.3.2.5 Immunodetektion	36
2.2.3.2.5 a) Alkalische Phosphatase-Reaktion	37
2.2.3.2.5 b) Peroxidase-Reaktion	37
2.2.3.3 Proteinexpression des ETCHED1 Proteins in Bakterien	37
2.2.4 Bakterien	42
2.2.4.1 Anzucht von Bakterienkulturen	42
2.2.4.2 Anzucht von Bakterienzellen für λ -Phagen	42
2.2.4.3 Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> Zellen	42
2.2.4.4 Transformation kompetenter Zellen mittels Hitzeschock	43
2.2.4.5 Überexpression von Proteinen	43

2.2.5 Herstellung genomischer <i>etl-m15</i> Banken in Lamda-Phagen	44
2.2.5.1 Partieller Verdau/Enzymkinetik	44
2.2.5.2 Partielles Auffüllen der vereinigten Fraktionen	45
2.2.5.3 Ligationsreaktionen	46
2.2.5.4 Verpackungsreaktion	46
2.2.5.5 Titerbestimmung	47
2.2.5.6 Plattierung der genomischen Banken	47
2.2.5.7 Phagenlifts/Behandlung der Nitrocellulosefilter	48
2.2.5.8 Waschen der Phagenfilter	48
2.2.6 Phagen-Lysate zur DNA-Präparation	48
2.2.6.1 Minilyate	48
2.2.6.2 Midilyate mit dem QIAGEN Lambda Midi Kit	49
2.2.6.3 Großlyate	50
2.2.7 Arbeiten mit radioaktiven Nukleotiden	51
2.2.7.1 Herstellen radioaktiv markierter Sonden	51
2.2.7.2 Prähybridisierung und Hybridisierung	52
2.2.7.3 Waschen der Membranen	52
2.2.7.4 Abwaschen einer Sonde	52
2.2.8 Sequenzierung	52
2.2.8.1 Plasmid-DNA Präparation für Sequenzreaktionen	52
2.2.8.2 Sequenzreaktion	53
2.2.9 PAM/Fluoreszenzmessung	54
2.2.10 Biolistische Transformation	55
2.2.10.1 Herstellung/Klonierung von sense und antisense <i>Actin-Etched1</i> -Konstrukten	55
2.2.10.2 Herstellung transgener Pflanzen	56
2.2.11 <i>In situ</i> Hybridisierung von Gewebeschnitten	57
2.2.11.1 Fixierung/Einbettung des Pflanzenmaterials	57
2.2.11.2 Bearbeitung der Schnitte	58
2.2.11.3 Detektion	58
2.2.11.4 RNA Sondenherstellung	58

2.2.12 Isolierung von Plastiden	59
2.2.13 <i>In vitro</i> Transkription/Translation von LC und <i>Zmzr1</i> cDNAs	60
2.2.13.1 PCR zur Herstellung einer am 5' Ende verkürzten <i>Etched1</i> cDNA	60
2.2.13.2 <i>In vitro</i> Transkription	62
2.2.13.3 <i>In vitro</i> Translation	62
2.2.13.4 Einbaukontrolle	63
2.2.14 Fluoreszenzmikroskopische Strukturanalyse von Maiskörnern und transgenem Kallusgewebe	63
2.2.15 PCR mit genomischer DNA, aus <i>etched1</i> Mutantenlinien und Wildtyplinen	64
2.2.16 Protokoll der Herstellung von polyklonalen Kaninchen Antikörpern gegen das Etched1 Protein	66

3 Ergebnisse

3.1 <i>etched1</i> Mutantenanalysen	
3.1.1 Analyse von <i>et1-m15</i> Klonen	67
3.1.2 Analyse von PCR Produkten aus <i>et1</i> Mutantenlinien	71
3.1.3 Vergleichende Sequenzanalysen aller bisher analysierten <i>et1</i> -Mutantenlinien	76
3.1.4 Southernanalysen verschiedener <i>et1</i> -Mutanten Linien	78
3.2 Lokalisation des <i>etched1</i> Genprodukts	
3.2.1 <i>In situ</i> Experimente mit Maiskornschnitten und <i>Et1</i> -RNA-Sonden	81
3.2.2 Überexpression eines Etched1-Fusionsprotein	86
3.2.3 Proteingele, Westernblots und Immunodetektion von verschiedenen Pflanzengeweben mit Anti-Etched1-Kaninchen Antikörpern	89
3.3 Funktionsanalysen zum <i>Etched1</i>	
3.3.1 <i>In vitro</i> Transkription von cDNA der Linien LC, <i>Zmzr1</i> und einem 5'verkürztem LC cDNA-Fragment	93
3.3.2 <i>In vitro</i> Translation der drei Transkripte	96
3.3.3 Transgene sense und antisense Pflanzen	98
3.3.1 Analyse transgener pAct <i>Et1</i> -Sense Pflanzen	99
3.3.2 Analyse transgener pAct <i>Et1</i> -Antisense Pflanzen	103

3.4 Physiologische Analysen zum <i>etched1</i> Phänotyp	
3.4.1 Messungen der Chlorophyllfluoreszenz	107
4 Diskussion	
4.1 Handelt es sich bei dem klonierten Gen tatsächlich um das von der <i>etched1</i> Mutation betroffene Gen?	110
4.1.1 Analyse der Genstruktur der Mutantenlinien	110
4.1.2 Die Klonierung des <i>Etched1</i> Gens wird auch durch den Phänotyp der Maiskörner und Sämlinge transgener Pflanzen bestätigt	113
4.2 In welchen Geweben des Maiskorns erfolgt die Expression der <i>Etched1</i> RNA?	115
4.3 Wo erfolgt die Expression des ET1-Proteins in Sämlingen/Chloroplasten?	117
4.4 Warum war die Überexpression des ET1-Proteins in Bakterien schwierig?	120
4.5. <i>In vitro</i> Transkriptionen/Translationen der <i>Etched1</i> cDNA aus LC und der <i>Zmzr1</i> cDNA aus <i>et1-ref</i>	121
4.6 Unterscheidet sich die Effizienz des Photosystems II in <i>et1-ref</i> -, Wildtyp- und transgenen pAct <i>Etched1</i> -Sense Pflanzen?	122
4.7 Ausblick	124
5 Zusammenfassung	125
6 Literaturverzeichnis	127
Anhang	134

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Ac	Acetat
Amp	Ampicillin
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin-5' Triphosphat
ca.	circa
c9.1	cDNA des <i>Etched1</i> Gens der Linie LC
cDNA	complementary DNA
DAP	Tage nach der Bestäubung
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIG	Digoxigenin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleicacid (Desoxyribonukleinsäure)
dNTPs	Desoxynukleotide
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid
Kan	Kanamycin
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
mRNA	messenger RNA
OD	Optische Dichte
ORF	Open Reading Frame/ offener Leserahmen
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerase Kettenreaktion)
RNA	Ribonucleic Acid (Ribonukleinsäure)
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
Vol	Volumen
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-2-indoyl- β -D-Galaktopyranosid
z. B.	zum Beispiel

Inhaltsverzeichnis

Einheiten

µg	Mikrogramm	mm	Millimeter
µl	Mikroliter	mM	Millimolar
µm	Mikrometer	mol	Mol
AS	Aminosäure(n)	µg	Mikrogramm
bp	Basenpaare	nm	Nanometer
cm	Zentimeter	OD	Optische Dichte
g	Gramm	%	Prozent
kb	Kilobasen	psi	pounds per square inch
kDa	Kilo Dalton	sec	Sekunde(n)
l	Liter	rpm	Umdrehung pro Minute
M	molar	µm	Mikrometer
mg	Milligramm	V	Volt
min	Minute(n)	v/v	Volumen pro Volumen
ml	Milliliter	wv	Gewicht pro Volumen

Aminosäuren

A	Ala	Alanin	M	Met	Methionin
C	Cys	Cystein	N	Asn	Asparagin
D	Asp	Asparaginsäure	P	Pro	Prolin
E	Glu	Glutaminsäure	Q	Gln	Glutamin
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

Schon bei den Maja hatte die Maispflanze eine große Bedeutung für die Kultur und die Gesellschaft.

„Als die Götter merkten, daß ihre Welt öde war und leer, beschlossen sie ein Wesen zu schaffen, daß sie verehren und anbeten sollte. Als Material für diesen Schöpfungsakt kam nur eines in Frage: Nur gelbe Maiskolben wurden ihr Fleisch, nur sie der Nährstoff von Beinen und Armen des Menschen.“

Das ist die Beschreibung der Erschaffung der ersten Menschen im Schöpfungsmythos „Popol Vuh“ der Quiché-Maja (s. GEO 5/96,128).

Mais gehört zusammen mit Weizen und Reis zu den drei weltwirtschaftlich bedeutendsten Kulturpflanzen. Mais hat, mit durchschnittlich fünf Prozent des Ernteertrags weltweit, bezogen auf alle pflanzlichen und tierischen Produkte, einen sehr hohen Anteil an der Weltproduktion von Nahrungs- und Futtermitteln (Land und Forst 9/1999). Mais ist in vielen Ländern das Grundnahrungsmittel oder dient der Fütterung von Nutztieren.

Auch in der Forschung hat der Mais (*Zea mays* L.) einen hohen Stellenwert. Er ist ein in der Genetik besonders intensiv bearbeitetes Studienobjekt. Der Mais ist genetisch gut zu analysieren, weil Maiskolben bis zu 300 Körner tragen, die genetisch eigenständigen Nachkommen entsprechen. Gerade bei phänotypisch leicht zu identifizierenden Eigenschaften wie Farbe, Oberflächenstruktur, Form etc. sind Mutationen in den Körnern sofort nach der Reifung des Kolbens zu erkennen. Man muß somit nicht die Entwicklung der gesamten Pflanze abwarten, bis einige grundlegende Veränderungen entdeckt werden können. Bei Mais besonders gut untersucht sind u.a. Mutationen, die durch die Insertion von transponierbaren Elementen ausgelöst werden.

Diese Arbeit dient u. a. der näheren molekularen und physiologischen Charakterisierung von *etched1*-Mutanten. Die *etched1*-Mutation ist eine rezessive pleiotrope Mutation, die die Amyloplastenentwicklung der Körner und die Plastidenentwicklung der Sämlinge beeinflusst. Weitere *etched1*-Mutantenlinien, die durch die Insertion transponierbarer Elemente entstanden sind, sollten dabei analysiert werden. Nachfolgend erfolgt hier deshalb eine kurze Beschreibung transponierbarer Elemente, der Korn- und Endospermentwicklung, der Plastidenentwicklung und einiger Mutationen bei Maiskörnern und Sämlingen.

1.1 Transponierbare Elemente

Transponierbare Elemente (Transposons) werden als mobile genetische Elemente definiert, die in alle Bereiche der DNA „springen“ können (Transposition). Barbara McClintock hat zusammen mit anderen Forschern diese mobilen genetischen Elemente bei Mais seit 1950 näher charakterisiert. Unter den Transponierbaren Elementen gibt es autonome und nicht autonome Elemente (McClintock, 1950/1951). Die autonomen transponierbaren Elemente können die Transposition selbst bewirken, während nicht-autonome Elemente der Transposase eines autonomen Elementes bedürfen (Trans-Aktivierung), um mobilisiert zu werden. Transposons können an nahezu jeder Stelle eines Chromosoms inserieren. Transponierbare Elemente besitzen an ihren Enden entgegengesetzte identische Sequenzen (terminal inverted repeats/TIR) unterschiedlicher Länge (mind. ca. 20 bp). Bei der Insertion eines Transposons verdoppelt sich die Zielsequenz an der Integrationsstelle (target site duplikation). Eine bis zu zwölf Basenpaare lange Sequenz, die vorher nur einmal vorhanden war, ist danach doppelt vorhanden, auf jeder Seite der Insertionssequenz einmal. Diese verdoppelte Sequenz der Rezeptorstelle ist eine direkte Wiederholung. Im Fall des Herausspringens eines Transposons aus einer solchen Sequenz bleibt es häufig bei einer Verdoppelung dieser Sequenz, es können aber zusätzlich auch noch Sequenz-Veränderungen innerhalb dieses Bereiches auftreten. Punktmutationen, zusätzliche Nukleotide, oder Deletionen einzelner oder mehrerer Nukleotide können dabei entweder zum Austausch einer Aminosäure in der Proteinsequenz, oder zu einer Verschiebung des offenen Leserahmens führen.

Die Transponierbaren Elemente bei Mais werden in verschiedene Familien eingeteilt. Es gibt z.B. die Gruppe der Aktivator Elemente mit den Elementen *Ac* und *Ds*, die Mutator-Elemente und die Suppressor-Mutator bzw. Enhancer Familie. Die Familie der Mutator (Mu) Elemente wurde 1978 von Robertson entdeckt (Robertson *et al.*, 1985). Es gibt eine große Anzahl von Mutator-Elementen, die sich aufgrund der hohen Transpositionsfrequenzen sehr gut zum Transposon-Tagging (Wienand *et al.*, 1982) und damit auch zur Klonierung und zur molekularen Charakterisierung von Zielgenen, eignen. Die einzelnen Mutatorelemente unterscheiden sich untereinander stärker als z. B. *Ac/Ds* Elemente. Gemeinsamkeiten aller Mu Elemente sind die etwa 200 Basenpaare langen terminal inverted repeats (TIR). Die internen Sequenzen der Mu Elemente, zwischen den inverted repeats, können sehr unterschiedlich aussehen. Das Mu1 Element ist 1367 bp lang und enthält terminal inverted repeats von 220 Basenpaaren (Barker *et al.*, 1984).

Außerdem enthält es noch interne direkte Wiederholungssequenzen (direct repeats) von 104 bp. Das Mu3 Element ist 1824 Basenpaare lang und hat 200 bp lange TIR, die homolog zu denen des Mu1 Elementes sind (Oishi und Freeling, 1988). Die Sequenz des Mu4 Elementes unterscheidet sich von der Sequenz des Mu3 Elementes durch zusätzliche 294 Basenpaare der inverted repeats, was bedeutet, daß eine 514 bp lange Sequenz der TIR vorhanden ist (Talbert *et al.*, 1989). Das Mu5 Element ist 1320 Basenpaare lang und enthält eine Sequenz von 220 Basenpaaren die wieder homolog zur Sequenz der TIR des Mu1 sind. Außerdem ist die Sequenz der TIR im Mu5 Element insgesamt 358 bp lang, sie ist um 138 bp länger als im Mu1 Element (Talbert *et al.*, 1989). Die verlängerten Sequenzen der TIR im Mu4 und Mu5-Element zeigen keine Sequenzhomologie zu einander. Das Mutatorelement 8 (Mu8) wurde 1990 isoliert (Fleenor *et al.*, 1990) und ist 1410 Basenpaare lang. Die 185 Basenpaar lange Sequenz der inverted repeats ist ebenfalls homolog zur Sequenz der Mu1 TIR. Das autonome Element MuDR ist 5 Kilobasen lang. Es wurde gezeigt, daß das MuDR Element der genetische Regulator der Mutator Elemente ist (Chomet *et al.*, 1991). Das MuDR Element enthält Sequenzen, die für zwei konvergente Transkripte kodieren (Hershberger *et al.*, 1991). Die Sequenzen, die für die beiden Transkripte kodieren überlappen nicht, wobei nur 200 Basenpaare der zwischen den TIR liegenden internen MuDR Sequenz nicht transkribiert werden. Die Sequenzen der beiden Transkripte zeigen eine ungewöhnliche Anordnung der Exons und Introns, zeigen differenzielles Splicing und multiple Polyadenylierungs-Stellen. Eines der beiden Proteine (MURA) des MuDR besitzt Homologie zu einem Motiv der Transposasen bakterieller Insertionssequenzen (Hershberger *et al.*, 1995). Die Anwesenheit der beiden MuDR Proteine allein bewirkt aber nicht unbedingt eine Mutatoraktivität. Die meisten Mutatorlinien besitzen mehrere Kopien des MuDR und sind, bezogen auf ihre Aktivität, sehr instabil. Der Verlust der Aktivität beruht auf Methylierungen bei autonomen und nichtautonomen Elementen (Fedoroff und Chandler, 1994). So kann aus einer voll aktiven Mutatorlinie innerhalb einer Generation eine inaktive Linie werden (Chandler und Walbot, 1986). Üblicherweise nimmt die Aktivität einer Mutatorlinie aber eher graduell, über mehrere Generationen, ab (Walbot, 1986).

Durch das Transposon Tagging mit Mutatorelementen konnten im Maisgenom erfolgreich Gene detektiert und kloniert werden. Dazu werden gepoolte, das Mutatorelement enthaltende, Sämlinge einer PCR mit Primern des Mutorelementes und Primern des gesuchten Gens unterzogen. Dadurch können Amplifikate von Fragmenten der gesuchten Gene isoliert und kloniert werden.

Die Methode des Transposon Tagging wurde auch für das in dieser Arbeit näher charakterisierte Gen *Etched1* angewandt und ermöglichte die Isolierung und Klonierung eines Gens, das vermutlich an der phänotypischen Ausprägung der Mutation beteiligt ist.

1.2 Struktur und Entwicklung des Maiskorns und des Endosperms

Die *etched1* Mutation wirkt sich auf die Entwicklung der Amyloplasten des Endospermgewebes der Körner aus. Das Endosperm stellt das Nährgewebe für den Maisembryo dar. Aufgrund des Befruchtungsmechanismus bei Angiospermen ist es triploid.

1.2.1 Befruchtung, Entwicklung und Keimung des Maiskorns

Beim Mais liegen die männlichen Gametophyten als Pollen in den Staubblättern vor, die sich als Quasten am oberen Teil der Pflanze befinden. Der weibliche Gametophyt entwickelt sich aus den Makrosporen in den Fruchtknoten, die sich zu den Ähren der Pflanze entwickeln. In den Staubblättern teilen sich einzelne diploide Mikrosporenmutterzellen meiotisch unter Bildung von vier haploiden Mikrosporen. Jede dieser Mikrosporen kapselt sich zu einem Pollenkorn ab. Der haploide Pollenkern teilt sich dann noch einmal mitotisch und bildet einen vegetativen und einen generativen Kern. Der generative Kern teilt sich dann noch ein weiteres mal und wird zum männlichen Gametophyten.

In den Griffeln findet die Entwicklung der Makrosporenmutterzellen zu haploiden Makrosporen statt. Nur einer der vier Makrosporenkerne wird zum funktionsfähigen Bestandteil des weiblichen Gametophyten/Embryosacks. Der Kern dieser Zelle teilt sich mitotisch in zwei Tochterkerne, die sich noch zweimal teilen. Dadurch entstehen insgesamt acht haploide Kerne, vier an jedem Ende des Embryosacks. Durch die Vereinigung je eines Kerns aus jeder Vierergruppe in der Mitte der Zelle entsteht der diploide Endospermkern.

Die drei der am weitesten von der Mikropyle des Pollenschlauchs entfernt liegenden Kerne werden als Antipoden bezeichnet. Die andere Gruppe besteht aus dem weiblichen Gametenkern und zwei Synergiden. Bei der Befruchtung gelangt das Pollenkorn auf die Narbe des Griffels und keimt dann zu einem langen Pollenschlauch aus, in welchem die beiden männlichen Gametenkerne zum Embryosack wandern. Unter Bildung der diploiden Zygote befruchtet ein männlicher Gametenkern den weiblichen Gametenkern, während der andere sich mit dem diploiden Endospermkern zu einem triploiden Kern vereinigt. Nach dieser doppelten Befruchtung entwickeln sich zwei Gewebetypen: der diploide Embryo und das triploide Endosperm (Strickberger, Genetik, 1988, s. Abbildung 1).

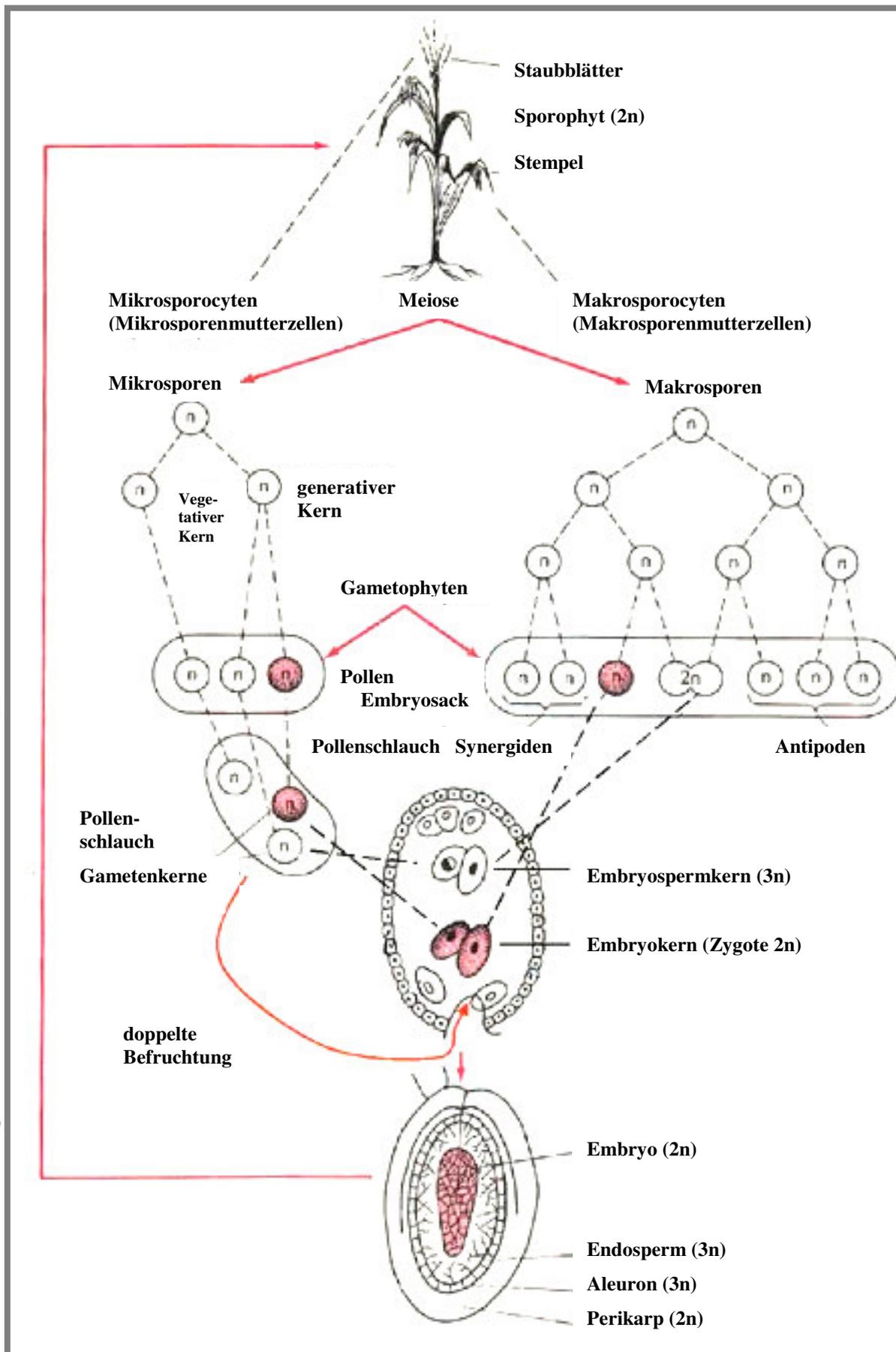


Abbildung 1 Entwicklungszyklus beim Mais (nach Strickberger, Genetik, 1988)

Bei den Angiospermen entsteht aus dem triploiden Endospermkern das Nährgewebe (sekundäres Endosperm). Die Polyploidie der Endospermzellen bedeutet eine physiologische Leistungssteigerung.

Die Entwicklung des Endosperms geht meist der Entwicklung des Embryos voraus. Beim Mais beginnt die Entwicklung des Endosperms mit einer raschen Folge von Kernteilungen des Endospermkerns, wobei zunächst die Wandbildung unterbleibt und ein großes zelluläres Syncytium entsteht. Nach diesem Stadium erfolgt eine Mitose der einzelnen Zellkerne ohne anschließende Cytokinese. Dann werden in der Peripherie des zukünftigen Endosperms antiklinal Zellwände ausgebildet. Danach folgt die perikline Zellwandbildung zwischen den beiden Tochter-Zellkernen und damit die Abtrennung des Endospermgewebes vom zukünftigen Aleuron. Mittels Mitose werden dann Endospermzellen in Richtung des Endospermzentrums aufgefüllt (Olsen *et al.*, 1995). Das „Auffüllen“ des Endosperms ist beim Mais etwa 3-5 Tage nach der Befruchtung beendet.

Im Maiskorn liegt der diploide Embryo umgeben vom triploiden Endosperm vor. Das stärkehaltige Endosperm ist von einer ebenfalls triploiden, einzelligen Schicht, dem Aleuron umgeben. Ganz außen schließt das diploide maternale Perikarp das Korn ab.

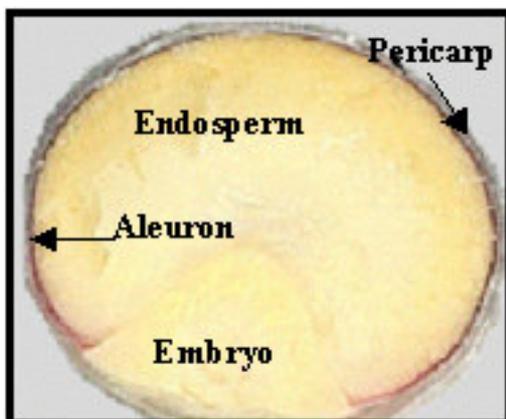


Abbildung 2 Querschnitt durch ein Maiskorn, Embryo, Aleuron, Endosperm und Perikarp (Abb. entnommen aus Garg, 2002)

Zur Keimung des Maiskorns sind mehrere Schritte nötig. Der erste Schritt der Samenkeimung ist die Quellung (Mayer und Poljakoff-Mayber, 1982). Dies ist ein rein physikalischer Vorgang, bei dem der meist trockene Samen zur Quellung hydratisiert wird. Diese Samenquellung ist vom Grad der Dehydrierung des Samens, der Wasserdurchlässigkeit der Samenhülle und der Verfügbarkeit des Wassers abhängig. Der nächste Schritt zur Keimung beginnt mit einer auf mehreren Ebenen verstärkten Stoffwechselaktivität (Hemleben, 1990), welche die Aktivierung inaktiver Enzymvorstufen, die Prozessierung und Translation inaktiver mRNA-Vorstufen und die Transkriptionsregulation (z.B. die Aktivierung der Amylase- oder Lipidsynthese) beinhaltet. Ein weiterer Vorgang bei der Keimung eines Maiskorns ist die Mobilisierung von Speicherstärke, die sich in den Amyloplasten des Endosperms befindet und zu Zucker abgebaut wird. Die abbauenden Enzyme α - und β -Amylase, sowie L-Glucanphosphorylase werden im Aleuron gebildet. Für eine ausreichende Synthese von α -Amylase wird das Phytohormon Gibberellin benötigt, das im Embryo, im Aleuron und der Embryoachse synthetisiert und dann ans Endospermgewebe abgegeben wird (Stoffwechselphysiologie der Pflanzen, 1998). Insgesamt spielen Phytohormone wie Gibberelline, Cytokinine und Auxin bei der Transkriptionsaktivierung eine zentrale Rolle. Diese Phytohormone werden zwischen den verschiedenen Geweben Endosperm/Aleuron und Embryo/Scutellum ausgetauscht. Im Scutellum synthetisierte Gibberellinsäure bewirkt die Mobilisierung von Reservestoffen im Endosperm und Aleuron durch Effekte wie Auxinproduktion, Lipaseexpression und Amylaseexpression. Die mit dem Abschluß der Samenentwicklung eingestellte Entwicklung des Embryos wird ebenfalls mittels Gibberellinsäure vorangetrieben. Gibberellinsäure bricht die Samenruhe und fördert mit anderen Hormonen zusammen die Sproßentwicklung und die Entwicklung der Primärwurzel. Als Gegenspieler der Gibberellinsäure fungiert die Abscisinsäure. Diese reichert sich im entstehenden Embryo an und kontrolliert die Reifung und Bildung von Reserve- und Speicherstoffen. Dabei wird die Expression „keimungsspezifischer“ Gene bis zur Keimung unterdrückt (Stoffwechselphysiologie der Pflanzen, 1998).

1.2.2 Endosperm Mutationen

Die Mutation zahlreicher Gene bewirkt drastische Veränderungen der Endosperm-Komponenten. Das Maiskorn erscheint dadurch z.B. verformt bzw. kollabiert. Andere Genmutationen beeinflussen das Erscheinungsbild des Korns nicht so extrem. Ihre Wirkung zeigt sich in veränderter Härte, Transparenz und in der Zusammensetzung bestimmter Protein- oder Stärkebestandteile. Außerdem können Mutationen Konzentrationsunterschiede verschiedener Farbstoffe wie Carotinoide und Anthocyane hervorrufen und dadurch zu Farbveränderungen der Aleuronschicht führen. Zu den verschiedenen morphologischen Gruppen der Endosperm-Mutanten zählen z.B. die Mutationen *brittle*, *shrunk*, *sugary* oder *glossy*, *waxy*, *defective*, *opaque* oder *floury*, *etched1* oder *pitted* (Überblickartikel: Coe *et al.*, 1988). Analysen dieser Mutanten sind für das Verständnis der Entwicklung des Endosperms und damit der ganzen Maispflanze außerordentlich wichtig und hilfreich.

Die *etched1* Mutation ist ein besonders interessantes Studienobjekt, da sie pleiotrop ist. Es tritt hierbei sowohl eine Veränderung der Struktur des Endosperms als auch zusätzlich bei jungen Pflanzen ein Defekt in der Chloroplastenentwicklung auf.

1.3 Entwicklung/Funktion der Plastiden

Die *Etched1*-Mutation nimmt nicht nur auf das Korn, sondern auch auf die Plastidenentwicklung in jungen Sämlingen Einfluß. Plastiden sind semi-autonome Organellen in nahezu allen Zellen von Pflanzen und Algen. Alle Plastidentypen entwickeln sich aus Proplastiden. Diese sind relativ kleine Organellen, die in den undifferenzierten Zellen z.B. der Pflanzenmeristeme vorhanden sind. Wachstum einer Pflanze im Dunkeln bewirkt die Vergrößerung der Plastiden und es entwickeln sich Etioplasten. Etioplasten enthalten semikristalline Membranstapel, die als Prolamellarkörper bezeichnet werden und statt des Chlorophylls den gelben Chlorophyll-Vorläufer Protochlorophyllid enthalten. Setzt man etiolierte Pflanzen dem Licht aus, entwickeln sich Etioplasten rasch zu Chloroplasten (Photokonversion), wobei Protochlorophyllid in Chlorophyll a umgewandelt wird und der Chloroplast neue Membranen, Pigmente, Photosynthese-Enzyme und Bestandteile der Elektronen-Transportkette synthetisiert.

Leukoplasten sind Plastiden, die in vielen epidermalen und inneren Geweben vorkommen, die nicht grün oder photosynthetisch inaktiv sind. Sie sind teilweise nur vergrößerte Proplastiden. Eine häufige Form der Leukoplasten sind die Amyloplasten der Speichergewebe (z. B. in Wurzeln, Früchten und Samen), die große Stärkemengen enthalten. In den meisten Fällen liegt die Stärke als Amylose (200-1000 Einheiten 1→4 glycosidisch verknüpfte alpha-D-Glucose-Ketten) oder Amylopektin (2000-22000 Einheiten 1→4 glycosidisch verknüpfte und 1→6 verzweigte alpha-D-Glucose-Ketten) vor.

Eine weitere Differenzierungsform der Plastiden sind Chromoplasten. Chromoplasten kommen in Früchten und Blüten vor und entstehen in grünen Geweben. Sie produzieren und speichern Pigmente, wie z.B. unterschiedliche Carotinoide, in kristallinen, tubulösen, membranösen und globulösen Membran-Strukturen.

Die Plastiden sind nicht nur die Orte der Photosynthese und dienen der Ablagerung von Speichersubstanzen. Pflanzen nutzen Plastiden außerdem innerhalb der zellulären Kompartimentierung für Reaktionen des Intermediärstoffwechsels: Die Plastiden produzieren neben Energie und Reduktionskraft (ATP/NADH), Purine und Pyrimidine, Aminosäuren und Fettsäuren bzw. deren Vorstufen. Bei Tieren werden viele dieser Verbindungen im Cytosol hergestellt (Alberts, Molekularbiologie der Zelle, 1995).

1.4 Mutationen, die Pigmente und den Photosyntheseapparat betreffen

Es sind beim Mais etwa 200 Genloci bekannt, die die Pigmententwicklung oder mit der Photosynthese verbundene Prozesse beeinflussen (Übersichtsartikel, Coe *et al.*, 1988). Durch Mutationen innerhalb dieser Gene können Albinos, sowie blaßgrüne oder verzögert ergrünende Sämlinge entstehen. Viele dieser Mutationen beruhen auf Effekten, die die Carotinoide betreffen. Carotinoide stabilisieren u.a. auch die Chloroplastenmembranen. Deshalb können Mutationen, die sich auf die Carotinoide des Korns auswirken z.B. auch Effekte in der Chlorophyll-Entwicklung haben, weil der Verlust von Carotinoiden einen Verlust von Redoxpuffern bedeutet. Die fehlenden Carotinoide können das Chlorophyll nicht mehr vor Oxidation durch freie Radikale schützen.

Einige Mutationen, die die Pigmentsynthese und den Photosyntheseapparat im Mais betreffen, heißen *virescent*, *albascent*, *striped*, *cross banded*, *piebald*, *speckled*, *finally streaked* und *necrotic*. Es konnte gezeigt werden, daß die Morphologie der Sämlinge und der adulten Pflanzen bei vielen Mutanten durch eine Veränderung der Temperatur und der Lichtintensität dramatisch beeinflußt werden kann (Überblickartikel Coe *et al.*, 1988) Die Mutationen, bei der junge Sämlinge reduzierte Chlorophyllmengen aufweisen aber ältere Pflanzen dann normale Chlorophyllmengen entwickeln, werden als *virescent* bezeichnet.

1.5 Die *etched1* Mutation

Etched1-reference ist eine rezessive Mutante bei *Zea mays*, die 1940 erstmals von Stadler beschrieben wurde. Es handelt sich bei dem betroffenen Gen vermutlich um ein Gen, das sowohl in der Entwicklung des Maiskorns als auch während der Endospermdifferenzierung eine Rolle spielt. Die Körner zeigen phänotypisch unterschiedlich tiefe und unregelmäßige Risse und Fissuren, die das Endosperm und das Aleuron durchziehen (Abb. 3A). Das *Etched1* Gen scheint pleiotrop auf Endosperm und Sämlingsentwicklung im Bereich der Plastidendifferenzierung einzuwirken. Die Thylakoidstrukturen in jungen Chloroplasten sind kaum vorhanden bzw. deutlich unterentwickelt (Abb. 3 E-G). *Etched1* Pflanzen ergrünen erst 10-15 Tage nach der Keimung vollständig. Das putative *Etched1* Gen wurde auf dem langen Arm des Chromosoms 3 kartiert. Der *etched1* Phänotyp der Maiskörner ist bei den einzelnen Körnern eines Maiskolbens unterschiedlich stark ausgeprägt und zeigt sich gleichbleibend unabhängig vom jeweiligen genetischen Hintergrund (Sangeetha *et al.*, 1988).

Durch Transposon-Mutagenese mit den Transposons der Mutator-Familie sind bislang 16 Transposon-induzierte Mutantenallele isoliert worden (Scanlon *et al.*, 1994, Stinard, Schnable, unveröffentlicht). Diese Allele wurden *et1-m1* bis *et1-m16* bezeichnet.

Die Körner der verschiedenen *etched1*-Mutanten zeigen einen unterschiedlich stark ausgeprägten Phänotyp (Abb. 3A), der im Endosperm möglicherweise auf einen starken Gendosis-Effekt zurückzuführen ist. Abhängig davon, welcher Endosperm-Genotyp bei den Kreuzungen von verschiedenen Mutanten mit *et1-ref* vorliegt (das Endosperm ist triploid!), kann der Phänotyp des Maiskorns unterschiedlich in Bezug auf die Größe und die Form, und ebenso unterschiedlich bezüglich der Größe und Form des Embryos sein. Dadurch ist die Intensität der Ausprägung der *etched1* Strukturen sehr verschieden (Scanlon *et al.*, 1994). Einige Kombinationen homozygot triploider *et1m*-Allele (z.B. *et1-m3*, *et1-m4*) im Endosperm sind letal. Insgesamt gilt: je höher der Anteil des *et1-ref* Allels, desto weniger stark ausgeprägt ist der *etched1* Phänotyp. D.h. der *et1-ref* Genotyp wirkt sich bei den verschiedenen *et1-m*-Variationen mildernd auf den Phänotyp der Maispflanze aus. Ähnliche Beobachtungen wurden auch am Phänotyp des Sämlings gemacht (Scanlon *et al.*, 1994).

Aus *etched1*-Mutanten-Körnern können Pflänzchen entstehen, die fast normal grüne Blätter mit blassen Teilbereichen besitzen, deren Blätter aber nach 10-15 Tagen voll ergrünen, oder Sämlinge, deren Blätter Albinismus zeigen und die nach 10-15 Tagen ebenfalls grün werden (Abb. 3 C). Manche Sämlinge aus Mutantenlinien werden nicht grün. Sie bleiben blaß und sterben ab.

Es gibt auch eine *etched2* (*et2*) Mutation. Diese unterscheidet sich phänotypisch nur wenig von der von *etched1*. Die Körner sind ebenfalls „*etched*“ und zeigen die charakteristischen Endospermveränderungen, junge Pflänzchen sind aber Albinos mit hellgrünen Blattspitzen. Im Unterschied zu *etched1* ist diese Mutation jedoch letal (Stinard *et al.*, 1993).

Die folgende Seite zeigt die *etched1* Mutation bei Maiskörnern und Sämlingen.

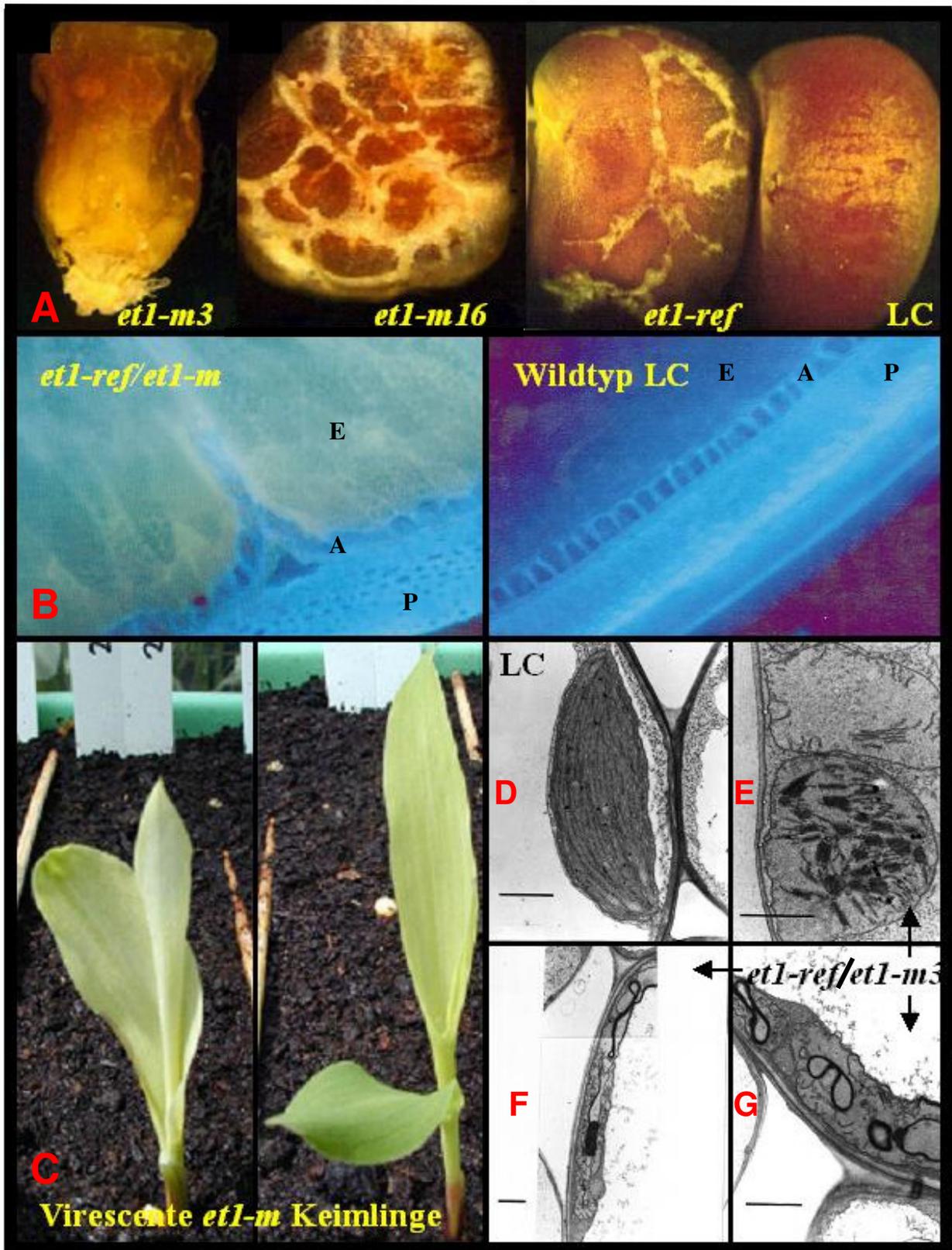


Abbildung 3 A: Körner von *et1*-Mutanten und ein Korn des Wildtyps LC B: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen, Schnitt durch den Randbereich eines *etched1* Korn (links) und eines Wildtypkorns (rechts). A=Aleuron, P=Perikarp, E= stärkehaltiges Endosperm, C: virescente Keimlinge (*et1-m3*) D, E, F, G : ungewöhnliche Chloroplastenstrukturen der *etched1* Keimlinge (Elektronenmikroskop) im Vergleich zum Wildtyp. Der Balken entspricht immer 1 μ m. D: Wildtyp LC E, F, G: Kreuzung aus *et1-ref* und *et1-m3*

1.6 Zusammenfassung bisheriger Forschungsergebnisse

Über die AIMS-Methode (Amplification of Insertion Mutagenized Sites, Frey *et al.*, 1998), eine auf PCR-basierende Methode zur Identifizierung von Mutator Insertionen in genomischer DNA, konnte ein DNA-Fragment (171 bp) aus genomischer DNA der Linie *etl-m3/etl-ref* isoliert werden, das mit der Mutation *etl-m3* cosegregiert (da Costa e Silva, unveröffentlicht). Mit Hilfe dieses Fragmentes wurden zugehörige genomische Lambda Klone aus einer Linie des Genotyps *etl-m3/Wt* (B73) isoliert und sequenziert. Einer der isolierten Klone, *etl-m3λ 5.1*, enthält ein Mu8 Transposon, während drei andere keine Mutatorelemente enthalten und dem *EtI* Wildtypallel entsprechen. Vergleiche dieser *Etched1* Wildtyp Sequenz mit der Wildtyp Sequenz aus der Linie LC ergaben nur sehr geringe Sequenzunterschiede (< 2% innerhalb der Exons /Abb. 4). Der größte Unterschied besteht im Vergleich zwischen diesen Linien darin, daß bei der Linie B73 im Exon1 neun zusätzliche Nukleotide, die für drei zusätzliche Proline im putativen ETCHED1-Protein kodieren, vorhanden sind.

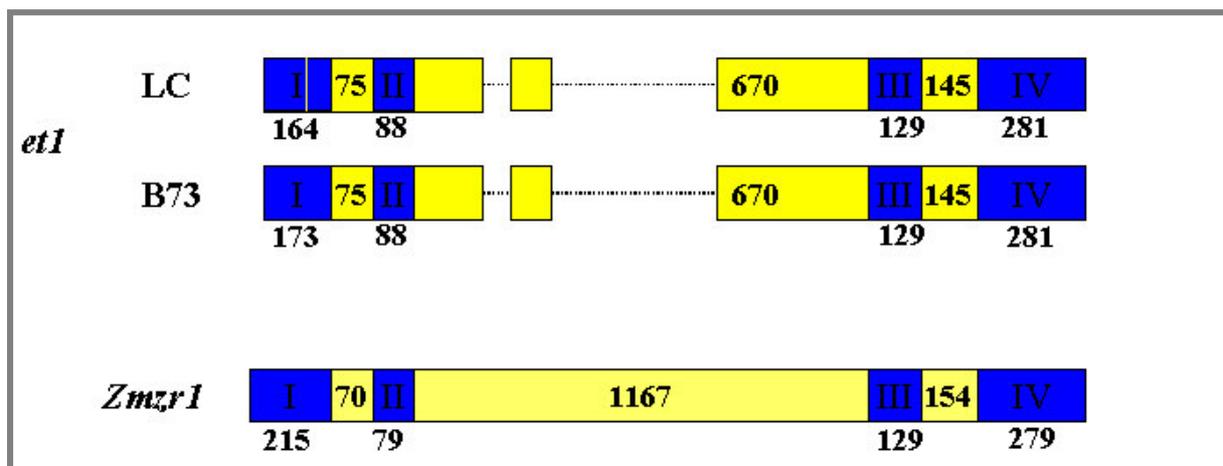


Abbildung 4 Exon-Strukturen des *Etched1* Gens aus den Wildtypenlinien LC und B73 im Vergleich zum *Zmzr1*-Gen aus *etl-ref*. Die Exons sind blau, die Introns gelb dargestellt. Die Nukleotidanzahl der Exons und Intron Bereiche ist unter den Exons bzw. in den Introns angegeben.

Aus der Wildtypsequenz der Linie B73 wurden spezifische Sonden des *EtI*-Allels hergestellt und zur Klonierung des *etl-ref*-Allels verwendet.

Die Sequenzierung der identifizierten Lambda Klone einer genomischen *etl-ref* Bank zeigte umfangreiche Strukturveränderungen im betroffenen Gen. Eine Deletion des kompletten Genbereichs des *Etched1* Gens konnte gezeigt werden (Ahrend, 1998). Sequenzen, die dem transkribierten Bereich des *Etched1* Gens entsprechen, sind in *etl-ref*-Klonen nicht mehr vorhanden. Durch Southernblots der *etl-ref* Klone konnte außerdem gezeigt werden, daß größere Bereiche um das ursprüngliche Gen anders orientiert vorliegen als im Wildtyp.

Diese großen Veränderungen des Genlocus stehen im Einklang mit der Erzeugung der *et1-ref* Mutantenlinie, die durch Röntgenbestrahlung von Pollen erfolgte (Stadler, 1940).

Die Kartierung des *etched1* Gens im Maisgenom des Wildtyps erfolgte mit einem Fragment der Linie *et1-m3*. Dabei konnte bestätigt werden, daß dieses Fragment, ebenso wie vorher das *et1-ref* Allel (s. 1.5, Neuffer *et al.*, 1997), auf dem langen Arm des Chromosoms 3 lokalisiert ist. Ebenso konnte mit einer der genomischen Sonden der Linie B73 eine *Et1*-cDNA (c9.1) aus einer cDNA Bibliothek aus sich entwickelnden Körnern der Linie LC isoliert werden (Garg, 2002).

Durch die Analyse weiterer Klone aus dem Screening der *et1-ref* genomischen Bank, die im Gegensatz zu den *et1-ref* Klonen mit der *Etched1* LC cDNA hybridisieren (Ahrend, 1998), konnte gezeigt werden, daß mindestens ein *Etched1*-homologes Gen im Mais vorhanden ist (Garg, 2002). Nach Klonierung dieses zweiten Gens wurde festgestellt, daß die Exon-Längen mit denen des *Et1* Gens nahezu identisch sind. Die Sequenzhomologie zwischen den beiden Genen beträgt 87%. Die Intronsequenzen und die Intronlängen, der 3' untranslatierte und der 5' untranslatierte Bereich sowie der Promotor unterscheiden sich hingegen stark (61% Homologie 5'UTR, 55% Homologie 3'UTR). Die abgeleiteten Proteine sind zu 83% homolog. Werden verwandte Aminosäuren mit eingerechnet, besteht eine Homologie von bis zu 87% zwischen den beiden Sequenzen (Garg, 2002). Beide Genprodukte besitzen eine Domäne, die eine gewisse Ähnlichkeit zu der „zinc-ribbon“-Domäne verschiedener eukaryotischer Proteine hat. Deshalb wurde das aus der *et1-ref* Bank stammende *Etched1* homologe Gen, *Zmzr1* (*Zea mays zinc ribbon1*) benannt.

Durch *in vitro* Transkriptions- und *in vitro* Translationsexperimente mit ³⁵S-markiertem Cystein wurde gezeigt, daß das *Etched1* Protein eine Transitsequenz enthält und diese den Import in das Stroma von Spinatchloroplasten ermöglicht (Garg, 2002). Ferner konnte in diesem Zusammenhang auch gezeigt werden, daß dieser Import über den General Import Pathway der Chloroplasten erfolgt (Michl *et al.*, 1994).

Die Proteine ET1 und auch ZMZR1 besitzen eine „zinc-ribbon“-Domäne (siehe oben). Diese ist unter anderem im eukaryotischen Transkriptionsfaktor TFIIS enthalten, der der RNA-Polymerase II das Hindurchlesen durch Pausen- und Terminationssequenzen, Nukleosomen und sequenzspezifische DNA-Bindeproteine ermöglicht. Die Sequenzen für den Transkriptionsfaktor TFIIS sind in Säuetieren, Drosophila und Hefen hochkonserviert. Die „zinc-ribbon“-Struktur in TFIIS (Abb.5) ist durch drei antiparallele β -Faltblattstrukturen, die aromatische AS (Phenylalanin/Tyrosin) enthalten, und das, über vier Cysteine in einem Chelatkomplex assoziierte, Zinkion gekennzeichnet.

1.7 Ziel der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit war herauszufinden, ob es sich bei dem, von da Costa é Silva klonierten, als „*etched1*“ bezeichneten, Gen tatsächlich um den Auslöser des Phänotyps handelt.

Zur Bearbeitung der zentralen Fragestellung dieser Arbeit sollten weitere *etched1* Mutanten-Allele hinsichtlich vorhandener Gendefekte (Mutator-Insertionen) im als *etched1* bezeichneten Gen analysiert werden, um so eine weitere Bestätigung für den ursächlichen Zusammenhang zwischen Mutation und Gen zu erhalten. Dies sollte einerseits über die Herstellung genomischer Lambda Banken, das Screening dieser Banken und die anschließende Sequenzierung positiver *etched1*-Klone erfolgen. Andererseits sollten über PCR von verschiedenen genomischen DNAs aus Mutanten-Allelen mit Primern des *Etched1* Gens und Primern der inverted repeats der Mutatorelemente, PCR-Fragmente amplifiziert und sequenziert werden.

Ergänzend hierzu sollten auch die Expressionsorte der *Et1* mRNA und des ET1-Proteins in den Geweben der Maiskörner und Sämlinge näher charakterisiert werden. Zur Lokalisation der mRNA sollten *in situ* Experimente mit Maiskörnern durchgeführt werden. Geplant waren unter anderem auch Versuche zu einer Überexpression des ET1-Proteins, um Antikörper zu generieren und mittels Immunodetektion Gewebe verschieden alter Maispflanzen (Wildtyp, *et1-ref*), und deren Chloroplasten zu untersuchen. Zur weiteren Funktionsanalyse sollten außerdem *in vitro* Transkriptions- und *in vitro* Translationsversuche der *Etched1* cDNA beitragen. Das *in vitro* translatierte Protein sollte anschließend als weitere Kontrolle für die Spezifität des Anti-*Etched1*-Kaninchenantikörpern eingesetzt werden.

Um die Auswirkungen der *Etched1* Gen-Dosis in Maiskörnern und Maispflanzen zu überprüfen und auf diese Weise die Funktion des *Etched1* Gens zu untersuchen, sollten transgene Pflanzen, die die *Etched1* cDNA in sense und antisense Orientierung exprimieren, hergestellt werden. Diese transgenen Pflanzen sollten mittels Northern- und Southern-Analysen und hinsichtlich der Ausprägung eines „*etched1*-ähnlichen“ Phänotyps überprüft werden.

Der Einfluß der *etched1* Mutation auf die Effizienz des Photosystems II sollte durch die Messung der Chlorophyllfluoreszenz untersucht werden, um so ebenfalls Hinweise auf eine mögliche Funktion des *Etched1*-Genproduktes zu erhalten.

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Enzyme

Die Chemikalien und Enzyme (Reinheitsgrad p.a.) von folgenden Firmen wurden verwendet: Gibco-BRL (Eggenstein), Sigma-Aldrich (Deisenhofen), Serva (Heidelberg), Difco (USA), Merck (Darmstadt), Boehringer (Mannheim), MBI Fermentas (St. Leon-Rot), Biozym (Oldendorf), Amersham Pharmacia Biotech.

Lösungen, Standardpuffer und -medien, wie LB-Medium, SSC-, TAE-, TBE- und TE-Puffer, wurden nach Sambrock *et al.* (1989) mit deionisiertem Wasser aus der Ionenaustauscheranlage Milli-Q_{PLUS} der Firma Millipore (Eschborn) angesetzt. Zur Sterilisation wurde entweder 20 min bei 121°C (1,2 bar) im Varioklav Typ 500 der Firma H+P Labortechnik (München) oder im Sanoklav der Firma Wolf (Geislingen) autoklaviert. Ansonsten wurde mittels 0,2 Mikrometer-Syringe oder Bottle Top Filtern der Firma Nalgene (Rochester, USA) sterilfiltriert.

Die verwendeten radioaktiven Nukleotide alpha³²P-dCTP (3000 Ci/mMol), sowie die Nitrocellulosemembranen, wurden von der Firma Amersham Buchler bezogen. ³⁵S-Methionin bzw. Cystein für die *in vitro* Translationsexperimente wurden von den Firmen Amersham bzw. NEN, gekauft.

2.1.2 Puffer und Nährmedien

Falls nicht anders beschrieben, wurden alle Lösungen mit Ionenaustauschwasser hergestellt.

BMM (50 ml)	40 ml Butylmetacrylat; 10 ml Methylmetacrylat; 0,5% (250 mg) Ethylbenzoin; 10 mM (0,08 g) DTT durch vorsichtiges Schütteln lösen, den Eintrag von Sauerstoff vermeiden
Bjierum-Schäfer-Nilson-Puffer	48 mM Tris base; 39 mM Glycin; 20% Methanol; 0,037% SDS
Blockierungspuffer	4% Magermilchpulver in 1x TBST
Coomassie-Färbelösung	0,25 g Coomassie Brilliant Blue R 250; 45 ml Methanol; 45 ml H ₂ O; 10 ml Essigsäure (96%ig)
Denaturierungspuffer	1,5 M NaCl; 0,5 M NaOH

Detektionslösung I	2,5 M Luminol (3-Aminophtalhydrazide); 400 mM p-Coumarsäure; 0,1 M Tris-HCl pH 8,0
Detektionslösung II	5,4 mM H ₂ O ₂ ; 0,1 M Tris-HCl pH 8,5
DNA-Probenpuffer	0,25% Bromphenol Blau; 30 % Glycerol
1 M Dithiothreitol (DTT)	1,55 g DTT in 10 ml 10 mM Natrium Acetat (pH 5,2) lösen und nach Sterilfiltration bei -20 °C lagern
EB-Puffer	100 mM Tris/HCl pH 8; 50 mM EDTA pH 8; 500 mM NaCl ohne 0,1% β-Mercaptoethanol (lt urspr. Protokoll von Dellaporta (1983))
EDTA (0,5 M)	186,1 g EDTA, auffüllen auf 1 Liter mit H ₂ O
Ethidiumbromid	1 g Ethidiumbromid ad 100 ml
Entfärbelösung	10% Methanol; 10% Essigsäure (96%ig)
5x GM-Puffer (11)	8 mM Na-Pyrophosphat (2,13 g) in 40 ml kochendem H ₂ O lösen; 250 mM HEPES (59,58 g); 1,65 M Sorbitol (300,6 g); 10,7 mM MgCl ₂ x 6 H ₂ O (2,17 g); 6 mM MnCl ₂ x 2 H ₂ O (0,97 g); 2 mM DTT (2 ml 1M DTT <u>erst vor Gebrauch zugeben!</u>); pH auf 6,8 mit 6 N NaOH einstellen und ad 1000 ml H ₂ O auffüllen
1x GM-Puffer	60 ml 5x GM; 0,6 ml 1 M DTT; 240 ml H ₂ O
Hybridisierungsmix <i>In situ</i>	50% Formamid; 300 mM NaCl; 10 mM Tris-HCl pH 7,5; 1 mM EDTA; 1% Denhards; 10% Dextransulfat; 10 mM DTT; 250 ng/ml tRNA; 100 µg/ml Poly(A)
<i>In situ</i> Puffer 1	100 mM TRIS; 150 mM NaCl; 1% Boehringer Blocking Reagenz
<i>In situ</i> Puffer 2	0,5% BSA; 0,3% Triton X100; 100 mM Tris-HCl pH 7,5; 150 mM NaCl
<i>In situ</i> Puffer 3	100 mM Tris-HCl pH 9,5; 100 mM NaCl; 50 mM MgCl ₂
<i>In situ</i> Puffer 4	10 mM Tris-HCl; 1mM EDTA auf pH 8,0 einstellen
IPTG (100mM)	238 mg Isopropylthio-β-D-Galactoside in 10 ml H ₂ O lösen und sterilfiltrieren (• -20°C)
10x Laemmli	144 g/l Glycine; 30 g/l Tris-base; 0,1% SDS
LB-Medium (11)	10 g Trypton; 5 g Hefe-Extrakt; 10 g NaCl // LB-Platten: + 15 g Agar/l pH 7,5
Lysozymlösung	10 mg/ml in TELT-Puffer
MOPS (1M)	209,3 g, auffüllen auf 1 Liter

Natriumacetat (3M)	40,8 g NaAc x3 H ₂ O, auffüllen auf 100 ml, pH 5,2 od. 4,6
Neutralisationspuffer	1,5 M NaCl; 0,5 m Tris-HCl, pH 7,2; 1 mM EDTA
NTE-Puffer	10 mM TRIS; 1 mM EDTA; 500 mM NaCl pH 8,0
1% Organosilan	2 ml 3-Aminopropyltriethoxysilan auf 200 ml Aceton
Percoll-Lösung 94%ig	0,5 ml 1 M HEPES KOH ph 8,0; 0,6 g Sorbitol; 80 µl 250 mM EDTA; 10 µl 1M MgCl ₂ ; 9,4 ml PCBF; 1,7 mg Glutathion; 20 µl 1M DTT
Percoll-Lösung 40%ig	0,75 ml 1 M HEPES KOH ph 8,0; 0,9 g Sorbitol; 120 µl 250 mM EDTA; 15 µl 1M MgCl ₂ ; 6,0 ml PCBF; 2,5 mg Glutathion; 30 µl 1M DTT; ad 15 ml H ₂ O
PBS-Stock 10x	80 g NaCl; 2 g KCl; 14,4 g Na ₂ HPO ₄ ; 2,4 g KH ₂ PO ₄ ad 1l H ₂ O, pH 7,4
PCBF	17,5 ml Percoll; 0,525 g Polyethylenglycol (PEG 6000); 0,175 g BSA; 0,175 g Ficoll
PFA 8%ig (100 ml)	8g Paraformaldehyd + 95 ml DEPC-Wasser in 60°C unter Zugabe von NaOH lösen; pH auf 7,4 mit HCl einstellen
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 H ₂ O
Prähybridisierungslösung	1M NaCl, 1% SDS, 10% Dextransulfat + 100 ng/ml Heringssperma DNA (10 min denaturiert)
<i>Proteinase K</i>	10 mg/ml in H ₂ O
QIAGEN Puffer L1	300 mM NaCl; 100 mM TrisHCl, pH 7,5; 10 mM EDTA; 0,2 mg/ml BSA; 20 mg/ml RNase A; 6 mg/ml DNase I
QIAGEN Puffer L2	30% Polyethylenglycol (PEG 6000), 3M NaCl
QIAGEN Puffer L3	100 mM NaCl; 100 mM TrisHCl, pH 7,5; 25 mM EDTA
QIAGEN Puffer L4	4% SDS
QIAGEN Puffer L5	3 M Kaliumacetat, pH 5,5
QIAGEN Puffer QBT	750 mM NaCl; 50 mM MOPS, pH 7,0; 15% Ethanol; 0,15% Triton X-100
QIAGEN Puffer QC	1,0 M NaCl; 50 mM MOPS, pH 7,0; 15% Ethanol
QIAGEN Puffer QF	1,25 M NaCl; 50 mM TrisHCl , pH 8,5; 15% Ethanol
RNase	10 mg/ml in H ₂ O
Sephadex G25	1 g Sephadex G25, 20 ml H ₂ O

SDS-Probenpuffer	0,25% Bromphenol Blau; 3% SDS; β -Mercaptoethanol; 20% Glycerol
SM- Puffer / Top- Agar	11,9 g NaCl; 4 g MgSO ₄ x 7 H ₂ O; 100 ml 1 M Tris pH 7,5; 10 ml 2% Gelatine /Top-Agar: + 7g Agarose
SSC (20x)	17,53% NaCl; 8,82% Natriumcitrat, pH auf 7,0 mit HCl einstellen
TAE (50x)	242 g Tris; 57,1 g Eisessig; 100 μ l 0,5 M EDTA pH 8.0 für 1-fach TAE verdünnen mit H ₂ O
TBST (10x)	12,1 g/l Tris-base; 87,66 g/l NaCl; 5 g/l TWEEN 20, pH 8,0
TE I (100 ml)	1,0 ml 1M TrisHCl pH 8,0 (10 mM); 0,2 ml 0,5M EDTA pH 8,0 (1mM)
TE II (100 ml)	5,0 ml 1M TrisHCl pH 8,0 (50 mM); 2,0 ml 0,5M EDTA pH 8,0
TELT (10 ml)	500 μ l 1M Tris pH 7,5 (50 mM); 1,25 ml 0,5M EDTA (62,6 mM); 5,0 ml 5M LiCl (2,5M); 40 μ l Triton-X-100 (0,4%)
TfBI	RbCl 100 mM; MnCl ₂ 45 mM; KAc 35 mM; CaCl ₂ 10 mM; LiCl 0,5 mM; Glycerin 15%; pH mit Essigsäure auf 5,8 einstellen
TfB II	MOPS 10 mM; RbCl 10 mM; CaCl ₂ 10 mM; Glycerin 15%, mit NaOH auf pH 7,0 einstellen
Waschlösung I	2 x SSC; 1% SDS
Waschlösung II	0,2 x SSC; 0,1% SDS
X-Gal	400 mg X-Gal in 10 ml Dimethylformamid lösen (• -20°C)

Tabelle1

2.1.3 Antibiotika

Die verwendeten Antibiotika waren Kanamycin und Ampicillin, wurden mit einer Konzentration von 40 mg/ml bzw. 50 mg/ml in H₂O angesetzt und in einer 1:1000-Verdünnung im Selektionsmedium verwendet.

2.1.4 Biologisches Material

2.1.4.1 Mikroorganismen

Bakterienstamm	Genotyp	Firma/Referenz
Epicurian Coli® BL21(DE3)	<i>E.coli</i> B F ⁻ <i>dcm ompT hsdS</i> (r _B ⁻ m _B) <i>gallambda</i> (DE3)	Stratagene, Weiner <i>et al.</i> (1987)
ER2566	F ⁺ <i>lambda</i> ⁻ <i>fhuA2 [lon] ompT lacZ::T7 gene1 gal sulA11 delta(mrC-mrr)114::IS10 R(mcr- 73::miniTn10-TetS)2 R(zgb- 210::Tn10)(TetS) endA1[dcm]</i>	New England BioLabs® Inc (cat#801-0)
One Shot® <i>E.coli</i> TOP10	F ⁻ <i>mcrA delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)Ö80lacZ deltaM15 delta lacX74 recA1 deoR araD139 delta(ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str^R) endA1 nupG</i>	Invitrogen
One Shot® <i>E.coli</i> TOP10' (Screening: +IPTG)	F ⁺ { <i>lacI^q Tn10 (Tet^R)</i> } <i>mcrA delta(mrr- hsdRMS-mcrBC) Ö80lacZdeltaM15 Älac X74 recA1 deoR araD139 delta(ara- leu)7697 galU galK rpsL (Str^R) endA1 nupG</i>	Invitrogen
XL1Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac[F'proAB lac^q ZdeltaM15 Tn10 (Tet)]</i>	Stratagene, Bullock <i>et al.</i> (1987)
XL1Blue MRF'	<i>delta(mcrA)183 delta(mcrCB-hsdSMR- mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac[F'proAB lac^q ZdeltaM15 Tn10 (Tet)]</i>	Stratagene, Jerpseth <i>et al.</i> (1987)

Tabelle 2

2.1.4.2 Pflanzenmaterial

Maislinien:

LC, *et1ref* (farbige Körner), a *et1ref* (farblose Körner), W22, Q2, Q66, B72, A188, H99, Pa91, *et1-m1*, *et1-m2*, *et1-m3*, *et1-m4*, *et1-m5*, *et1-m7*, *et1-m8*, *et1-m9*, *et1-m10*, *et1-m11*, *et1-m12*, *et1-m13*, *et1-m14*, GH-Nr. 1738 (aus GH-Nr.1438/1 geselbstet (*et1-m15/et1-ref*)) und GH-Nr.1739 (aus GH-Nr. 1438/2 geselbstet (*et1-m15/et1-ref*))

2.1.4.3 Vektoren

Vektor	Verwendung	Firma/ Referenz
pAct1.cas	Maistransformation	McElroy <i>et. al.</i> , 1990
pBS	Klonierung	Stratagene
pZErO-2.1	Klonierung/ Sequenzierung	Invitrogen
pRSET (B)	Proteinexpression	Stratagene
pTYB2	Proteinexpression/ Inteinexpressionsprotein	New England BioLabs
pTYB12	Proteinexpression/ Inteinexpressionsprotein	New England BioLabs
Lambda FixII	genomische Phagenbanken	Stratagene
PCR [®] 2.1- TOPO [®]	Klonierung von PCR Produkten	Invitrogen

Tabelle 3

Folgende Plasmide wurden freundlicherweise zur Verfügung gestellt:

Vektor	Verwendung	Zur Verfügung gestellt von
pBluescript c9.1	<i>Etched1</i> cDNA; Klonierung / Sonden	Garg, 2002
pAct c9.1 sense	Maistransformation	da Costa é Silva, unveröffentlicht
pBAT c9.1	<i>In vitro</i> Transkription/ Translation	Garg, 2002
pBAT Zmzr1	<i>In vitro</i> Transkription/ Translation	Garg, 2002

Tabelle4

2.1.4.4 Oligonukleotide

Verwendete Primer	Sequenz
Etched1 und andere	
Promoter forward ET1(LC)⇒	TACGGTGGACAGCCCAGTTACTAA
Promoter reverse ET1(LC) ⇐	TTAGTAACTGGGCTGTCCACCGTA
Exon2 forward ET1(LC) ⇒	TGAGAGTTTCGAACCGTCCAAGGA
Exon2 reverse ET1(LC) ⇐	TCCTTGGACGGTTCGAAACTCTCA
Exon3 forward ET1(LC) ⇒	CAGAGTAGCCTATGAAAGAGGCAC
Exon3 reverse ET1(LC) ⇐	GTGCCTCTTTCATAGGCTACTCTG
Exon4 forward ET1(LC) ⇒	GGTGGACACCAGTTCTGAAGATTG

Exon4 reverse ET1(LC) ←	CAATCTTCAGAACTGGTGTCCACC
Et1 (Garg, 2002 ; LC cDNA 5' Ex1⇒)	GGCAAAGCGGCTATGACGAC
Et2 (Garg, 2002 ; LC cDNA 3'← stop)	TCAGAACTGGTGTCCACCGC
Et8 (Garg, 2002 ; LC cDNA 3' UTR 548 ← 570)	CCAATGTTGTCAAAAACCTACAG
Et10 (Garg, 2002 ; LC cDNA 124 ← 144)	TTCGAGGAGGAGGCGACAAG
Et11 (Garg, 2002 ; LC cDNA 317 ← 334)	GCTTGGTCCTTTCGCCAC
Et12 (Garg, 2002 ; LC cDNA 127 ⇒ 144)	GTCGCCTCCTCCTCGAAG
Et13 (Garg, 2002 ; LC cDNA 335 ⇒)	CGCTTGATAAACAGAGTAGCCTATG
Et16 (Garg, 2002 ; LC Et1 Intron2 ⇒)	ATTGGGTAGCCACCAGCAACG
Et32 (et1-ref 1.3 kb XhoI 5' ⇒)	TCGAGGGTATACATGTGGATGA
Et33 (et1-ref 1.3 kb XhoI 3' ←)	CTCGAGAGGTTTCGTCAGGAG
Et34(Garg, 2002 ; LC cDNA Promoter ⇒)	GTCGGGACCGTGACGCT
-21M13/UP (Universal sequencing Primer)	GTAAAACGACGGCCAGT
M13Rev./RP (Reverse sequencing Primer)	AACAGCTATGACCATG
Mu SEL (Patricia Lauert)	TCTATAATGGCAATTATCTC
Mu Primer allg.	GCBCTCTTCGTCYATAATGGCAAT
<i>NdeI</i> Primer für Intein Fusionsprotein ⇒	CAAAGCGCATATGACGACGACGGCCGCCGG
<i>XhoI</i> Primer für Intein Fusionsprotein ←	CAGCCTCGAGATCTTCAGAACTGGTGTCCAC
<i>NdeI</i> Primer für kurzes Intein Fusionsprot.	GCTATTCATATGAAGCTTCCTAGAAGAACC
<i>XhoI</i> Primer für kurzes Intein Fusionsprot.	CGCGTCCGAATTGGCTCGAGGGAGGAGGA
<i>EcoRI</i> Primer für c9.1 ohne Signalsequenz	GCTTCCGAATTCGGCATGGCCAATTCGGAC
Reverse Primer f. c9.1 ohne Signalsequenz	CCACCGCCGGCGAGATCTTAATCACCTAGG

Tabelle 5

Eine Darstellung der *etched1*-Primer mit ihren Positionen im *Etched1*-Gen ist im Anhang unter 7.3 und 7.4 aufgeführt.

2.1.5 Geräte

<u>Gerät</u>	<u>Modell</u>	<u>Hersteller</u>
Thermomixer	Modell 5436	Eppendorf-Netheler-Hinz
Zentrifugen	Variofuge 3.0	Heraeus
	Sigma 113	B. Braun Biotech International
	Sigma 201 M	B. Braun Biotech International
	Sigma 2 K 15	B. Braun Biotech International
UV-Crosslinker	Sorvall RC 24	Du Pont
	SF UVC 1000	Hoefer Scientific Instruments
Hybridisierungsöfen		Appligene
Gelkammern	GNA-200	Pharmacia
Powersupply	Power Pac 300	Bio-Rad
	GPS 200/400	Pharmacia
Heizblock	Techne Dri Block 2A	Gesellschaft für Labortechnik
Sequenzierer	377 DANN Sequencer	PE Applied Biosystems
Thermoblock	DANN Thermalcycler	Perkin Elmer
	Trio-Thermoblock	Biotron
Waagen	Feinwaage basic	Sartorius AG
	GT 600-G	Sartorius AG
Magnetrührer	RET	IKA-Labortechnik
Vortex	G560	Scientific Industries
UV-Tisch	UVT-28 M	Herolab
Kamera		Herolab
Drucker	Video Copy Processor	Mitsubishi
Sterilbank	UVF 612 S	BDK Luft und Reinraumtechnik

pH-Meter	ph 530	WTW
Spektrophotometer	UVIKON 922	Kontron
Wärmeschrank	WTB Binder	Labortechnik GmbH
Inkubationsschüttler	HT Multitron	Infors
Dampfsterilisator	2540 EL	Tuttnauer
Schüttler	IKA HS 250 basic	IKA-Labortechnik
Szintillationszähler	Scotlab Easycount QC 2000	Bioscan, Inc.
Geigerzähler	Contamat FHT 111M	FAG

Tabelle 6

2.2 Methoden

2.2.1 DNA

2.2.1.1 DNA-Präparation (genomisch)

Genomische Mais-DNA wurde nach der Methode von Dellaporta (Dellaporta et al., 1983) gewonnen: Bis zu 2 g Blätter oder junge Maiskölbchen wurden mit flüssigem Stickstoff zu einem feinen Pulver zermörsert, mit 10 ml EB-Puffer versetzt und in ein Falcon-Röhrchen (50ml) überführt. Dann wurde 1 ml SDS (20%) zugegeben und 10 min bei 65°C im Wasserbad inkubiert. Nach Zugabe von 5 ml 5M KOAc wurde gründlich aber vorsichtig gemischt und die Proteine für 20 min bei 0°C (auf Eis) gefällt. Es folgte eine Zentrifugation für 20 min bei 3000 rpm und 4°C. Der Überstand wurde durch Miracloth filtriert und 0.7-0.9 Vol. Isopropanol zugegeben. Nach einer Fällung von 30 min auf Eis folgte eine weitere Zentrifugation für 20 min bei 3000 rpm, 4°C. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und das DNA-Pellet 15 min an der Luft getrocknet. Abschließend wurde das Pellet in 900 µl (50/10 TE) über Nacht im Kühlschrank gelöst. Am nächsten Tag wurde ein *RNase*-Verdau in einem 2 ml Eppendorfgefäß durchgeführt, indem 8 µl *RNase*-Stocklösung (10 mg/ ml) zugegeben und für 1 h bei 37°C inkubiert wurde. Danach wurde 2 x mit dem gleichen Volumen (ca. 900 µl) Phenol/Chloroform extrahiert und anschließend bei 13000 rpm zentrifugiert und die jeweilige obere Phase abgenommen. Abschließend wurde mit einem Volumen Chloroform nachgewaschen, die DNA mit 1/10 Volumen 3M Na-Acetat und 2 Volumenteil Ethanol bei -20°C gefällt und dann für 20 min bei 13000 rpm und 4°C pelletiert. Das Pellet sollte kurz an der Luft trocknen und wurde dann in TE aufgenommen.

2.2.1.2 Plasmid-DNA-Präparation:

TELT-Minipräparation:

3 ml LB wurden mit einer Bakterien-Einzelkolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C und ca. 180 rpm inkubiert. Von der Kultur wurden 1,5 ml pelletiert (1,5 ml Reaktionsgefäß: 3 min, 13000-15000 rpm, RT). Nach dem Absaugen des Überstandes wurde das Zellpellet in 200 µl TELT- Lösung resuspendiert. Nach der Zugabe von 20 µl Lysozymlösung (10 mg/ml in TE) wurden die Proben für 3 min auf 95°C (Heizblock) erhitzt und anschließend auf Eis abgekühlt. Daraufhin folgte eine Zentrifugation für 20 min bei 4°C und 15000 rpm. Das Pellet wurde mit einem sterilen Zahnstocher entfernt, während der Überstand mit 100 µl Isopropanol (RT) gemischt wurde. Dann wurde wieder für 20 min zentrifugiert (4°C 15000 rpm), der Überstand vorsichtig abgenommen und das Pellet mit 500 µl 70% igem Ethanol (-20°C) vorsichtig gewaschen. Nach nochmaliger Zentrifugation (wie vorher) wurde der Überstand sorgfältig abgenommen und das kurz getrocknete Pellet in 40-50 µl TE I pH 8 aufgenommen.

2.2.1.3 NucleoSpin System

Die Aufreinigung von Plasmid DNA zur Sequenzierung erfolgte mit dem NucleoSpinPlasmid DNA Purification Kit (Macherey-Nagel, Düren) nach Anweisung des Herstellers mit folgender Änderung: Der Puffer A4 wurde zweimal hintereinander zum Waschen der Säule eingesetzt.

2.2.1.4 Restriktion von DNA

Die verwendeten Enzyme wurden laut Herstellerangaben mit den entsprechenden Puffern in einem Endvolumen von 20 µl (Plasmid-DNA) und 30 µl (genomische DNA) eingesetzt. Dabei sollte die maximale Konzentration des verwendeten Enzyms 1% des Gesamtvolumens betragen, damit die Aktivität nicht durch hohe Konzentrationen an Glycerol inhibiert wird. Plasmid-DNA wurde 1–2 Std., genomische DNA 3–5 Std. bei den erforderlichen Temperaturen inkubiert.

2.2.1.5 Spin column

Um nicht eingebaute Nukleotide oder Salze in Lösungen von DNA zu trennen, können Moleküle mit geringerem Molekulargewicht über eine Gelfiltration entfernt werden. Kleinere Moleküle verweilen länger in der Säule mit porösen Kügelchen aus stark hydratisiertem und quervernetztem Polymer, weil ihnen ein größeres Volumen zur Verfügung steht als den großen Molekülen, die in die Räume innerhalb des Säulenmaterials nicht eintreten.

In die Spitze einer 1 ml Pipettenspitze wurde Glaswolle gegeben und mit Sephadex G 25 aufgefüllt. Um die Sephadexsäule zu dehydratisieren, wurde die gefüllte Spitze in den eingeschnittenen Deckel eines Eppendorfgefäßes gesteckt und in einem 50 ml Falkongefäß für 5 min bei 2500 rpm und RT zentrifugiert. Die Probe wurde auf das trockene Säulenmaterial aufgetragen und durch erneute Zentrifugation in ein frisches Eppendorfgefäß eluiert.

2.2.1.6 Inhibierung von Enzymaktivitäten

Um die Aktivität von Restriktionsenzymen zu beenden, wurde der Reaktionsansatz bei 65°C oder 75°C (Herstellerangaben) für 10–20 min erhitzt.

2.2.1.7 Agarose Gelelektrophorese von DNA

Zum Auftrennen von DNA wurde die Agarose-Gelelektrophorese benutzt. Agarose wurde in einer Konzentration, je nach Trennbereich des fertigen Gels (s. Tabelle nächste Seite), mit 1 x TAE Puffer aufgeköcht. Nach dem Abkühlen auf ca. 50–60°C wurde Ethidiumbromid (0.5µg/ml) hinzugegeben und die Flüssigkeit in das vorbereitete Gelbett gegossen. Nach dem Erhärten des Gels wurde es in eine, mit 1 x TAE Puffer gefüllte Gelkammer, gelegt. Die DNA-Proben wurden mit 1/10 Probenpuffer versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Zur Auftrennung von Plasmid-DNA wurde für 1–2 Std. eine Spannung von 10 Volt/cm Gellänge angelegt. Die Auftrennung genomischer DNA erfolgte mit 25–35 Volt über Nacht. In den, in dieser Arbeit, durchgeführten Experimenten, wurden zur Auftrennung der verschiedenen DNA-Proben von genomischer-, Plasmid- und Lambda-DNA fast immer 0.7%ige Agarosegele verwendet.

Konzentration in %	Trennbereich in kb
0.3	5 - 60
0.6	1 - 20
0.7	0.8 - 10
0.9	0.5 - 7
1.2	0.4 - 6
1.5	0.2 - 4
2.0	0.1 - 3

Tabelle 7

2.2.1.8 Southernblot

Nach der Restriktionsspaltung der DNA und Auftrennung in einem Agarosegel wurden die Gelspuren mit dem Molekulargewichtsmarker abgeschnitten. Ein mit genomischer DNA beladenes Gel wurde dann 1 h lang in einer Denaturierungslösung geschwenkt, dann 2 x 30 min in Neutralisationslösung und danach kurz mit 10x SSC inkubiert. Die DNA des so behandelten Gels wurde mit 10x SSC auf eine Hybond Nx- Membran über Nacht übertragen. Lambda- oder Plasmid-DNA kann ohne diese Schritte direkt mit 0,4 M NaOH auf Hybond N+- Membranen geblottet werden. Am nächsten Tag wurde die DNA auf der Membran durch UV-Bestrahlung im UV-Crosslinker fixiert. Die Membran wurde danach noch für 30 min in 2 x SSC geschwenkt und konnte anschließend prähybridisiert werden (s. 2.2.7.2).

2.2.1.9 Isolierung von Fragmenten aus Agarosegelen

A) Zentrifugation durch Glaswolle und anschließende Phenol/Chloroform-Extraktion:

Nach erfolgter Auftrennung im Agarosegel wurde das zu isolierende Fragment unter UV-Licht aus dem Gel ausgeschnitten und in eine 1 ml Pipettenspitze gegeben, deren Spitze mit ein wenig Glaswolle gefüllt war. Diese Spitze wurde dann in den eingeschnittenen Deckel eines Eppendorfgefäßes gesteckt und in einem 50 ml Falcongefäß 10 min lang bei 3500 rpm und RT zentrifugiert. Das Eluat wurde durch eine Phenol/Chloroform-Extraktion aufgereinigt und anschließend gefällt.

B) Pharmacia/Biotech DNA + Gel Band Purification Kit:

Ein gewogenes Gelstück mit dem zu isolierenden Fragment wurde mit 10 µl/10 µg Capture Puffer gevortext und 5-15 min lang bei 60°C inkubiert, bis die Agarose darin gelöst war. Die DNA wurde kurz abzentrifugiert. Der Überstand wurde auf eine Säule gegeben und 1 min stehengelassen. Danach wurde für 30 Sekunden bei 12000 rpm zentrifugiert. Das Filtrat wurde entfernt und die Säule mit der DNA wurde mit 500 µl Waschpuffer gewaschen. Danach wurde sie trocken zentrifugiert. Zuletzt wurde die Säule in ein neues Röhrchen gesetzt und erst mit 30 µl und danach mit 20 µl autoklaviertem H₂O eluiert.

2.2.1.10 Extraktion von DNA mit Phenol/Chloroform

Die Extraktion von DNA mit Phenol/Chloroform-Gemisch (1:1) dient der Entfernung von Proteinverunreinigungen. Das Volumen der aufzureinigenden DNA-Lösung wurde auf 0.5–1 ml gebracht, mit dem gleichen Volumen Phenol/Chloroform versetzt und bis zur Emulsionsbildung vermischt. Nach Zentrifugation für 3–5 min bei 15000 rpm und RT wurde der wässrige Überstand ohne Interphase abgenommen und ein zweites Mal mit einem Volumen Phenol / Chloroform emulgiert und anschließend zentrifugiert. Anschließend wurde das gelöste Phenol im Überstand durch eine Extraktion mit Chloroform entfernt und die DNA gefällt (s. 2.2.1.11).

2.2.1.11 Fällung von DNA

Zu der DNA-enthaltenden wässrigen Lösung wurde 1/10 Vol. 3M Na-Acetat pH 5.2 und ein zweieinhalbfaches Volumen Ethanol oder statt Ethanol ein 0.5-0.7faches Volumen Isopropanol gegeben. Die DNA wurde 30 min bei –20°C gefällt und anschließend 15 bis 30 min bei 15000 rpm und 4°C pelletiert. Der Überstand wurde entfernt und das Pellet mit 70%igem Ethanol gewaschen. Das an der Luft getrocknete Pellet wurde in Wasser oder TE aufgenommen.

2.2.1.12 Mengenbestimmung von Nukleinsäuren

Die Mengenbestimmung eines Aliquots einer DNA-Lösung erfolgte über die Auftrennung im Agarosegel mittels eines mitlaufenden Standards (Smartladder Eurogentech). Mit einer computergestützten Kamera (Programm E.A.S.Y. plus Rev 3.24.DNA-Sequenzierung und Sequenzanalyse) ist eine Abschätzung der Intensität der Ethidiumbromid-gefärbten Banden im Vergleich möglich. Die quantitative Bestimmung von Nukleinsäuren erfolgte photometrisch mit Hilfe des GeneQuant-Spektralphotometers DNA/RNA Calculator der Firma Biotech.

2.2.1.13 Klonierung von PCR-Produkten mittels des TOPO TA Cloning[®] Kits

Die Klonierung von PCR-Fragmenten in den PCR[®]2.1-TOPO[®] Vektor erfolgte nach dem Protokoll des Invitrogen Instruction Manuals Version 0.

2.2.2 RNA-Aufarbeitung

2.2.2.1 *RNase*-Inaktivierung

Alle Lösungen, die bei Arbeiten mit RNA verwendet wurden, wurden zuvor, falls möglich, mit dem *RNase*-Inhibitor Diethylpyrocarbonat (DEPC) behandelt (Sambrook *et al.*, (1989), oder mit DEPC-behandeltem deionisiertem H₂O angesetzt. Geräte wie Hybridisierungsröhren und Elektrophoresekammern wurden vor der Benutzung mit Seifenwasser und Ethanol gereinigt und mit DEPC-Wasser gespült.

2.2.2.2 Isolierung von Gesamt-RNA aus pflanzlichem Gewebe

Bis zu 2 g Pflanzenmaterial wurden in Stickstoff bzw. zusammen mit Trockeneis zerkleinert und noch gefroren in 50 ml Falcon-Tubes mit 5 ml Lysepuffer (100mM Tris pH 9, 100 mM NaCl, 20 mM EDTA auf pH 9 einstellen und auf 2% SDS bringen) versetzt. Danach wurden 100 μ l β -Mercaptoethanol und 2,5 ml Phenol zugegeben und der gesamte Ansatz direkt auf einen Taumelschüttler gestellt. 5 min nach dem Auftauen wurden 2,5 ml Chloroform zugegeben und erneut für 5 min gemischt. Durch Zentrifugation bei 3000 rpm für 10 min/RT

wurden die Phasen getrennt, und die obere wäßrige Phase in 15 ml Falcon-Tubes überführt. Die wäßrige Phase wurde zuvor mit Phenol und Chloroform behandelt (ohne β -Mercaptoethanol) bis keine deutliche Interphase mehr zu sehen war. Danach wurde noch einmal mit Chloroform extrahiert und die wässrige Phase einer NaAc/EtOH-Fällung unterzogen (1-2 h/-80°C oder $\bar{u}N$ /-20°C). Das Pellet wurde in 2,5 ml gelöst und mit 2,5 ml LiCl (4M) versetzt. Die Fällung erfolgte entweder bei 3 h auf Eis oder $\bar{u}N$, bei 4°C. Danach wurde bei 3000 rpm und 4°C für 30 min zentrifugiert und das Pellet in 1 ml H₂O gelöst. Anschließend erfolgte eine NaAc/EtOH-Fällung und zweimaliges Waschen mit 70% EtOH. Nach kurzzeitigem Trocknen wurde das Pellet in möglichst wenig H₂O aufgenommen und Konzentration photometrisch bestimmt.

2.2.2.3 RNA-Auftrennung in Formaldehyd-Gelen

Zur Auftrennung von RNA unter denaturierenden Bedingungen wurden 1,5 bis 2%ige Agarose-Gele mit Formaldehyd (Endkonzentration 6%ig) in 1xMEN-Puffer (200 mM MOPS; 50 mM Na-Acetat; 10 mM EDTA; pH 8,0) verwendet. Als Längenstandard für die RNA-Elektrophorese diente die 0.24-9.5 kb RNA Ladder der Firma Life Technologies/Gibco BRL. Die RNA-Proben (5-20 $\bar{u}g$ RNA) wurden mit dem dreifach konzentrierten RNA-Probenpuffer (65% Formamid; 8% Formaldehyd; 1x MOPS; pH 8,0) versetzt, 10 min auf 65°C erhitzt und nach Zugabe von 1-2 ml Ethidiumbromid (1 mg/ml) sofort aufgetragen. Als Laufpuffer für die Gelelektrophorese wurde 1x MEN-Puffer verwendet.

2.2.2.4 Northernblot

Die im Formaldehyd-Gel aufgetrennten RNA-Fragmente wurden aus dem Gel auf eine Nylonmembran (Hybond-NX) übertragen. Der Transfer erfolgte wie beim Southern-Blot als Kapillarblot nach Sambrook et al. (1989) mit 20x SSC als Transferpuffer. Nach dem Transfer wurde die RNA durch Bestrahlung mit UV-Licht der Stärke 120 mJoules/cm² (UV-Crosslinker UVC 1000/Hoefler/San Francisco/USA) auf der Membran fixiert. Die Hybridisierung und Herstellung der DNA-Sonden für die Hybridisierung erfolgte wie unter 2.2.7 beschrieben.

2.2.3 Proteine

2.2.3.1 Proteinisolierung/ Isolierung von denaturiertem, pflanzlichen Gesamtprotein und von Gesamtprotein aus *E. coli*

Zur Herstellung von nicht-nativem Gesamtprotein aus Mais-Pflanzen und Sämlingen wurde das Pflanzenmaterial in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend gemörsert. Danach wurde das Material in SDS-Puffer (50 mM Tris-HCl; 2% SDS; 30% Glycerin; 100 mM DTT; pH 6,8) aufgenommen (2 ml Puffer/1g Pflanzenmaterial) und 5-10 Minuten aufgeköcht. Nach 10 Minuten Zentrifugation bei 4°C und 12.000 rpm in der Tischzentrifuge wurde der proteinhaltige Überstand abgenommen und bei -70°C eingefroren.

Für die Isolierung von Gesamtprotein aus *E.coli* wurden pro Pellet (aus 1 Milliliter Bakterienkultur) 100 µl des SDS-Puffers zugegeben. Diese Suspension wurde aufgeköcht zentrifugiert und der Überstand abgenommen und eingefroren.

Mit den Überständen konnte dann eine Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford (Bradford, 1976) durchgeführt werden.

2.2.3.2 Analyse von Proteinen durch Gelelektrophorese und Westernblot

Zur Analyse von Proteinen wurden diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid Gelelektrophoresen (SDS-PAGE) und Western-Blots durchgeführt.

2.2.3.2.1 SDS-PAGE

SDS-Polyacrylamidgele nach dem Prinzip der diskontinuierlichen Elektrophorese wurden nach Sambrook *et al.* (1989) mit Acrylamid rotiphorese® Gel30 der Firma Roth im Mini Protean-Gießstand der Firma Bio-Rad präpariert. Es wurden Trenngelkonzentrationen von 10-15% Acrylamid und eine Sammelgelkonzentration von 5% verwendet. Vor dem Auftragen wurde zu den Proteinlösungen ¼ Volumen Protein-Probenpuffer (0,19 M Tris-HCl; 7% SDS; 15% β-Mercaptoethanol; 30% Glycerin; 0,225% Bromphenolblau; pH 6,8) gegeben und kurz aufgeköcht. Als Längenstandard diente der Color-Marker Wide Range der Firma Sigma.

Für die Elektrophorese wurde Tris-Glycin-Laufpuffer (25 mM Tris-HCl; 200 mM Glycin; 0,1% SDS; pH 8,8) verwendet. Die Elektrophorese wurde in der Mini Protean-Gelkammer bei 80-120 Volt durchgeführt.

Nu-PAGE[®] Bis-Tris SDS-PAGE Fertig-Gele

Teilweise wurden für die Protein-Analysen auch fertige 10%ige bzw. 12%ige Gele der Firma Invitrogen, zusammen mit der XCell *SureLock*[™] Mini-Cell und Nu-PAGE[®] MES SDS Running Buffer, oder Nu-PAGE[®] MOPS SDS Running Buffer verwendet. Bei konstant 200 Volt liefen diese Gele für ca. 35 min (MES Buffer) bzw. 50 min (MOPS Buffer).

Das Färben der Gele erfolgte entweder mit dem SilverQuest[™] Silver Staining Kit oder SimplyBlue[™] Self Staining der Firma Invitrogen. Getrocknet wurden die Gele mittels des DryEase[®] Mini-Gel Drying System (Invitrogen).

2.2.3.2.2 Coomassie-Färbung

Die Coomassie-Färbungen der Proteine folgten den Beschreibungen von Sambrook *et al.* (1989). Für die Färbung wird ein Gel 30 - 60 min. unter leichtem Schwenken in Coomassie Brilliant Blue G-250 Lösung inkubiert. Anschließend wird für mehrere Stunden mit der Entfärbelösung (siehe 2.1.2) 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 "Klarsicht-Folie" oder mittels des DryEase[™] Gel Drying Systems und Cellophanfolien.

2.2.3.2.3 Silberfärbung

Die Silberfärbung der Proteine wurde mittels des SilverQuest[™] Silver Stain Kit der Firma Invitrogen durchgeführt.

2.2.3.2.4 Westernblots

Die Proteine wurden für die Western-Analysen aus dem Gel bzw. NuPAGE[®]-Fertig-Gel durch Elektroblob auf Nitrocellulosemembranen Hybond-C (RPN2020W) transferiert (nach Sambrook *et al.*). Der Transfer erfolgte 30-40 min bei 15 V in der Blotting-Apparatur Trans-Blot[®] SD der Firma Bio-Rad mit Hilfe des Spannungsgerätes GPS3030 D der Firma Phase (Lübeck). Der erfolgreiche Transfer der Proteine auf die Membran wurde vor der Immundetektion durch Anfärben der Proteine mit dem Reagenz Ponceau S nach Sambrook *et al.* (1989) kontrolliert.

2.2.3.2.5 Immunodetektion

Die auf die Membran übertragenen Proteine wurden mit Hilfe spezifischer Antikörper detektiert, die entweder über alkalische Phosphataseaktivität bzw. ECL-Detektion mit ihren spezifischen Substraten reagieren. Als Primär-Antikörper wurden polyklonale Antikörper zweier Kaninchenseren (4206 und 4207) gegen das ET1-Protein verwendet (siehe hierzu 2.2.18). Vor der Antikörperbindung wurden die Membranen über Nacht bei 4°C in 4% Magermilchpulver in TBST geschüttelt, um unspezifische Bindestellen zu blockieren. Nach dem zweimaligen Abspülen der Membranen mit TBST Puffer wurden sie einmal 15 min und zweimal 5 min bei RT mit TBST gewaschen. Nach einer Stunde Inkubationszeit mit dem ersten Antikörper/Antiserum, unter leichtem Schütteln, wurde wieder wie vorher gewaschen. Die beiden Anti-*Etched1*-Peptid-Antiseren 4206 und 4207 wurden, wie die ihnen entsprechenden Präimmunsereen, 1:500 verdünnt (4% Milchpulver in TBST). Danach erfolgte für eine Stunde die Inkubation mit dem zweiten gekoppelten Anti-Kaninchen Antikörper (Verdünnung: 1:5000). Danach wieder mit TBST gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift erfolgte die Detektionsreaktion (2.2.3.2.5 a und b).

2.2.3.2.5a Alkalische Phosphatase-Reaktion

Zum Nachweis spezifischer Proteinbanden werden als sekundäre Antikörper häufig Antikörper benutzt die eine alkalische Phosphatase-Aktivität besitzen. Die Alkalische Phosphatase reagiert mittels der Substrate BCIP (X-Phosphat/5-Bromo-4-Chloro-3-Indoyl-Phosphat) und NBT (Nitroblue Tetrazolium Chlorid) zu einem violetten Farbstoff, der auf den entsprechenden Proteinbanden präzipitiert. Zur Nachweisreaktion wurden 33 µl BCIP (50%ig in DMF) in 10 ml Alkalische Phosphatase Puffer gegeben, vermischt und 33 µl NBT (10%ig in DMF) hinzugegeben. Diese Reaktionsmischung wurde auf die Membranen gegeben und innerhalb von 20 min musste die Farbreaktion erfolgen. Gestoppt wurde die Reaktion dadurch, daß die Membran(en) in einer Schale mit 50 ml PBS Puffer + 200 µl 0,5 M EDTA; pH 8,0 geschüttelt wurde.

2.2.3.2.5b Peroxidase-Reaktion

Für die Peroxidase-Reaktion wurden gleiche Volumina der Detektionslösungen 1 (0,1 M Tris-HCl; 2,5 M Luminol (3-Aminophthalhydrazid); 400 µM *p*-Coumarsäure; pH 8,5) und 2 (0,1M Tris-HCl; 5,4 mM H₂O₂) gemischt, auf glattgezogene Frischhaltefolie über einer Glasplatte pipettiert und die Membran(en) mit der Frontseite nach unten 1 min in dem Lösungsgemisch inkubiert. Die Dokumentation erfolgte auf Röntgenfilmen (Hyperfilm™-ECL).

2.2.3.3 Proteinexpression des Etched1 in Bakterien

Die Herstellung eines Etched1-Fusionsproteins sollte, mittels des NEB IMPACT™-CN Systems durchgeführt, zur Isolation des Etched1 Proteins dienen. Das IMPACT™-CN System basiert auf der Herstellung von Fusionsproteinen, die in Bakterien überexprimiert und über Affinitätschromatographie mit Chitin aufkonzentriert werden können. Diese Aufreinigung des überexprimierten Fusionsproteins ist durch eine Chitin-Bindedomäne des Inteins möglich. Ferner besitzen die Fusionsproteine eine, über DTT induzierbare, Schnittstelle, die die Abspaltung des Zielproteins vom Fusionsproteins ermöglichen soll (s. Abb.7)

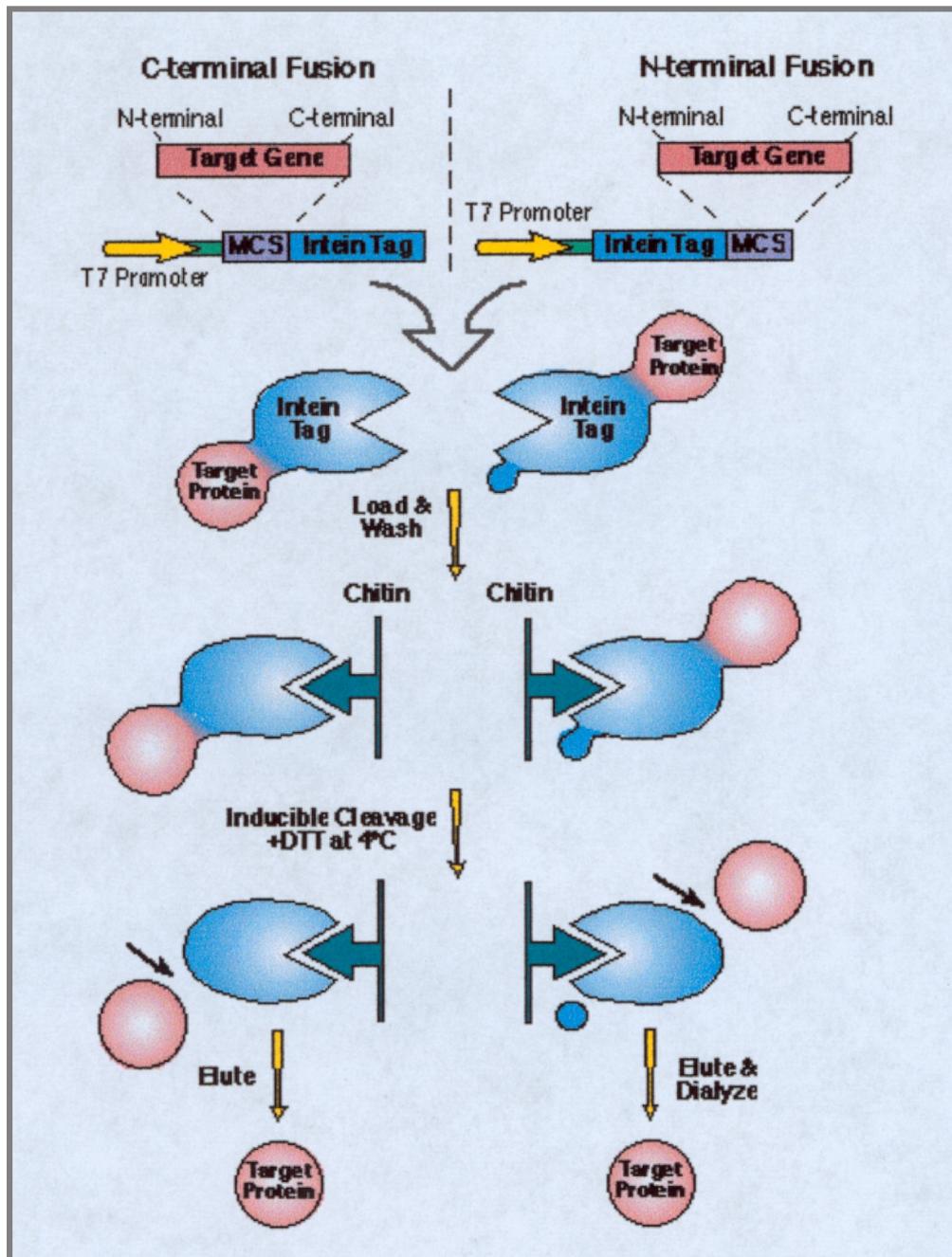


Abbildung 7 Prinzip des IMPACT™-CN Systems. Das Fusionsprotein kann aufgrund der Chitin-Affinität der Intron-Domäne am Säulenmaterial (bestehend aus Chitinbeads) binden und von anderen Proteinverunreinigungen gereinigt werden. Anschließend kann mit DTT das Zielprotein vom Fusionsprotein abgespalten werden.

Zur Herstellung der Konstrukte für die Intein-Fusionsproteine mußten modifizierte Primer hergestellt werden. Die *Et1* cDNA sollte sowohl N-terminal (Vektor pTYB2), als auch C-terminal (Vektor pTYB12) über *NdeI* und *XhoI* Schnittstellen, hinter bzw. vor die Inteinsequenz, kloniert werden. Es mußte daher ein Primer mit *NdeI*-Schnittstelle und einem Startcodon für den 5' Bereich des *Etched1* Gens ausgesucht werden. Ein zweiter (Rückwärts-) Primer mußte mit einer *XhoI*-Schnittstelle im 3' translatierten Bereich des Gens versehen sein.

Original-Sequenz 5` C AAA GCG GCT **ATG** ACG ACG ACG GCC GCC GG 3`

a) Sequenz Primer *NdeI* 5` C AAA GCG **CAT ATG** ACG ACG ACG GCC GCC GG 3`

Original-Sequenz 5` GTG GAC ACC AGT TCT GAA GAT TGA TCT GCT G 3`

Modifizierte Sequenz 5` GTG GAC ACC AGT TCT GAA GAT **CTC GAG** GCT G 3`

b) Sequenz Primer *XhoI* 3`CAC CTG TGG TCA AGA CTT CTA **GAG CTC** CGA C 5`

Außerdem wurden separat der LC cDNA Bereich, der der Signalsequenz des ET1-Proteins entspricht, und der cDNA Bereich, der der AS-Sequenz des TFIIIS-homologen Bereiches aus dem ET1 entspricht, mittels PCR und den entsprechenden modifizierten Primern amplifiziert. Dabei wurde ein Startcodon vor dem TFIIIS homologen Bereich eingefügt

Original TFIIIS-homolog 5` GTC ATT GAT ATA AAG CTT CCT AGA AGA AGC 3`

c) Primer *NdeI* TFIIIS 5` GCT ATT **CAT ATG** AAG CTT CCT AGA AGA ACC 3`

Original Sequenz 5` TCC TCC TCC GGC GAG GCC AAT TCG GAC GCG 3`

Modifizierte Signalsequenz 5` TCC TCC TCC **CTC GAG** GCC AAT TCG GAC GCG 3`

d) Primer *XhoI* Signalsequenz 3` AGG AGG AGG **GAG CTC** CGG TTA AGC CTG CGC 5`

Primer Positionen im *Etched1* Gen

a) CAAAGCG**CATATG**ACGACGACGGCCGCCGG 
 CGTTGTCTGACAGGCAAAGCGGGCT**ATG**ACGACGACGGCCGCCGGGCACGGCTGC
 TGCTGGGCGGGGATTCCGCCCTTCGCGTTGTTGCCGCGGATTCTCTCGACCGGC
 CGGGAGACTCCTCCTCCTCGCGCTTCCCTTGTCGCTCCTCCTCGAAGCTCAGG
 TCCTCCTCC**CTCGAG**CCAATTCGGACGG c)
 GCTTCCTCCTCCGGCGAGGCCAATTCGGACGGCTGCCGTCGCCAACGGAAGCC
 d) GCTATT**CATATG**AAGCTTCCTAGAAGAAGC 
 GCTATTGATATAAAGCTTCCTAGAAGAAGCTTGCTGTGTTCAATTTACATGCAAC
 GCATGTGGCGAAAGGACCAAGCGCTTGATAAACAGAGTAGCCTATGAAAGAGGC
 ACAGTTTTTCTTCAGTGTGCAGGGTGCCAGGTGTACCATAAGTTTGTGATAAT
 CTTGGGCTAGTTGTTGAGTATGATCTACGAGAAGAAAACGAGCTACAAGGAGAA
 b) GGTGGACACCCAGTTCTGAAGAT**CTCGAG**GCTG
 AATGCGGTGGACACCCAGTTCTGAAGAT**TGA**TCTGCTGTGAGAAGCGATGTTGGT
 ATGCAAAACGCCCTGTACTCTGTAGGTTTTTGACAACATTGGTTATTTGTATAG
 CATAAAAATGGCACTTTTTAAAGTTGTTGCACATACTCATCTGAAATTCTGAAT
 ACAGCAGGGCCTACATTGTACTTTTT (A) ₆₀

Abbildung 8
Positionen der modifizierten Primer innerhalb des *Etched1* Gens
Schwarz sind Startcodons, kursiv und unterstrichen *NdeI* und *XhoI*-Schnittstellen dargestellt
Pfeile zeigen die Richtung der PCR

Durch PCR des Plasmids pBluescriptc9.1 mit Pwo Proofreading Polymerase konnte die ca. 700 bp grosse Bande (Primerpaar zur Amplifikation des gesamten *Etched1* cDNA-Bereiches), aus einem 0.7%igen Agarosegel ausgeschnitten und über das Pharmacia/Biotech DNA + Gel Band Purification Kit isoliert werden. Ebenso konnten auch der vordere und der hintere Teilbereich der *Etched1* cDNA in einer PCR mit den modifizierten Primern amplifiziert werden. Diese Amplifikate, die in ihrer AS Sequenz der Signalsequenz, bzw. dem TFIIS-homologen Bereich entsprechen, wurden ebenfalls über das Pharmacia/Biotech DNA + Gel Band Purification Kit aus einem Agarosegel isoliert.

PCR Ansätze

1 µl Template pBSc9.1(50 ng/µl)
 5 µl 10x Komplettpuffer
 1,5 µl dNTP-Mix 10 mM
 1,5 µl forward Primer 10 pM *NdeI* / *NdeI* TFIIS homolog
 1,5 µl reverse Primer 10 pM *XhoI* / *XhoI* Signalsequenz
 37,5 µl H₂O
 1µl DMSO
 1µl Pwo Polymerase
 + Mineralöl

Bedingungen:

96°C, 2 min	Denaturierung	
96°C, 45 sec.	Denaturierung	
63-65°C, 45 sec.	Annealing der Primer	25 Zyklen
72°C, 2 min	Auffüllreaktion	
72°C, 10 min.	Abschluß	
4°C, endlos		

Die PCR Produkte wurden zur Sequenzierung in den TOPO-Vektor kloniert (s. 2.2.1.13). Nach der Sequenzierung der Klone mittels Universal und Reverse Primern wurden Maxipräparationen der Plasmide (Gibco-Maxi-Präp-Kit) gemacht. Die Plasmide und die Vektoren pTYB2 und pTYB12, kloniert in den Vektor TOPO wurden mit den Enzymen *NdeI* und *XhoI* geschnitten. Inserts und restringierte Vektoren wurden aus dem Gel isoliert (Pharmacia/Biotech DNA + Gel Band Purification Kit), zusammenligiert und in ER2566 *E.coli* kompetente Zellen transformiert. Danach wurden die Klone für die Fusionsproteine noch einmal durch Sequenzierung, auf den richtigen Leserahmen hin überprüft.

Folgende sechs verschiedene Plasmide wurden auf diese Weise hergestellt:

-*Etched1* cDNA in pTYB2

-*Etched1*cDNA in pTYB12

-5' Bereich der*Etched1*cDNA in pTYB2, der Signalsequenz des ET1-Proteins entspricht

-5' Bereich der*Etched1*cDNA in pTYB12, der Signalsequenz des ET1-Proteins entspricht

-3' Bereich der*Etched1*cDNA in pTYB2, der TFIIS-homologen Bereich des ET1-Proteins entspricht

-3' Bereich der*Etched1*cDNA in pTYB12, der TFIIS-homologen Bereich des ET1-Proteins entspricht

Mit diesen Plasmiden sollten Intein Fusionsproteine in den ER2566 kompetenten Zellen überexprimiert werden (2.2.4.5).

Da das Fusionsprotein aus dem TFIIS-homologen Bereich, C-terminal in den Vektor pTYB12 kloniert, als einziges überexprimiert wurde, erfolgte die Aufreinigung über eine Säule mit Chitinbeads. 5 ml Säulenmaterial wurden mit 45,0 ml Column Buffer 20 min, unter gelegentlichem Schütteln, bei 4°C im Erlenmeyerkolben equilibriert. Alle weiteren Schritte erfolgten ebenfalls bei 4°C im Kühlraum. Nach der Equilibrierung der Chitinbeads wurde der Puffer durch eine Zentrifugation entfernt und 10 ml des Überstandes, welcher das o. g. Fusionsprotein enthalten sollte, hinzugegeben. Beads und Überstand wurden dann für 60 min geschüttelt. Danach wurde die Suspension in eine Säule gegeben und der aufgefangen. Dann wurde das Säulenmaterial 4x mit dem 2,5 fachen Ausgangsvolumen Column Buffer gewaschen und die Waschfraktionen ebenfalls aufbewahrt. Anschließend wurde das dreifache Säulenvolumen Cleavage Buffer, bis auf ein wenig Überstand über dem Säulenmaterial, durch die Säule gegeben und die Säule verschlossen. Der Durchlauf des Cleavage Buffer wurde ebenfalls aufbewahrt und die Säule wurde ü.N. bei 4°C stehen gelassen.

Am nächsten Tag wurde abermals das dreifache Säulenvolumen Cleavage Buffer (aber ohne DTT) durch die Säule gegeben und 1,5 ml-Fraktionen gesammelt. Von allen Fraktionen wurden Proteinbestimmungen nach Bradford durchgeführt. Dabei stellte sich heraus, daß die Proteingehalte in den Elutionsfraktionen über eine Bradford-Bestimmung nicht meßbar waren.

Deshalb wurde die Säulenaufreinigung des pTYB12 TFIS-homologen ET1-Intein-Fusionsprotein mit frisch transformiertem, überexprimiertem und lysiertem Bakterienüberstand wiederholt. In den Elutionsfraktionen waren diesmal Proteingehalte meßbar. Die Proteingele mit den Proben wurden silbergefärbt (Abb. 22, 3.2.2)

2.2.4 Bakterien

2.2.4.1 Anzucht von Bakterienkulturen

Mit einem sterilen Zahnstocher wurden Bakterien einer Einzelkolonie entnommen, in 3 bis 10 ml Flüssigmedium überführt oder auf einem festen Medium ausgestrichen. Im Inkubationsschüttler erfolgte die Anzucht bei 37°C und 180 rpm für Flüssigmedien, für Platten erfolgte die Inkubation bei 37°C im Wärmeschrank, jeweils über Nacht.

2.2.4.2 Anzucht der Bakterienzellen für Transfektion durch λ -Phagen

Bakterienzellen XL Blue MRA(P2) wurden in 50 ml LB + 500 μ l Maltose (0.2%) + 500 μ l MgSO₄ (1M) gegeben und 5–6 Stunden lang im Inkubationsschüttler bei 37°C und 180 rpm angezogen. Die OD der Kultur wurde bei 600 nm am Photometer bestimmt (ca. 0.5) und 25 ml der Kultur wurden abzentrifugiert. Das Pellet wurde in einem errechneten Volumen von 10 mM MgSO₄ gelöst, daß einer OD = 1 entsprach.

2.2.4.3 Herstellung kompetenter *E. coli* Zellen

Mit 2 ml einer 5 ml *E. coli* Vorkultur wurden 100 ml Medium angeimpft, bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,3–0,5 wachsen gelassen und danach 1 bis 2 h auf ein Eis/Wasser-Gemisch gestellt. Nach dem Zentrifugieren in 50 ml Falcongefäßen für 10 min bei 4°C mit 3000 rpm wurde das Pellet in 10 ml Tfb-Puffer I vorsichtig resuspendiert und 10 min auf Eis inkubiert. Alle nachfolgenden Schritte erfolgten auf Eis und mit vorgekühlten Lösungen. Nach einer Zentrifugation für 10 min bei 4°C wurde das Pellet in 4 ml Tfb-Puffer II vorsichtig resuspendiert und in Aliquots zu 100 μ l in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei –80°C gelagert.

2.2.4.4 Transformation kompetenter Zellen mittels Hitzeschock

Ein 100 µl Aliquot auf Eis aufgetauter Bakterienzellen wurde mit 0,1–1 µg DNA versetzt und für 30–45 min auf Eis inkubiert. Nach 5 min Hitzeschock bei 37°C wurde 1 ml Medium zugegeben und noch 30 min bei 37°C, im Inkubationsschüttler inkubiert. Anschließend wurden 100 µl des Transformationsansatzes (1/10) direkt und der Rest nach Zentrifugation (5 min, 15000 rpm) und Verwerfen eines großen Teils des Überstandes (bis auf ca. 100 – 150 µl) auf Festmedium plattiert (LB-Platten mit dem entsprechenden Antibiotikum).

Bei Ampicillinresistenz eines Vektors wurde direkt nach dem Hitzeschock, ohne Zugabe von Flüssigmedium und anschließender 30minütiger Inkubation, ausplattiert.

2.2.4.5 Überexpression von Proteinen

Das Plasmid mit der Sequenz des zu exprimierenden Proteins wurde frisch in entsprechend geeignete Zellen (2.2.4.3) transformiert (LB-Medium mit Antibiotikum) und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde eine 4 ml Übernachtskultur angeimpft (LB/Antibiotikum + 0,4% Glucose). Zur Kontrolle wurde der Vektor ohne Insert mit angeimpft. Am nächsten Tag wurden 2,5 ml der Kulturen in 100 ml (LB/Antibiotikum + 0,4% Glucose) überimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 1,0-1,5 wachsen gelassen (ca. 3 h). Bei Erreichen der entsprechenden OD wurde 1 ml jeder Kultur in einem Eppendorfgefäß für 2-3 min zentrifugiert. Die Bakterienpellets wurden bei –20°C eingefroren, und bis zur Auftrennung auf Proteingelen aufbewahrt. Zur restlichen Bakterienkultur wurde dann IPTG in einer Endkonzentration von 2 mM hinzugegeben und noch 3 h weiter im Inkubationsschüttler inkubiert. Dabei wurden alle dreißig Minuten 1 ml der Kultur zentrifugiert und eingefroren. Nach 3 h Inkubation wurde der Rest der Kulturen in 50 ml Falcontubes überführt, zentrifugiert und die Pellets eingefroren. Diese konnten dann einer Proteinbestimmung nach Bradford (Bradford, 1976) unterzogen werden und auf Proteingele (2.2.3.2) aufgetragen werden.

2.2.5 Herstellung genomischer *etl-m15* Banken in Lamda-Phagen

2.2.5.1 Partieller Verdau/Enzymkinetik

Die Präparation der genomischen DNA der beiden *etl-m15* Linien erfolgte aus jungen Maisblättern nach Dellaporta (2.2.1.1). Diese *etl-m15* Pflanzen stammten aus geselbsteten Körnern (Genotyp: *etl-m15/etl-ref*) eines direkten Transposon Tagging Experimentes. Die gepoolte genomische DNA der Nachkommen beider Linien (jede Linie separat) wurde mit dem Restriktionsenzym Sau3A partiell verdaut. Für eine Enzymkinetik wurden insgesamt ca. 30 µg der jeweiligen DNA eingesetzt, um die Enzymmenge zu bestimmen, die zu DNA-Fragmenten der Größen zwischen 9 und 21 kb führte.

Pipettierschema für die Enzymkinetik:

X µl DNA (=30 µg)

15 µl Puffer Gibco REact 4

Y µl H₂O

150 µl Gesamtvolumen

Nach kräftigem Durchmischen des Reaktionsansatzes (150 µl Gesamtvolumen) wurden je 15 µl des Ansatzes in sieben von neun Reaktionsgefäßen (Nr. 2-8) pipettiert und 30 µl in ein mit Nr.1 bezeichnetes Reaktionsgefäß. Anschließend wurden auf Eis 4 U Sau3A aus einer 1:10-Verdünnung des Enzyms Sau3A (10 U/µl) in das erste Gefäß pipettiert, gevortext und 15 µl davon in Reaktionsgefäß Nr. 2 gegeben (siehe Pipettierschema unten). Nach gründlichem Mischen wurde mit neuer Pipettenspitze dieser Vorgang mit jeweils 15 µl des neuen halbkonzentrierten Enzymgemisches bis zum Reaktionsgefäß Nr. 8 weitergeführt. Dabei blieben etwa 15 µl des Reaktionsansatzes in Nr. 9 als Kontrolle, ohne Enzymzugabe, zurück. Die Reaktionsansätze 1-8 wurden dann exakt 60 Minuten in ein 37° C Wasserbad gestellt und danach je ein Mikroliter von 1-9 auf ein 0.4 %iges Agarosegel aufgetragen.

Tube Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Units Enzym	2	1	0.5	0.25	0.125	0.0625	0.0313	0.01565	0
U/ µg DNA	0.333	0.167	0.083	0.0417	0.0208	0.0104	0.0052	0.0026	0.0013

Der Reaktionsansatz der hauptsächlich 9-21 kb große Fragmente erhielt, wurde im größeren Maßstab (Volumen von drei Millilitern) mit den entsprechenden Units des Enzyms wiederholt, und bei 37°C über einen Zeitraum von 50, 60 und 70 Minuten partiell mit dem Enzym Sau3A verdaut. Die drei Reaktionsansätze wurden danach gepoolt.

Diese gepoolte partiell geschnittene DNA wurde einer zweifachen Phenol/Chloroform-Extraktion unterzogen, mit dem zweieinhalbfachen Volumen Ethanol gefällt, in 500 µl TE aufgenommen und durch einen Kaliumacetatgradienten (13 ml, 5-20%) für 20 Stunden bei 20°C und 20000 rpm in der Ultrazentrifuge (Rotor: Kontron TST41.14-41000 rpm) fraktioniert. Vom Gradienten wurden von oben nacheinander jeweils 600 µl abgenommen und 20 µl jeder zweiten Fraktion auf ein Testgel aufgetragen. Die Fraktionen, die Fragmente zwischen 9 und 21 kb enthielten, wurden gepoolt und mit dem zweieinhalbfachen Volumen Ethanol gefällt, mit 70%igem Ethanol gewaschen und in 10 µl TE aufgenommen.

2.2.5.2 Partielles Auffüllen der vereinigten Fraktionen

Die Hälfte der genomischen DNA-Fragmente (2.2.5.1) wurde dann mit dATP und dGTP partiell aufgefüllt und eine Testligation durchgeführt. Die aufgefüllten Enden der Sau3A-Schnittstellen sollten nicht mehr zusammen ligiert werden können, da sie nicht mehr zusammenpassen.

Partielles Auffüllen:

- 5.0 µl DNA
- + 10 µl dATP (10mM)
- + 10 µl dGTP (10mM)
- + 20 µl 5 x fill in Puffer MBI
- + 2 µl Klenow Fragment (Polymerase I, Gibco)
- + 8 µl H₂O (ad 50 µl)

Der Reaktionsansatz wurde 30 Minuten bei 37° C und 15 Minuten bei 65° C inkubiert. Zur Vergrößerung des Volumens auf 200 µl wurden 150 µl TE-Puffer hinzugegeben, 2 x mit Phenol/Chloroform extrahiert und anschließend mit Chloroform extrahiert. Die DNA wurde durch Zugabe von 1/10 Natriumacetat und 2,5 Vol. Ethanol gefällt (30 Minuten, -80° C). Anschließend wurde 30 Minuten bei 13500 rpm und 4° C zentrifugiert, das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen, 15 Minuten bei RT getrocknet und die DNA in 10 µl H₂O aufgenommen.

2.2.5.3 Ligationsreaktionen

Zur Überprüfung der Auffüllreaktion wurden Ligationsversuche durchgeführt. Dabei sollte nur nicht aufgefüllte DNA mit der Ligase ligiert werden können und ein große Bande ergeben. Die anderen Spuren auf dem Testgel (aufgefüllt+Ligase, nicht aufgefüllt –Ligase) sollten weiterhin die Bandbreite der 9-21 kb Fragmente zeigen.

Testligationen:

	aufgefüllt+ Ligase	nicht aufgefüllt + Ligase	nicht aufgefüllt - Ligase
DNA (äquivalente Mengen)	0.5 µl	2.0 µl	2.0 µl
H ₂ O	3.0 µl	1.5 µl	2.0 µl
Ligations puffer (5x)	1.0 µl	1.0 µl	1.0 µl
T4-DNA-Ligase (1U/ µl)	0.5 µl	0.5 µl	-

Ligation der genomischen aufgefüllten Fragmente mit dem λ- FixII-Vektor:

Für die Ligation wurden 400 ng der partiell verdauten und aufgefüllten *et1-M15/et1-ref* genomischen Mais DNA als Insert eingesetzt. Die Ligation erfolgte im Thermostaten bei 14°C über Nacht. Die Ligationsansätze der Lambda-*et1-m15*-Klone sollten danach in Phagen verpackt werden.

4µl-Ligationsansatz:

1µl λ-FixII-Vektor (Stratagene) mit XhoI verdaut und partiell aufgefüllt
 + X µl (= 400 ng) Insert-DNA
 + 0,8 µl 5x Ligationspuffer
 + 0,5 µl T4-DNA-Ligase (1U/ µl)
 + Y µl H₂O (ad 4.0 µl)

2.2.5.4 Verpackungsreaktion

Verpackung des Ligationsansatzes (Lamda-Arme ligiert mit genomischen *et1-m15* Fragmenten:

Am nächsten Tag wurde die Verpackungsreaktion mit dem Stratagene Verpackungsextrakt Gold-Pack III durchgeführt, der Reaktionsansatz für zwei Stunden bei 22° C belassen und mit 500 µl SM-Puffer und 20 µl Chloroform versetzt.

2.2.5.5 Titerbestimmung

Der Titer der beiden erstellten genomischen *etl-m15* Lambda-Banken des Verpackungsansatzes (s. 2.2.5.4) wurde folgendermaßen bestimmt:

1 µl des Reaktionsansatzes + 200 µl Bakterien (XL-Blue MRA (P2) frisch angezogen OD₆₀₀= 1, in 10 mM MgSO₄)

10 µl einer 1:100-Verdünnung mit SM-Puffer + 200 µl Bakterien

1 µl der 1:100- Verdünnung mit SM-Puffer + 200 µl Bakterien

Bakterien und Phagen wurden 15 Minuten bei 37° C im Wasserbad vorinkubiert, in jeweils 4 ml SM-Top-Agar (50° C) gegeben, gemischt und ausplattiert (Platten: LB + 10 mM MgSO₄).

Die Inkubation erfolgte im Wärmeschrank bei 37° C über Nacht. Plattiert wurden je eine Verdünnungsreihe mit 1 µl, 10 µl (einer 1:100 Verdünnung) und 1 µl (einer 1:100 Verdünnung). Die Plaques konnten dann zur Titerbestimmung ausgezählt werden.

2.2.5.6 Plattierung der genomischen *etl-m15* Banken

Jeweils 50000 plaque forming units (pfu) wurden zusammen mit 600 µl frisch angezogenen Bakterien für 15 min bei 37°C vorinkubiert, zu 9 ml Top-Agar gegeben und auf große Platten (132 mm) ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C im Wärmeschrank inkubiert. Am nächsten Tag wurden Phagenlifts mit Nitrozellulosefiltern (s. 2.2.5.7) durchgeführt, die Filter prähybridisiert und anschließend hybridisiert (Sonde: *Etched1* cDNA). Nach erfolgter Hybridisierung wurden die Filter gewaschen (s. 2.2.5.8) und nach Exposition über Nacht konnten positive Plaques mittels Röntgenfilm nachgewiesen werden. Diese Plaques konnten mit Pasteurpipetten für die zweite Runde ausgestochen werden.

2. Runde: Plaques die in der 1. Runde des Screenings mit der Sonde hybridisiert hatten wurden mit einer Pasteurpipette aus der Platte ausgestochen und in 1 ml SM- Puffer mit 20 µl Chloroform ü.N. im Kühlschrank eluiert. Diese Phagensuspensionen wurden 1:200 verdünnt und 1 µl davon mit 200 µl Bakteriensuspension (s. 2.2.4.2) bei 37°C für 15 min vorinkubiert, zu 4 ml Top-Agar gegeben und auf LB- Medien + 1 mM MgSO₄ (mittelgroße Petrischalen) plattiert.

3. Runde: Alle Plaques die bei der Hybridisierung mit der *Etched1* cDNA Signale zeigten wurden isoliert und eluiert (s. 2. Runde). Je 1 µl einer 1:100- Verdünnung wurde wie vorher plattiert → Abschliessend konnten positive Einzelplaques isoliert und nach der DNA-Präparation aus Lysaten (2.2.6.1-2.2.6.3) analysiert werden.

2.2.5.7 Phagenlifts/Behandlung der Nitrocellulosefilter

Die Nitrocellulosefilter wurden luftblasenfrei und faltenfrei auf den Top-Agar gelegt, beschriftet und ihre Position auf dem Agar markiert. Nach ca. 5-10 Minuten wurden die Filter mit der Phagenseite nach oben, für ca. 4 Minuten auf ein Whatman-Papier, getränkt mit Denaturierungslösung, und für 5-10 Minuten auf ein Whatman-Papier, getränkt mit Neutralisierungslösung, gegeben. Abschließend wurden sie für mindestens 10 Minuten in eine Schale mit 2x SSC gegeben. Danach wurden die Filter zwei Stunden bei 80°C inkubiert. Dann wurden sie für 30-60 Minuten bei 65°C im Wasserbad in 2xSSC/ 0.1% SDS geschüttelt. Anschließend erfolgte eine dreistündige Prähybridisierung (2.2.7.2). Danach konnte die radioaktiv markierte Sonde hinzugegeben werden und die Membranen im Wasserbad bei 65-68°C, ü.N. inkubiert werden.

2.2.5.8 Waschen der Phagenfilter

Nach der Hybridisierung wurde die Hybridisierungslösung von den Phagenfiltern abgegossen. Das Waschen der Phagenfilter erfolgte zuerst mit Waschlösung I (kalt, 2 x kurz) und danach 2 x 30 min mit Waschlösung II bei 65°C. Die Exposition eines Röntgenfilms der Phagenfilter erfolgte ü.N. bei -70°C

2.2.6 Phagen-Lysate zur DNA-Präparation

2.2.6.1 Minilystate

1 µl einer Verdünnung von 1:50 bis 1:200, der in SM-Puffer vorliegenden Phagen wurde zusammen mit 200 µl Bakterien (XL Blue MRA(P2), OD = 1) für 15 min bei 37°C inkubiert und dann zu 5 ml LB + 10 mM MgSO₄ gegeben und ü. N. bei 37°C und 180 rpm geschüttelt. Am nächsten Morgen wurden 50 µl Chloroform zugefügt und die Bakterien nochmals 30 min geschüttelt. Dann wurden die Bakterienzellen abzentrifugiert und der Phagenüberstand auf 2-3 2-Milliliter-Schraubdeckelgefäße verteilt, zum Überstand noch jeweils 50 µl Chloroform zugefügt. Die Lysate wurden bei 4°C gelagert.

2.2.6.2 Midilysate mit dem QIAGEN Lambda Midi Kit

Mittelgroße Lysate aus Bakteriensuspensionen (Midilysate) werden aus Volumina von etwa 50 ml gemacht. Aus Minilysaten wurden, je nach Qualität, 1:1000 bzw. 1:200 Verdünnungen mit SM-Puffer hergestellt. 5 µl davon wurden 15 min mit 250 µl Bakterien (s. Minilysate) bei 37°C inkubiert und anschließend in 50 ml LB + 10 mM MgSO₄ gegeben. Es folgte eine Inkubation ü.N. bei 180 rpm und 37°C. Am nächsten Morgen wurde 500 µl Chloroform zugefügt und nochmal 30 min geschüttelt. Dann wurden die Bakterienzellen abzentrifugiert und der Phagenüberstand mit 100 µl Puffer L1 für 30 min bei 37°C inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe von 10 ml eiskaltem Puffer L2 und eine Inkubation für 1 Stunde auf Eis. Anschließend wurde 30 min bei 3500 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 3 ml des Puffers L3 resuspendiert und zusätzlich zum QIAGEN-Protokoll einem 30minütigen Verdau mit *ProteinaseK* (Endkonz. 0,1–0,2 mg/ml) bei 55°C unterzogen. Nach Zugabe von 3 ml des Puffers L4 und vorsichtigem Mischen wurde 20 min bei 70°C inkubiert und danach auf Eis abgekühlt. Danach wurde 3 ml des Puffers L5 hinzupipettiert, vorsichtig gemischt und bei 4°C und 3500 rpm für 45 min zentrifugiert. Der Überstand wurde dann nochmals 10 min lang zentrifugiert und auf eine mit Puffer QBT (3 ml) äquilibrierte, Säule (QIAGEN-tip 100) gegeben. Die Säule wurde mit 10 ml Puffer QC gewaschen und danach die DNA mit 5 ml Puffer QF eluiert. Die DNA wurde mit einem 0,7fachen Volumen Isopropanol gefällt und bei 4°C und 3500 rpm für 45 min zentrifugiert. Abschließend wurde die Phagen-DNA mit 70%igem Ethanol gewaschen und für 5 min an der Luft getrocknet und in 50 µl H₂O aufgenommen.

2.2.6.3 Großlysate/ Lysate aus Bakteriensuspensionen mit einem Volumen bis zu 2 Litern

Von dem 1:1000 mit SM-Puffer verdünnten Phagen-Minilysat wurden 500 µl mit 2.5 ml XL Blue MRA(P2)-Bakterienzellen gemischt und für 15 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde in 500 ml LB + 10 mM MgSO₄ überimpft und ü.N. bei 37°C und 180 rpm geschüttelt. Am nächsten Morgen wurde das Lysat für 30 min mit Chloroform geschüttelt. Dann wurden 200 µl *DNase* (10 mg/ ml) und 100 µl *RNase* (10 mg/ ml) zugegeben und 1 Std. bei RT inkubiert. Danach wurden 30 g NaCl hinzugegeben und gelöst. Die anschließende Zentrifugation erfolgte für 30 min bei 6000 rpm. Der Überstand wurde durch Miracloth in einen neuen Kolben filtriert, 50 g PEG zugefügt und gelöst. Dann wurde wie vorher zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Das Pellet wurde in 5 ml SM-Puffer resuspendiert und in ein 15 ml-Falconröhrchen überführt. Nach zweimaliger Chloroform-Extraktion wurde zur wässrigen Phase 0,75 g/ml CsCl gegeben und der Brechungsindex auf 1.3815 eingestellt. Die Probe wurde anschließend in ein Ultrazentrifugen- Röhrchen gefüllt und exakt austariert (SM/CsCl). Die Ultrazentrifugation erfolgte im SW-60-Rotor bei 20°C für 20 Stunden bei 33000 rpm. Die Phagenbande wurde am nächsten Tag mit Hilfe einer Pasteurpipette entnommen und in ein Eppendorfgefäß gegeben.

Phagen-DNA-Extraktion:

100 µl Phagen-Lösung wurden mit 900 µl 10 mM Tris pH 7,5 und 20 µl 10% SDS und 50 µl *ProteinaseK* (5 mg/ml) versetzt und bei 37°C für 20 min inkubiert. Nach zweimaliger Phenol/ Chloroform-Extraktion und Chloroform-Extraktion wurde die obere Phase mit dem doppeltem Volumen Ethanol abs. (-20°C) gemischt und für 30 min bei 3500 rpm und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 70% Ethanol gewaschen und nach dem Trocknen in 100 µl TE aufgenommen.

2.2.7 Arbeiten mit radioaktiven Nukleotiden

2.2.7.1 Herstellen radioaktiv markierter Sonden

Präparation der Fragmente zur Sondenherstellung:

Es standen bereits Glycerol-Stocks von Bakterien, die Plasmide mit DNA-Fragmenten für Sonden enthielten, zur Verfügung. Zur Isolation der Fragmente für die Sonden, wurden Glycerolstocks mit sterilen Zahnstochern auf einer Medienplatten ausgestrichen und ü.N. inkubiert. Am folgenden Tag wurden die jeweiligen Einzelkolonien für die Midi-Präparationen in 50 ml LB + 50 µg/ml Kanamycin, oder 40 µg/ml Ampicillin überimpft. Es wurden Midipräparationen der DNA (Gibco-Säulen) gemacht. Die Inserts wurden über einen Verdau mit den entsprechenden Enzymen aus dem Vektor ausgeschnitten und über Elektrophorese eines Agarosegels davon getrennt. Die DNA-Fragmente für die Sonden wurden aus dem Agarosegel ausgeschnitten und mit dem Pharmacia Biotech DNA + Gel Band Purification Kit aufgereinigt, oder wurden mittels einer mit Glaswolle gestopften Pipettenspitze und Phenol/Chloroform-Extraktion aufgereinigt und isoliert.

Für die Markierung einer Sonde wurde die Methode des "random priming" mit dem Prime-It II Labeling-Kit der Firma Stratagene verwendet. DNA (25 ng) wurden in insgesamt 25 µl H₂O mit 10 µl Primer für 7 Minuten bei 94° C im Heizblock denaturiert. Dann wurden 10 µl dCTP und 35 µCi α-³²P dCTP- Nukleotide hinzupipettiert.

Nach mindestens 30-minütiger Inkubation mit Klenow (Exo-)-Polymerase (37° C, Heizblock) wurde das Reaktionsvolumen mit Wasser von 50 µl auf 100 µl erhöht und über eine Sephadexsäule (G-25, 5 Minuten, 2000 rpm) die nicht eingebauten dNTPs abgetrennt. Anschließend konnte der Durchlauf mit den DNA-Sonden in Prähybridisierungslösung gegeben und für Southern- und Northern-Analysen benutzt werden.

2.2.7.2 Prähybridisierung und Hybridisierung

Die Membranen wurden mit 10–20 ml Prähybridisierungslösung 2–4 Stunden lang in Hybridisierungsgefäßen bei 65°C inkubiert. Anschließend wurde die radioaktive Sonde in diese Lösung pipettiert. Die Hybridisierung erfolgte meist bei 65°C über Nacht.

2.2.7.3 Waschen der Membran

Die Hybridisierungslösung wurde entfernt und die Membran zweimal kurz mit Waschlösung I (niedrige Stringenz) bei RT gewaschen. Danach erfolgte für mindestens 20 min eine Behandlung bei 65°C mit Waschlösung II (hohe Stringenz). Die Membran wurde in Polyethylenfolie eingeschweißt und ein Röntgenfilm, je nach Signalstärke 1-14 Tage in einer Röntgenfilmkassette exponiert.

2.2.7.4 Entfernen einer Sonde von einer Membran

Eine bereits hybridisierte Membran kann erneut hybridisiert werden, wenn die alte Sonde vollständig entfernt wird. Dazu wurde eine 0,1%ige SDS- Lösung aufgekocht und die Membran für 30 min bei 80°C darin geschüttelt. Der Waschvorgang wurde wiederholt bis nur noch wenig bzw. keine Hintergrundstrahlung mehr zu messen ist.

2.2.8 Sequenzierung

2.2.8.1 Plasmid-DNA Präparation für Sequenzreaktionen

Die Präparation von Plasmid-DNA erfolgte unter Anwendung des NucleoSpin Kit der Firma Macherey & Nagel. Das Bakterienpellet von ca. 3 Millilitern Übernachtskultur wurde vorsichtig in 250 µl Puffer A1 resuspendiert, danach mit 250 µl Puffer A2 gemischt und bei RT 5 min inkubiert. Dann erfolgte die Zugabe von 300 µl des Puffers A3, ein vorsichtiges Mischen und Inkubation auf Eis für 5 min. Danach wurde für 10 min bei 12000 x g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde auf eine Säule transferiert und 1 min zentrifugiert, der Durchlauf verworfen.

Danach folgten 2 Waschschritte: 1x Waschen mit 0,5 ml Puffer AW, 2x Waschen mit 0,7 ml Puffer A4 (danach wurde jew. 1 min zentrifugiert). Dann wurde die Säule trocken zentrifugiert. Anschließend wurde sie in ein neues Zentrifugengefäß gesteckt und die DNA mit 1x 40 µl und abschließend 20 µl Wasser eluiert.

2.2.8.2 Sequenzreaktion

Die Sequenzierungen erfolgten nicht-radioaktiv nach der Methode von Sanger *et al.* (1977). Bei diesem Kettenabbruch-Verfahren werden zusätzlich zu den normalen Desoxy-Nukleosid-Triphosphaten 2' 3' -Dideoxy-Nukleosid-Triphosphate verwendet. Durch den Einbau der Dideoxynukleotide fehlt die 3' -Hydroxylgruppe für die weitere DNA-Strangsynthese. Es kommt zum Kettenabbruch. Das Konzentrationsverhältnis von normalen Desoxynukleotiden zu Dideoxynukleotiden wird so gewählt, daß diese Nukleotide an verschiedenen Positionen eingebaut werden können. Dadurch werden unterschiedlich lange Fragmente erzeugt.

Mit Hilfe von markierten Primern bzw. Dideoxynukleotiden kann die Sequenz durch eine gelelektrophoretische Trennung in hochauflösenden Polyacrylamid-Sequenzgelen aus diesen direkt abgelesen werden.

Sequenzreaktion mit Dye-Terminatoren (ABI PRIMTMDYE Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit)

Big Dye Terminator Mix	4 µl
Half-Therm-Puffer	6 µl
Template DNA	500 ng
Primer (10 µM)	1,5 µl
DMSO (bei Bedarf)	(1 µl)
H ₂ O ad	20 µl

Der Ansatz wurde anschließend mit Mineralöl überschichtet und eine PCR durchgeführt.

Sequenz-PCR-Bedingungen:

Temp [°C]	Zeit	Anzahl der Zyklen
96	4 min	
96	30 s	}
50	15 s	}25
60	30 s	}
4	•	

Nach der PCR wurde das Öl abpipettiert und die Sequenzprobe mit 2 µl 3 M NaAc pH 4,6 und 50 µl Ethanol gefällt. Dazu wurde die Probe in der Laborzentrifuge bei RT 30 min zentrifugiert. Der Überstand wurde mit einer ausgezogenen Glaspipette möglichst gründlich entfernt und das Pellet nachfolgend mit 250 µl 70%igem Ethanol gewaschen. Hierbei wurde das Eppendorfgefäß kurz durchgemixt und anschließend nochmals 15 min zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Pellet kurz getrocknet. Bis zum Gellauf wurden die Proben bei -20°C gelagert. Die Sequenzierungsprodukte wurden 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).

2.2.9 PAM/ Fluoreszenzmessungen

Bestimmung der Chlorophyllfluoreszenz als Parameter für die Aktivität des Photosystems II. Die zu messenden Pflanzen der Wildtyp-Linien (LC, A188, Pa91, H99, A188xB73), der Linie *et1-ref* und transgene Pflanzen (pAct*Etched1*-Sense, siehe 2.2.10.1) wurden 30 Minuten im Dunkeln inkubiert. Unter diesen Bedingungen werden die Reaktionszentren des Photosystems II in den oxidierten Zustand überführt. Mit gepulstem 1,6 kHz Schwachlicht wurde eine Grundfluoreszenz F_0 erzeugt. Durch Auslösung eines sättigenden Weißlichtpulses von 1 s Dauer konnten alle vorhandenen PSII- Reaktionszentren reduziert und die maximale Fluoreszenz F_m induziert werden. Der Quotient $(F_m - F_0) \div F_m$ dient als Maß für die Quantenausbeute der an der photochemischen Reaktion beteiligten aktiven PSII- Reaktionszentren. $F_m - F_0$ wird auch als variable Fluoreszenz F_v bezeichnet (Humbeck *et al.*, 1994). Die Messung der Chlorophyllfluoreszenz wurde mittels eines PAM (Puls-Amplituden-Modulation) Fluorometer durchgeführt. Dafür wurden Körner verschiedener Wildtyp Linien , transgene *Etched1*-Sense Körner und *et-1R*-Körner genommen und als neun Tage alte Sämlinge vermessen und die variable Fluoreszenz des 1., 2. und manchmal 3. jungen Blattes bestimmt. Gemessen wurden je 9 Pflanzen von LC und *et1-R* und bis zu fünf Pflanzen von A88xB73, A188, Pa91, H99 und transgenen *Etched1*-Sense Pflanzen.

2.2.10 Biolistische Transformation

2.2.10.1 Herstellung/Klonierung von Sense- und Antisense-*Etched1* Actin-Konstrukten

Das pAct*Et1*-Sense Konstrukt war bereits von Dr. da Costa e Silva hergestellt worden. Zur Herstellung eines Antisense Konstruktes zur Transformation/Herstellung transgener Antisense Pflanzen, mußte der Vektor pAct1.cas (McElroy *et al.*, 1991) mit den Enzymen *Sall* und *XbaI* geschnitten werden. Das *Etched1*(c9.1) cDNA-Fragment, *EcoRI* / *XhoI* kloniert in pBlueskriptSK, mußte mit den Enzymen *XbaI* und *XhoI* geschnitten werden.

Der geschnittene Vektor pAct1.cas und das *Etched1* Fragment konnten über ein Agarosegel isoliert werden und wurden zur Herstellung der Antisense-Kassette zusammenligiert. Danach erfolgte die Transformation in XL1-Blue Zellen und eine Maxipräparation der fertigen pAct*Et1*-Antisense-Kassette.

Diese Ligation ist möglich, weil *Sall* und *XhoI* Schnittstellen mit demselben Überhang besitzen.

Sall G/TCGAC *XhoI* C/TCGAG
 C AGCT/G G AGCT/C

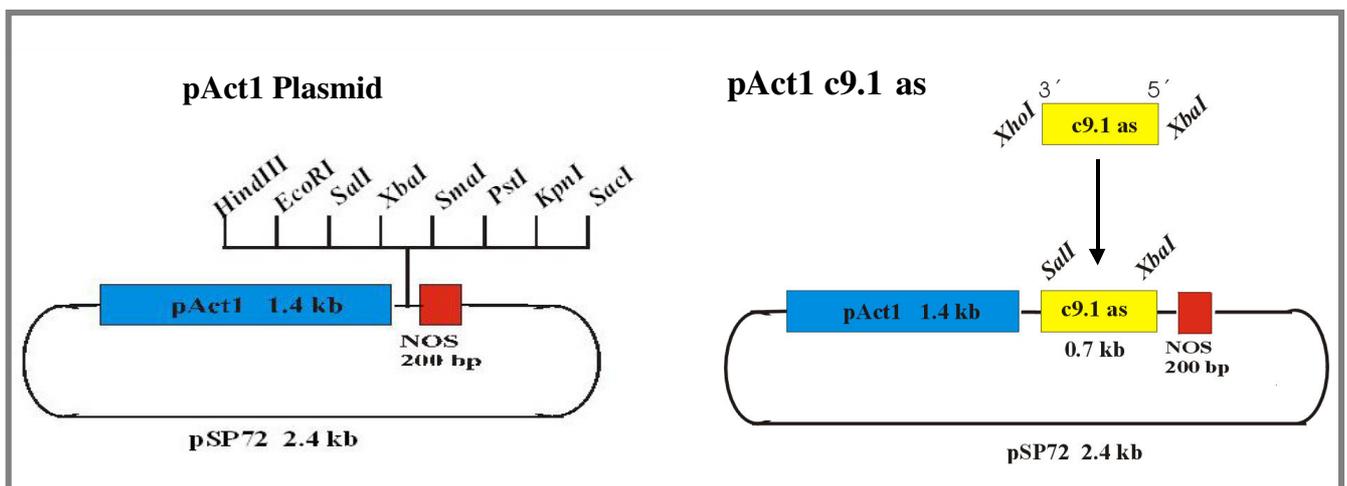


Abbildung 9 pAct1-Plasmid mit multiple Klonierungs-Stellen / Herstellung des *Etched1* pAct1*Et1*-Antisense-Konstrukts durch Klonierung eines *XhoI/XbaI Etched1*cDNA-Fragments in antisense Orientierung in den *Sall* / *XhoI* geschnittenen Vektor pAct1.

2.2.10.2 Herstellung transgener Pflanzen

Zur Herstellung transgener Pflanzen wurden Maiskolben, meist aus Kreuzungen A188 x H99 oder den Linien Pa 91 bzw. A188, 10 bis 12 Tage nach Pollination (DAP) geerntet und für 4-7 Tage bei 4°C gelagert. Die Körner wurden aus dem Kolben gelöst und mit 1 % Natriumhypochloridlösung oberflächensterilisiert. Nach dreimaligem Spülen mit sterilem H₂O wurden die unreifen Embryonen isoliert und zur Kallusinduktion auf N6.1.100.25-Festmedium (Songstad *et al.*, 1992) mit 2.4.D (2,4-Dichlorphenoxyessigsäure) transferiert. Nach 6-10 Tagen Kallusinduktion, im Dunkeln bei 26 °C, wurden die Kalli 4 Stunden vor dem Beschuß auf dem hochosmolaren Medium N6₉₀₀ vorinkubiert.

Die Transformationsansätze für die Partikelkanone wurden unter Verwendung unterschiedlich großer Goldpartikel (0,4-0,8 und 1,2 µm) mit bis zu drei verschiedenen Plasmiden durchgeführt. Dabei wurde das pAct*EtI*-Sense Plasmid oder pAct*EtI*-Antisense Plasmid zusammen mit dem 35S pat Plasmid verwendet. Um die Transformationseffizienz optisch analysieren zu können, wurde auch in einigen Experimenten ein 35S GFP-Plasmid eingesetzt. Die Bindung der Plasmid DNA an die Goldpartikel erfolgte durch Präzipitation der DNA zusammen mit den Goldpartikeln. Der Fällungsansatz wurde folgendermaßen durchgeführt: In einem Eppendorfgefäß wurden zu 50 µl Goldsuspension (40 mg/ml /Biorad) je 2,5 µg der entsprechenden einzusetzenden Plasmide hinzupipettiert. Danach wurde der Ansatz für ca. 30 sek gemischt (Vortex). Dann wurden 50 µl Kalziumchlorid (2,5 M) und 20 µl Spermidin (0,1 M) im Deckel des Reaktionsgefäßes gemischt, das Reaktionsgefäß sofort mit geschlossenem Deckel invertiert und anschließend gevortext. Für 20 bis 30 sek wurde der Ansatz bei 13000 rpm pellettiert und der Überstand abgenommen. Mit 250 µl Ethanol abs. wurde nochmals gut gemischt und wie vorher pellettiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet in 240 µl Ethanol, im Ultraschallbad, für maximal 3 sek, resuspendiert und auf Eis aufbewahrt. Von dieser Suspension wurden je 5 µl auf einen Makrocarrier gegeben und getrocknet. Der Beschuß mit den Goldpartikeln erfolgte bei einem Druck von 1350 psi. Die Position für die Petrischale war der Einschub 4, für die Makrocarrier Einschub 2. Nach dem Beschuß mit dem Transformationsmix wurden die Kalli noch mal 20 Stunden, bei 26 °C auf dem Medium belassen, um dann für 10-14 Tage wieder auf normalem Kallusinduktionsmedium weiter zu wachsen. Danach erfolgten noch mal zwei vierzehntägige Subkultivierungsintervalle auf Kallusinduktionsmedien + Basta Selektion.

Zur Induktion der somatischen Embryogenese wurden die Kalli auf MS-Festmedium (Murashige & Skoog, 1962) ohne 2,4-D transferiert und bei 26 °C im Dunkeln für 7- 10 Tage kultiviert. Zur anschließenden Regeneration von Pflanzen wurden die Kalli mit gut sichtbaren somatischen Embryonen in der Phytokammer (16 h Licht bei 24 °C und 8 h Dunkel bei 16 °C kultiviert, bis sich die somatischen Embryonen zu kleinen Keimlingen mit Spross und Wurzel entwickelt hatten. Die Keimlinge wurden vom Kallusgewebe getrennt und in Magenta-Dosen mit 1/2 MS-Festmedium ohne 2,4-D, bis zum Transfer in das Gewächshaus, weiterkultiviert. Die Selektion der transgenen Pflanzen erfolgte über das mehrmalige Besprühen mit Basta, da parallel auch mit 35Spat transformiert wurde. Vom Pflanzenmaterial der resistenten Pflanzen wurde DNA und RNA isoliert und sowohl Southern- als auch Northern-Experimente durchgeführt.

2.2.11 *In situ* Hybridisierung von Gewebeschnitten

2.2.11.1 Fixierung/Einbettung des Pflanzenmaterials

Für die Fixierung und Einbettung des Pflanzenmaterials, in diesem Fall Körner und Blätter, wurden Lösungen benutzt, die mit DEPC behandeltem H₂O angesetzt wurden. Die Einbettung in BMM (Butyl-Methyl-metacrylat) erfolgte weitgehend nach dem Protokoll von Gubler *et al.* (1989). Das Material wurde bei RT zunächst in 4% Paraformaldehyd in PBS-Puffer (130 mM NaCl; 10 mM NaPO₄-Puffer, pH 6,4; 0,27 mM KCl) mit dreimaliger Vakuum-Infiltration (jeweils 20 min) für insgesamt 2 h fixiert. Anschließend wurde das Material viermal für jeweils 30 min in PBS-Puffer gewaschen. Es folgten Dehydrierungsschritte in 10%, 30% und 50% EtOH für jeweils 30 min bei RT und eine Inkubation in 70% EtOH ü.N. bei 4°C.

Die Dehydrierung wurde mit 90%, 96% und 3 x 100% EtOH für jeweils 1 h bei RT fortgesetzt. Die Infiltration mit BMM-Lösung (40 ml Butyl-metacrylat, 10 ml Methyl-metacrylat, 250 mg Ethylbenzoin, 10 mM DTT) erfolgte in den Mischungsverhältnissen von 5:1; 3:1; 1:1,1:3 EtOH : BMM für jeweils 2 h bei RT. Über Nacht erfolgte eine Infiltration mit 100% BMM. Anschließend wurde das Material, unter Verwendung von frisch angesetzter BMM-Lösung, in Beem[®]-Kapseln (Plano) überführt. Zur Polymerisierung wurde das Material bei -20 °C mit UV-Licht (8W, ±15 cm Abstand) für 48 h bestrahlt. 8 bis 10 µm-Schnitte der Gewebe wurden auf Super-Frost-Plus[®] beschichteten Objektträgern (Menzel) überführt und bei 65 °C auf einer Heizplatte vollständig getrocknet.

2.2.11.2 Bearbeitung der Schnitte

Die Entfernung des BMM erfolgte durch zweimalige (erst 10, dann 5 min) Inkubation in 100% Aceton und 5 min Aceton : H₂O (1:1). Anschließend wurden die vormals in BMM eingebetteten Gewebeschnitte in H₂O und 0,05 M Tris-HCl, pH 7,6 gewaschen und mit 1 µg/ml *Proteinase K* (Roche) in 0,05 M Tris-HCl, pH 7,6 für 20 min bei 37°C verdaut. Die Reaktion wurde mit kaltem H₂O gestoppt. Die Proben wurden 3x H₂O gewaschen und in 70% und 100% EtOH dehydriert. Die Hybridisierung und die weitere Behandlung der Gewebeschnitte erfolgt wie von Canas *et al.* (1994) beschrieben.

2.2.11.3 Detektion

Die Detektion des DIG-markierten RNA-Sonde/RNA-Komplexes erfolgte mittels Anti-DIG FAB-Antikörper mit alkalischer Phosphataseaktivität und BCIP/NBT Farbreaktion. Im Dunkeln werden 250 µl der Lösung (z.B. für 10 ml: 10 ml Puffer 3 + 45 µl NBT und 35 µl BCIP) aufgetragen, mit einem Deckglas abgedeckt und in eine Glasdose gelegt. Im mit Alufolie umwickelten, feucht gehaltenem Becherglas, wird inkubiert. Die Inkubationszeit ist variabel, und kann durch Aufbewahrung bei 4°C verlängert werden. Ein Reaktionsstopp erfolgt durch Zugabe von Puffer 4 (TE).

2.2.11.4 RNA Sondenherstellung

Die Herstellung der DIG-markierten Sense- und Antisense-Sonden erfolgte mit dem DIG RNA Labeling Kit (SP6/T7) von Boehringer Mannheim. Für die Herstellung der RNA-Sonden in Sense- und Antisense-Orientierung wurde die gesamte cDNA(c9.1), bereits kloniert in pBlueskript (Stratagene), benutzt. Die Plasmid-DNA wurde für die Sense-Sonde (T3-Primer) mit *XhoI* und für die Antisense-Sonde (T7-Primer) mit *EcoRI* (Enzyme GibcoBRL) linearisiert. Gemäß dem Protokoll wurden dann je 1 µg linearisierte DNA und 2 µl NTP-labeling Mix (Roche), 40 U T3- bzw. T7-Polymerase (Roche), 20 U RNaseOUT (GibcoBRL) und 2 µl Transkriptionspuffer auf 20 µl Gesamtvolumen mit H₂O (RNasefrei) aufgefüllt und 3-4 h bei 37 °C inkubiert. Danach folgt ein DNase-Verdau (15 min bei 37 °C mit 20 U DNase (GibcoBRL)), der durch Zugabe von 1 µl 0,5 M EDTA gestoppt wurde.

Je ein Aliquot der Sense- und Antisense-Sonde wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und die Konzentration mittels *SmartLadder* (Eurogentec) bestimmt. Danach wurden die Sonden aliquotiert.

2.2.12 Isolierung von Plastiden

Nach Gruissem *et al.* (1986):

Die im folgenden beschriebene Isolierung der Plastiden erfolgte im Kühlraum mit auf Eis vorgekühlten Gefäßen und Lösungen. 15 g Blattmaterial wurden in ca. 60 ml 1x GM-Puffer mit Hilfe eines Mixers homogenisiert. Der Mixer wurde dazu einmal 4 sek bei niedriger Geschwindigkeit und dreimal je 2 sek bei hoher Geschwindigkeit eingesetzt.

Das Blatthomogenat wurde dann durch 4 Lagen Miracloth filtriert, wobei der Rückstand vorsichtig ausgepresst wurde. Das Filtrat wurde auf zwei gewässerte Oakridge-Röhrchen verteilt und die Plastiden durch 30 sek Zentrifugation (t beginnt beim Erreichen der Drehzahl) bei 2800 g (3600 rpm Heraeus-Zentrifuge) und 4°C pelletiert. Die Überstände wurden dekantiert und verworfen und die Pellets in insgesamt 2 ml 1x GM-Puffer mittels eines feinen Haarpinsels (vorher in GM-Puffer gespült) resuspendiert. Zur Herstellung eines Dichtestufengradienten wurden pro 15 ml Corex-Röhrchen 4 ml 94%ige Percoll-Lösung mit 6 ml der 40%igen überschichtet und mit 2 ml Probensuspension versetzt. Nach 15 minütiger Zentrifugation bei 5300g in einem Ausschwingrotor (HB-6 Sorvall) in der Kühlzentrifuge bei 4°C konnten die intakten Plastiden an der Phasengrenze mit einer Pipette entnommen werden. Danach war eine Untersuchung unter dem Mikroskop möglich. Die intakten Plastiden wurden mit dem mindestens 2 fachen Volumen an GM-Puffer versetzt. Nach einminütiger Zentrifugation bei 5300 g wurden die Plastidenpellets mittels des Pinsels in ca 1,5 ml GM-Puffer resuspendiert.

2.2.13 *In vitro* Transkription/ Translation von LC und *Zmzr1* cDNAs

Für die *in vitro* Transkription der LC cDNA und der *Zmzr1* cDNA wurden Glycerolstocks fertiger Plasmide (pBAT LC, pBAT*Zmzr1*) von Garg (Hamburg) zur Verfügung gestellt. Das Plasmid zur Transkription des hinteren cDNA Bereiches ohne Transitsequenz wurden über PCR mittels modifizierter Primer hergestellt.

Primerauswahl zur Klonierung von pBAT LCo.S.(ohne Transitsequenz)

Über den 5' Primer wurde eine neue *EcoRI* Schnittstelle und ein Startcodon eingefügt. Der 3' Reverse Primer setzt innerhalb der multiple cloning site an und enthält unter anderem eine *BamHI*- Schnittstelle.

```

5' Primer          5' GCT TCC GAA TTC GGC ATG GCC AAT TCG GAC 3'
3' Reverse Primer 5' GGT GGC GGC CGC TCT AGA ATT AGT GGA TCC 3'
                  3' GGA TCC ACT AAT TCT AGA GCG GCC GCC ACC 5'

```

2.2.13.1 PCR zur Herstellung einer am 5' Ende verkürzten *LCEt1* cDNA

Die PCR wurde folgendermaßen durchgeführt:

0,5 µl pBATc9.1 (~100 ng)
 5,0 µl Komplett Puffer
 38 µl H₂O
 1,0 µl DMSO
 1,5 µl dNTP-Mix
 1,5 µl Forward Primer (10 pM)
 1,5 µl Reverse Primer (10 pM)
 1,0 µl Taq Polymerase

Bedingungen:

96°C, 2 min	Denaturierung	
96°C, 45 sec.	Denaturierung	
64°C, 45 sec.	Annealing der Primer	25 Zyklen
72°C, 2 min	Auffüllreaktion	
72°C, 10 min.	Abschluß	
4°C, endlos		

Das PCR Produkt wurde über ein Agarosegel isoliert, die Konzentration bestimmt und in den TOPO Vektor kloniert (s. TOPO-Klonierung 2.2.1.13). Nach der Transformation wurden die Bakterien auf Ampicillinplatten ausplattiert und über Nacht wachsen gelassen. Am nächsten Nachmittag wurden von den Platten 5 ml-Kulturen für Minipräparationen angeimpft. Diese wurden mittels TELT-Methode (2.2.1.2) bearbeitet und ein Plasmid-Aliquot einer jeden Präparation wurde mit dem Enzym *EcoRI* restringiert. Einige dieser Klone, deren Insertgröße stimmte, wurden im größeren Maßstab mit den Enzymen *BamHI/EcoRI* geschnitten und auf ein präparatives Gel aufgetragen. Insert-Fragmente wurden ausgeschnitten, einer zweimaligen Phenol/Chloroform- und Chloroform-Reinigung und einer Fällung mit Ethanol unterzogen. Dann wurden die Pellets mit 70% Ethanol gewaschen und getrocknet und in 50 µl H₂O aufgenommen. Von einigen Klonen mit der passenden Insertgröße wurden Sequenzreaktionen durchgeführt. Mit der Bestätigung der Sequenz konnte die weitere Klonierung erfolgen. Es wurde dann das Insert über die *EcoRI* und *BamHI* Schnittstellen herausgeschnitten, aufgereinigt (Phenol/Chloroform, Fällung etc.) und in den *EcoRI/BamHI* pBAT Vektor ligiert (s. a. Ergebnisse 3.3.1) und in TOP10 Zellen transformiert.

Ligation:

6,5 µl Insert (*BamHI/EcoRI*)

2,0 µl 5x Ligasepuffer

0,5 µl pBAT-Vektor (*BamHI/EcoRI*)

1,0 µl Ligase

Von diesen Klonen wurden wieder Minipräparationen gemacht und mit *EcoRI/BamHI* Restriktionen konnten die Insertgrößen bestimmt werden. Einige Klone mit der „richtigen“ Insertgröße wurden dann mit dem Enzym *XbaI* hinter dem 3' UTR der cDNA linearisiert, die Plasmid-DNA isoliert, aufgereinigt und nach einer Konzentrationsbestimmung für die *in vitro* Transkription verwendet.

2.2.13.2 *In vitro* Transkription

Die *in vitro* Transkription wurde mit den drei Plasmiden pBAT LC, pBAT*Zmzr1* und pBAT LCo.T. durchgeführt. Dazu mussten die Plasmide am 3' Ende des Inserts linearisiert werden. Die LC-Plasmide wurden mit *BamHI* und pBAT*Zmzr1* mit *XbaI* restringiert und eine zweifache Phenol/Chloroform-Reinigung und Ethanolfällung angeschlossen. Danach erfolgte eine Überprüfung der Linearisierung durch Auftragen auf ein Agarosegel. Für die Transkriptionsreaktionen wurden 250-400 ng DNA der verschiedenen Plasmide eingesetzt.

2,0 µl Plasmid
3,1 µl DEPC-H₂O
5,0 µl T3-Transkriptionspuffer
5,0 µl rNTPs (je 5 mM rATP, rUTP, rCTP, 0,5mM rGTP)
1,2 µl Cap Analogon (10 mM)
7,5 µl DTT 0,1 M
0,7 µl RNase-Inhibitor
0,5 µl T3-Polymerase

Die Reaktionsansätze wurden für 30 min bei 37°C inkubiert. Danach wurde jeweils 1 µl 11,25 mM rGTP hinzugegeben und nochmals 30 min inkubiert. Dann erfolgte für 15 min eine Spaltung mit 1 µl *DNaseI*. Dann wurde das Ansatzvolumen mit 75 µl H₂O auf ca. 100 µl erhöht. Davon wurden zur Kontrolle 4 µl auf ein 1%iges Agarosegel (1x MOPS) aufgetragen und auf die Transkriptgröße überprüft. Der Rest der Ansätze wurde mit 5 µl NH₄Ac (4M) und 250 µl EtOH präzipitiert und bis zur *in vitro* Translation bei -20°C eingefroren.

2.2.13.3 *In vitro* Translation

Für die *in vitro* Translationsexperimente, mit dem Rabbit reticulocyte lysate system, der Firma Amersham Pharmacia Biotech, wurden jew. 20 µl der Transkriptionspräzipitate nach kurzem vortexen in Eppendorftubes pipettiert und für 30 min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und die RNA Pellets wurden für 10 min im Abzug getrocknet. Danach wurden die Pellets in 9,5 µl H₂O aufgenommen und zur Auflösung evtl. vorhandener RNA-Sekundärstrukturen für 10 min in einen 67°C Thermomixer gestellt. Dann wurden sie auf Eis gestellt und mit 3,5 µl des Transkriptionsmix gemischt. Im Mix sind jeweils 2 µl Translationspuffer (minus Methionin bzw. minus Cystein), 1 µl Kaliumacetat (2,5 M) und 0,5 µl Magnesiumacetat (25 mM) enthalten. Als Negativkontrolle wurden 9,5 µl nukleasefreies Wasser eingesetzt, während als Positivkontrolle die im Kit enthaltene RNA B diente.

Dafür wurden 0,5- 1 µl RNA B auf ein Volumen von 9,5 µl gebracht (nukleasefreies Wasser). Im Isotopenlabor wurden dann 2 µl der ³⁵S markierten Aminosäure (Methionin bzw. Cystein) und 10 µl Reticulocytenlysats zu jedem Reaktionsansatz luftblasenfrei hinzu pipettiert. Danach erfolgte eine einstündige Inkubation im Heizblock bei 30°C. Danach wurden jew. 3 µl für eine Einbaukontrolle herausgenommen und der Rest bei -20°C eingefroren und später auf 15%ige High-Tris Proteingele aufgetragen.

2.2.13.4 Einbaukontrolle der radioaktiv markierten Aminosäuren

Zur Kontrolle des Einbaus der radioaktiv markierten Aminosäure in das *in vitro* translatierte Protein wurden je 3 µl jedes Ansatzes zu 15 µl Wasser hinzupipettiert und gut gemischt. Dann wurden je 2 x 2µl und 2 x 6µl aus jeder Verdünnung auf ca. 1 cm² große und mit Bleistift beschriftete Whatmanpapierstücke pipettiert und trocken gelassen. Die Papierschnipsel mit den 6 µl wurden dann für 10 min in kochend heißer Trichloressigsäure geschüttelt und anschließend 4 x 4 min unter Schütteln mit Wasser gewaschen. Abschließend wurden die Schnipsel 1 min mit Ethanol gewaschen und dann 20 min getrocknet. Dann wurden sie in Szintillationsröhrchen gelegt, mit 2,5 ml eines Szintillationsmixes versetzt und in den WALLAC WinSpectral™ 1414 Liquid Szintillationscounter gestellt. Dann wurden die Proben gemessen und die Messwerte mittels des Programms Wallac LSC dargestellt.

2.2.14 Fluoreszenzmikroskopische Strukturanalyse von Maiskörnern und transgenem Kallusgewebe

Fluoreszenz:

Fluoreszierende Moleküle absorbieren Licht bei einer bestimmten Wellenlänge und emittieren es bei einer anderen, längeren Wellenlänge

Fluoreszenzmikroskopie:

Das Fluoreszenzmikroskop ähnelt einem normalen Lichtmikroskop. Nur muß das von einer starken Lampe erzeugte Licht durch zwei Filter treten und wird durch einen dichroitischen (d.h. den Strahl teilenden) Spiegel bei 510 nm aufgetrennt. Blaulicht der Wellenlänge zwischen 450 und 490 nm (durch den 1. Filter erzeugt) trifft auf den Spiegel, der das Licht unterhalb 510 nm nach unten zum Objektiv und damit Objekt reflektiert. Licht oberhalb der Grenze von 510 nm geht unreflektiert durch den Spiegel hindurch.

Die Emissionswellenlänge des fluoreszierenden Objektes ist aufgrund der an die Umgebung abgegebenen Schwingungsenergie immer größer als die Wellenlänge mit der angeregt wird. Daher kann das Licht dieser Wellenlänge durch den Teilerspiegel hindurchtreten und wird über den zweiten Filter (Langpass: WL >515 nm) zum Okular d.h. dem Betrachter gelenkt. Es müssen Linsen mit hoher numerischer Apertur verwendet werden, da bei einer gegebenen Vergrößerung die Helligkeit des fluoreszierenden Bildes proportional zur vierten Potenz der Apertur ist.

Für die Präparation von Maiskörnern wurden diese 18 bzw. 22 Stunden mit feuchtem Papier (fungizidhaltige Lsg.) in einer Petrischale bei 30° C eingeweicht und dann mit einer Rasierklinge in sehr schmale Streifen geschnitten. Diese wurden auf einen Objektträger gelegt, mit einem Tropfen Wasser versetzt und mit einem Deckglas bedeckt.

Mit dem 35S-GFP Konstrukt beschossene Kalli wurden nach ein bis zwei Tagen unter dem Mikroskop ausgewertet.

2.2.15 PCR Amplifikation genomischer DNA

Die Analyse weiterer *etched1*-Mutantenlinien und Wildtyplinien wurde mittels PCR durchgeführt. Zur Überprüfung der PCR-Bedingungen wurde als erstes mit einigen genomischen Wildtyp-DNAs eine Gradienten PCR durchgeführt. Mit drei verschiedenen Primerpaaren wurden erst die Annealingtemperaturen 55, 57, 59, 61, 63 und 65°C und in einem zweiten Versuch die Temperaturen 60, 63 und 66°C getestet. Die besten Ergebnisse wurden bei 65°C erzielt. Deshalb wurden alle weiteren PCR mit den genomischen DNA bei der Annealingtemperatur von 65°C durchgeführt.

Die PCR wurden folgendermaßen durchgeführt:

- ~250 ng genomische DNA
- x µl H₂O ad 15 µl
- 2,5 µl dNTP-Mix
- 1,5 µl Forward Primer (10 pM)
- 1,5 µl Reverse Primer (10 pM)
- 2,5 µl 10 x KCl Mix
- 0,2 µl Platinum Taq Polymerase

- 10 x KCl-Mix:
- 500 mM KCl
- 100 mM Tris pH 7,5
- 20 mM MgCl₂
- 30% DMSO

Bedingungen:

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

Dann wurden verschiedene Wildtypenlinien mit den *Etched1*-Primerkombinationen getestet. Danach wurden PCR mit den Primern Exon2 rev, Exon3 rev und Exon4 rev in Kombination mit einem Mutatorprimer durchgeführt. Für die genomischen DNA's von *et1-m4*, *et1-m10* und *et1-m12* konnten PCR Produkte aus der Primerkombination Mu/ Ex4 rev amplifiziert und aus dem Gel ausgeschnitten und isoliert werden.

Diese Fragmente entsprachen in der Größe dem erwarteten Fragment der Linie *et1-m3* (ca.1150 bp), bei der die Sequenz ja bereits bekannt war. Die Insertionspositionen des jeweiligen Mutatorelements dieser drei Linien wären dann im Bereich der Insertionsposition des Mu Elementes bei *et1-m3*! Diese PCR-Fragmente wurden in den TOPO 2.1 Vektor kloniert, in TOP10 Zellen transformiert und plattiert. Am nächsten Tag wurden 5ml-Kulturen für Bakterien-Minipräparationen ü.N. angeimpft. Die Plasmid DNA wurde isoliert und jeweils ein Aliquot mit dem Enzym *EcoRI* restringiert, um die Größe der Inserts zu überprüfen. Außerdem wurden zur Kontrolle der Klone die Agarosegele geblottet und mit der *Etched1* cDNA als Sonde eine Southernanalyse durchgeführt. Mit der DNA dieser positiv getesteten Klone wurden dann Sequenzreaktionen mit den diversen Primern UP, RP, Mu und einigen LC reverse und forward Primern durchgeführt.

2.2.16 Protokoll zur Herstellung von polyklonalen Kaninchen Antikörpern gegen das *Etched1* Protein

Zur Herstellung von polyklonalen Kaninchen Antikörpern gegen ein Epitop des *Etched1* mußte von der Firma BioGenes erst einmal ein Peptid der entsprechenden Region, nach der Signalsequenz, vor dem TFIIS homologen Bereich (hier blau dargestellt) synthetisiert werden.

MTTTAAGHGCCWAGIPPFALLPRILSTGRETPPPRASLVASSSKLRALAP	50
RLRVSNRPRLIVSASSSGEANSDAVPSPTAEAIDIKLPRRSLLVQFTCN	100
ACGERTKRLINRVAYERGTVFLQCAGCQVYHKFVDNLGLVVEYDLREENE	150
LQGENAVDTSSSED	164

Mit diesem Peptid wurden dann von BioGenes zwei Kanichen nach folgendem Protokoll immunisiert:

- 1.Tag Erstimmunisierung
- 8.Tag Boost
- 15. Tag Boost
- 30. Tag Boost
- 37. Tag Bluten/Boost
- 44. Tag Boost
- 72. Tag Ausbluten

Diese Seren (benannt 4206 und 4207) wurden dann zur Detektion der Westernblots (s.2.2.3.2.5) mit verschiedenen Maisgeweben zu verschiedenen Zeitpunkten eingesetzt.

3 Ergebnisse

3.1 *etched1* Mutantanalysen

Man kennt zur Zeit grundsätzlich zwei Gruppen der *etched1* Mutation. Erstens die bereits 1940 (Stadler) beschriebene *et1-ref* Mutante, die aus durch Röntgenstrahlung mutierten Pollenkörnern hervorging und in der das potentielle *Etched1* Gen deletiert ist. Zweitens die bisher 16 bekannten Mutator-induzierten *et1*-Mutantenlinien, die durch die Insertion unterschiedlicher Mutatorelemente, entstanden. Die *etched1*-Mutantenlinien entstanden durch die Kreuzung einer Standardlinie mit einer Linie die ein aktives Mutatorelement enthielt. Nur die Linien *et1-m15* und *et1m16* wurden im Unterschied zu den Standardkreuzungen durch die Kreuzung mit der Linie *et1-ref* (direktes Transposon Tagging) hergestellt. Ziel dieser Arbeit war es herauszufinden, ob und an welcher Position des *Etched1* Gens die Insertion eines Mutatorelements in den verschiedenen Linien erfolgt war.

3.1.1 Analyse von *et1-m15* Klonen aus genomischen Banken

Bei einem direkten Transposon-Tagging-Experiment wurden Linien mit einem aktiven Mutatorelement mit der Linie *et1-ref* gekreuzt. Bei diesem Experiment wurden an einem Kolben zwei nebeneinander liegende Körner mit *etched1* Phänotyp gefunden, die als *et1m-15* Mutanten bezeichnet wurden. Möglicherweise sind aufgrund der nebeneinander liegenden Positionen beide Körner das Resultat desselben Transpositionsereignisses. Durch dieses Kreuzungsexperiment können in der F1-Generation Linien mit *et1*-Phänotyp erhalten werden, wenn zufällig durch Transposon-Insertion das *Etched1* Gen mutiert wird und deshalb eine homozygot rezessive Situation bezüglich der Mutation entsteht. Die beiden Körner wurden unter den Gewächshausnummern 1438 und 1439 ausgepflanzt und geselbstet. Diese geselbsteten Körner wurden mit den Nummern 1738 (aus Linie 1438) und 1739 (aus Linie 1439) wieder ausgepflanzt. Aus DNA von jeweils vereinigttem Blattmaterial der Linien 1738 und 1739 erfolgte die Herstellung zweier genomischer Lambda Banken (siehe 2.2.5.1ff). Die Isolierung von *et1-m15* Klonen erfolgte über ein Screening der Phagen-Bank mit der *Etched1*-Wildtyp cDNA-Sonde. Phagen-DNA positiver Plaques wurde aus Mini- und Midilysaten (s. 2.2.6.1, 2.2.6.2) isoliert. Die Klone, die aus der genomischen Bank der Linie 1738 isoliert wurden, waren: 5.1.1, 5.1.2, 5.1.2B, 5.1.3. Die isolierten Klone der Linie 1739 wurden mit 3.1.2, 3.2.1, 5.1.1, 9.1.1, 9.1.2, 9.1.2B, 10.1.1 und 10.1.2 bezeichnet.

Zur weiteren Analyse wurden die genomischen DNA-Klone dann mit den Enzymen *XbaI*, *XbaI / XhoI*, und *XbaI / HindIII* restringiert. Mit den Enzymen *XbaI* und *XhoI* können die λ -Phagenarme abgeschnitten werden. In Southernblots (2.2.7ff) mit der *EtI* cDNA Sonde und einer Mu-Sonde konnte die Hybridisierung der selben Fragmente gezeigt werden (s. Abb. 10, nächste Seite).

Sowohl die der cDNA entsprechenden *EtchedI*-Sequenzen als auch Sequenzen der Mutatorelemente sind in diesen Fragmenten zu finden.

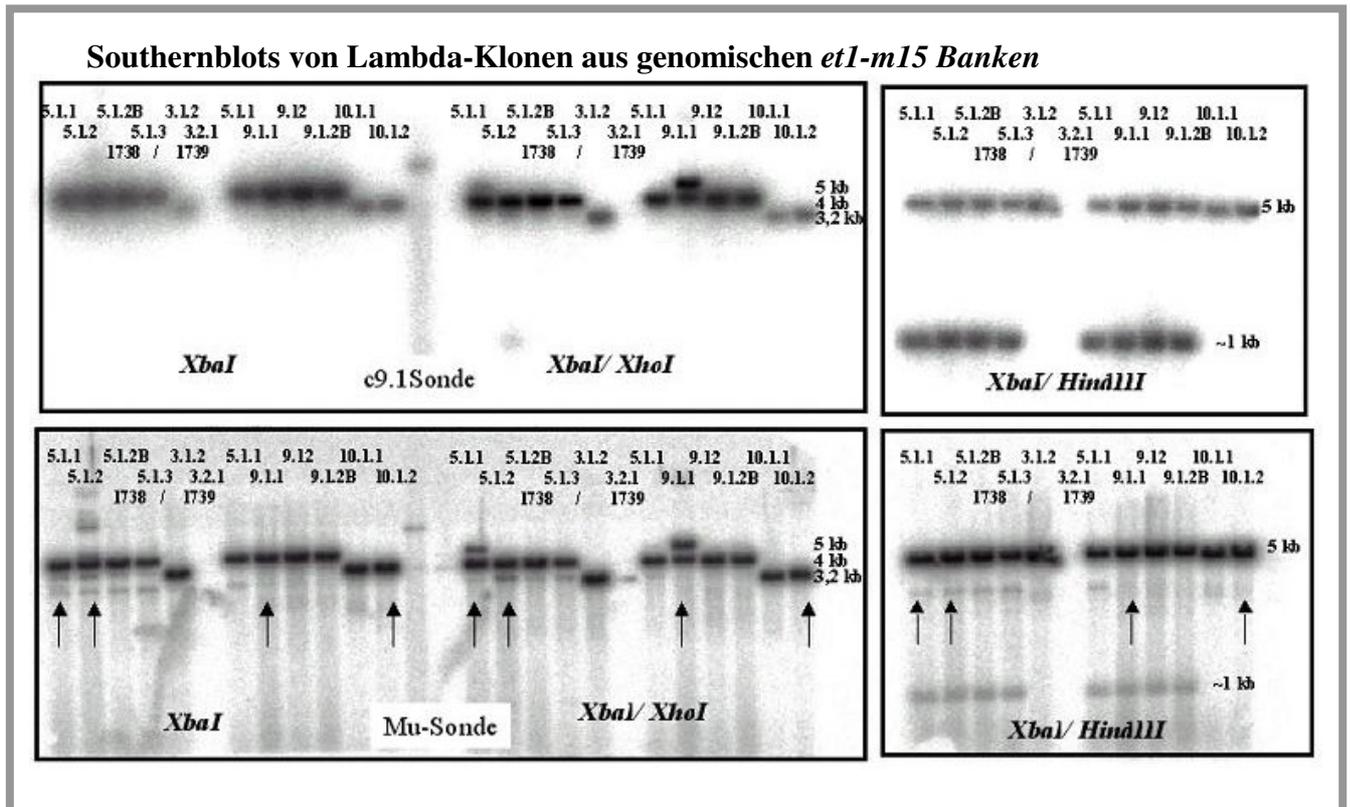


Abbildung 10 Southernblot der verschiedenen Lambda-Klone der *etI-m15* genomischen Banken aus den Linien 1738 und 1739, restringiert mit verschiedenen Enzymen, und hybridisiert mit der *EtchedI* cDNA (oben) und einer Mutator-Sonde (unten). Die Pfeile zeigen die Lambda-Klone, die später weiter bearbeitet wurden.

Vier Klone wurden weiterbearbeitet, 5.1.1 und 5.1.2 der Linie 1738 und 9.1.1 und 10.1.2 der Linie 1739. Aus präparativen Ansätzen wurden die 5 bis 6 kb großen *XbaI*- Fragmente isoliert, in den Vektor pZErO ligiert und mit verschiedenen, *EtI*(LC) cDNA Primern (*EtchedI*: ET1, ET2, ET10, ET11, ET13, ET16 und UP, RP, Mu-SEL (s. auch 3.1.2 Abb. 12 und Anhang 7.1 und 7.2)) sequenziert. Da diese Sequenzen noch nicht ausreichend gut lesbar waren, wurden mit dem Enzym *NsiI* kleinere Subfragmente aus dem Insert der Phagenklone herausgeschnitten und in den *NsiI* geschnittenen Vektor pZErO subkloniert. Danach wurden Plasmid Minipräparationen (s. 2.2.1.2) gemacht und die Klone mit dem verkürzten Insert wurden ebenfalls mit den bereits erwähnten Primern sequenziert.

Die Sequenzanalyse der Klone ergab folgendes:

Es ist ein Mutatorelement in den *Etched1* Genbereich der beiden *et1-m15* Linien inseriert. Beide *et1-m15* Linien zeigen die gleiche Insertionsposition des Mu-Elementes 9 Basenpaare vor dem Startcodon des *Etched1* Gens. In beiden Fällen handelt es sich um das Mutatorelement Mu8. Die Insertionsrichtung des Mutatorelementes ist in beiden *et1-m15* Linien 3'-5'. Die Insertionsstelle des Mutatorelements (Mu8) in beiden *et1-m15* Linien ist exakt die gleiche, wie in der, bereits von O. da Costa é Silva, untersuchten Linie *et1-m3*. Auch die Orientierung des Mutatorelements der *et1-m15* Linien stimmt mit der Orientierung des Mu8-Elements in der Linie *et1-m3* überein. Die Insertionsstelle des Mutatorelementes im putativen *Etched1* Gen der Linie *et1-m3* konnte durch die Isolierung genomischer Lambda-Klone aus einer genomischen Bank der Linie *et1-m3/Wt*, und die anschließende Sequenzierung der Klone bestimmt werden, da sowohl Wildtyp- als auch Mutatorallele des *Etched1*-Gens kloniert wurden (da Costa é Silva, unveröffentlicht). Die Isolierung der Lambda-Klone erfolgte durch Hybridisierung der Phagenfilter mit einem Fragment, das in einer AIMS Analyse mit der Mutation kosegregierte.

Es scheint zunächst sehr unwahrscheinlich, daß bei zwei unabhängigen Transpositions-Ereignissen, bei beiden *et1-m15* Linien und bei der *et1-m3* Linie, die Insertion transponierbarer Elemente direkt innerhalb der gleichen Nukleotidsequenz erfolgt. Außerdem ist auch noch das selbe Mutatorelement (Mu8) in gleicher Orientierung in allen drei Linien inseriert. Es ist inzwischen jedoch bekannt, daß die Insertion von Mutatorelementen durchaus „gerichteter“ verlaufen kann. Die Analyse von Mutantenlinien des *glossy 8* Gens zeigt, daß Mutatorelemente bevorzugt in den 5'UTR des Gens inserierten (Dietrich *et al.*, 2002).

In der folgenden Abbildung (11) ist eine Sequenz der Linie *et1-m15* gezeigt. Außerdem ist die Sequenz des Mutatorelementes Mu8 gezeigt und die Sequenz der *Etched1* cDNA.

Mu8 (3' -5') :	GCCTGCCGAGAGATAATTGCCATTATAGACGAAGAGCGGACGGGATTTCGA	50
Mu8 :	CGAAATGGAGGCGATGGCGTTGGCTTCTGTCTGGAGACGCAGGCGAC	100
Mu8 :	AGCCAAACGCCAAAACGGAAAAGACAGCGCTTGGAGCTGCGTAAACAG	150
Mu8 :	GTATTAGTCTCCTGTCCCGTTTACCGTTTCGTCTGCGCAGACGCTGCCCT	200
Mu8 :	AGCCGCCGTTTTTCGTTCATGCTCTCGTGTTCATGCTCTCGGGGTGACA	250
Mu8 :	TTGCACCAGCACGGCGCAGCGCCAGGCCCTCCAGCGCCGCAACTCCGTC	300
Mu8 :	AGCTCGCCCATCATGACGCGCAACTCCTCTACGGCGCTCCCCCTACTCC	350
Mu8 :	CGCCGCTCTCCGACTTCTCCACCTCCGACTTACCCTCTCCATCCACGA	400
Mu8 :	CCCCACCACCACCACCGGACCATGGCCGACAAGCAGCTGGCGTTCCGCG	450
Mu8 :	CCGGCGCCAGCTCCTTCTGCGCTCGCCAGGATGAACTCGCCCGAGTGG	500
Mu8 :	GCCTACGCGCTCGCCGGCTCCATGGTCCGCGGCTCCTTCAGCGCCATCTT	550
Mu8 :	CGCCTACATCCTCAGCGCCGTGCTCAGCGTGTACTACGCGCCGGACCCGC	600
Mu8 :	GGTACATGAAGCGCGAGATCGCCAAATACTGCTACCTGCTCATCGGCATG	650
Mu8 :	TCCTCGCGCGCTGCTGTTCAACACGGTGCAGCACGTGTTCTGGGACACGG	700
Mu8 :	TGGGCGAGAACCTGACCAAGCGGGTGCAGGAGAAGATGTTTCGACGCCGTG	750
Mu8 :	CTCCGCAACGAGATCGCCTGGTTCGACACGGACGAGAACGCCAGCGCGCG	800
Mu8 :	CGTGGCGCCAGGCTCGCGCTGGACGCCAGAACGTGCCGTCCGCCATCGG	850
Mu8 :	GGACCGCATCTCCGTCATCGTCCAGAACTCGGCGCTGATGCTGGTGGCCT	900
Mu8 :	GACACCGCGGGTTCGTCCTCCAGTGCCTCGCGCTCGTCTCCTCGCC	950
Mu8 :	GTGTCCCGCTCGTGGGCGCCACCGTGTGCAGAAGATGTTTCATGAA	1000
Mu8 :	GGGCTTCTCGGGGACCTGGAGCCGCGCACGCCAGGGCCACGCAGATCG	1050
Mu8 :	CGGGCGAGCCGTGGCCAACTGCGCACCGTGGCGGCTTCAACGCGAGCGC	1100
Mu8 :	AAGATCACGGGGCTGTTTCGAGGCCAACCTGCGCGGCCCGCTCCGGCGCTG	1150
et1M15 :	CCGCTCCGGCGCTG	
Mu8 :	CTTGTGTCAAACAGGTATTGCGAGCAGGCCGACCCCGAGAGCAGCCGCA	1200
et1M15 :	CTTGTGTCAAACAGGTATTGCGAGCAGGCCGACCCCGAGAGCAGCCGCA	
Mu8 :	AGAAGAGACGGCGTAGAGAGGAGTATGCCAGACGGCGTCTGCGCAGGCGA	1250
et1M15 :	AGAAGAGACGGCGTAGAGAGGAGTATGCCAGACGGCGTCTGCGCAGGCGA	
Mu8 :	ACGGTAAACGGGGACAGGAGACTAATACCTGTTTACACAGCTCCAAGCGC	1300
et1M15 :	ACGGTAAACGGGGACAGGAGACTAATACCTGTTTACACAGCTCCAAGCGC	
Mu8 :	TGTCCTCTTTCCGTTTTGGCGTTTTGGCTGTCGTCTGCGTTTTCCAGAACAG	1350
et1M15 :	TGTCCTCTTTCCGTTTTGGCGTTTTGGCTGTCGTCTGCGTTTTCCAGAACAG	
Mu8 :	AGAAGCCAACGCCATCGCCTCCATTTCGTGCAATCCCGTCCGCTCTTCGT	1400
et1M15 :	AGAAGCCAACGCCATCGCCTCCATTTCGTGCAATCCCGTCCGCTCTTCGT	
Mu8 :	CTATAATGACAATTATCTCGCCTGCCG	1428
et1M15 :	CTATAATGACAATTATCTC <u>CTGACAGGC</u> AAAGCGGCTATGACGACAACGG	1450
LC cDNA :	CGTTGTCTGACAGGCAAAGCGGCTATGACGAGAACGG	
et1M15 :	CCGCCGGGTACGGCTGCTGCTGGGCGGGGATTCCGCCCTTCGCGTTGTTG	1500
LC cDNA :	CCGCCGGGCACGGCTGCTGCTGGGCGGGGATTCCGCCCTTCGCGTTGTTG	
et1M15 :	CCGCGGATTCTCTCGACCCGCCGGGAGACTC	1550
LC cDNA :	CCGCGGATTCTCTCGACCCGCCGGGAGACTCCTCCTCCTCGCGCTTCCCT	
LC cDNA :	TGTCGCCTCCTCCTCGAAGCTCAGGGCGCTGGCACCGCGGCTGAGAGTTT	1600
LC cDNA :	CGAACGTCCAAGGAGGCTCATTGTCTCCGCTTCTCCTCCGGCGAGGCCA	1650
LC cDNA :	ATTCGGACGCGGTGCCGTGCGCAACGGAAAGCCGTATTGATATAAAGCTT	1700
LC cDNA :	CCTAGAAGAAGCTTGCTTGTTCAATTTACATGCAACGCATGTGGCGAAAG	1750
LC cDNA :	GACCAAGCGCTTGATAAACAGAGTAGCCTATGAAAGAGGCACAGTTTTTC	1800
LC cDNA :	TTCAGTGTGCAGGGTGCCAGGTGTACCATAAGTTTTGTTGATAATCTTGGG	1850
LC cDNA :	CTAGTTGTTGAGTATGATCTACGAGAAGAAAACGAGCTACAAGGAGAAAA	1900
LC cDNA :	TGCGGTGGACACAGTTCTGAAGAT <u>TGA</u> TCTGCTGTGAGAAGCGATGTTG	1950
LC cDNA :	GTATGCAAAACGCCCTGTACTCTCATAAAAATGGCACTTTTTAAAGTTG	2000
LC cDNA :	TTGCACATACTCATCTGAAATTCGAATGTAGGTTTTTGACAACATTGGT	2050
LC cDNA :	TATTTGTATAGACAGCGGCCCTACATTGTACTTTTT (A) ₆₀	2100

Abbildung 11 Sequenzen eines *et1-m15* Klon, der Mu8 Sequenz (3' -5' , Fleenø et al., 1990) und der LC Wildtyp *Etched1* cDNA Sequenz. Die blau markierten Nukleotide zeigen Startcodon und Stopcodon. In grau sind die jeweiligen Sequenzunterschiede markiert. Die Target-site-duplication ist rot unterstrichen. Die Insertionsstelle des Mu8 Elements in die Linie *et1-m15* ist 9 Basenpaare vor dem Startcodon (Pfeil). Die grau markierten 9 Basenpaare am 3' und 5' Ende der Mu8-Sequenz stammen aus dem *maxy* Exon 10.

3.1.2 Analyse von PCR-Produkten aus *et1* Mutantenlinien

Durch die Ergebnisse der bereits erfolgten Untersuchungen an einigen *et1*-Mutantenlinien, die bevorzugt Mutatorelemente im Sequenzbereich des Exon I besitzen (*et1-m3/et1-m15*), war es sehr interessant, weitere *et1*-Mutantenlinien hinsichtlich einer Transposon-Insertion zu überprüfen. Für diese Analyse wurden PCR von genomischer DNA aus *etched1* Mutantenlinien und Wildtyplinien durchgeführt. Dazu standen verschiedene Primer, die nach der Sequenz der Linie LC (*Etched1*-Wildtyp) hergestellt worden waren, zur Verfügung (Abb.12). In Abbildung 12 sind die Positionen der Primer und die nach Amplifikation des *Etched1* Gens aus der Linie LC zu erwartenden Größen der Amplifikate dargestellt.

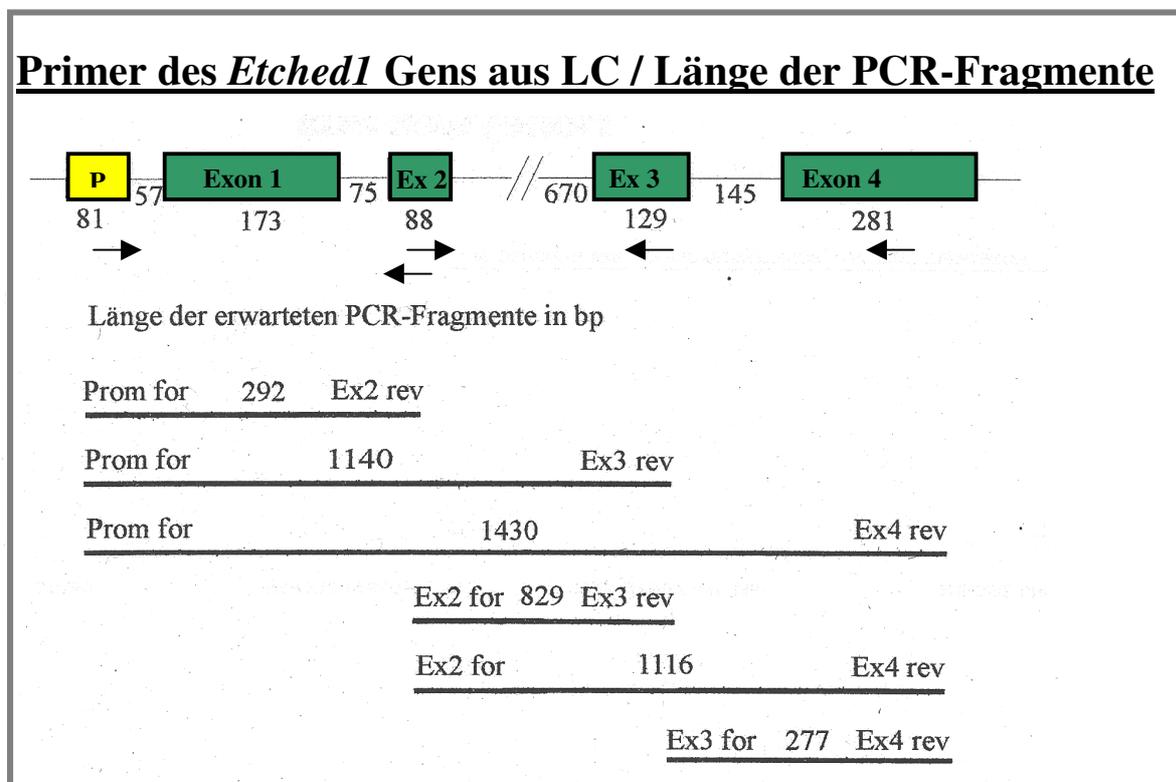
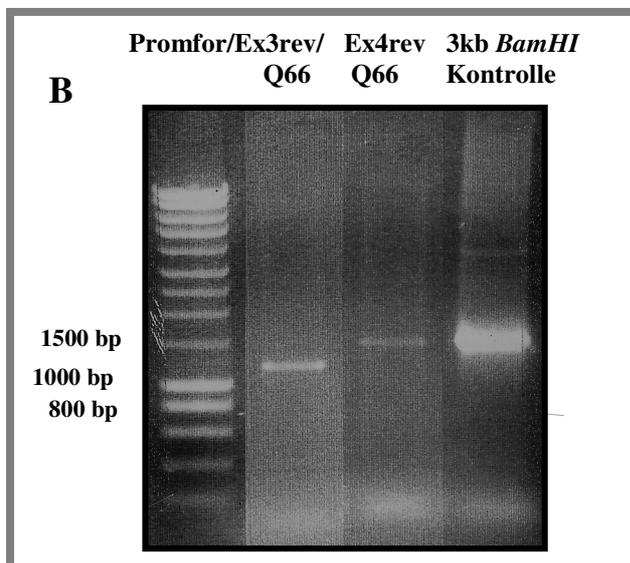
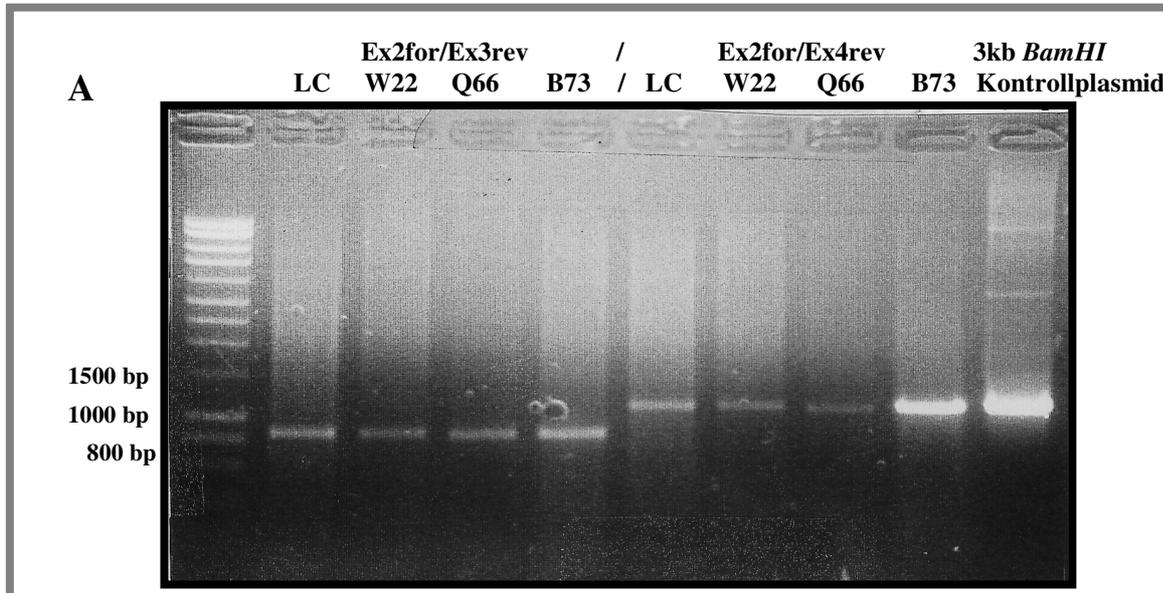


Abbildung 12 Größe der zu erwartenden PCR Fragmente mit den LC Primerkombinationen und dem *Etched1* LC Gen. Prom for = Promotorprimer forward, Ex2, 3, 4 for/rev = Exon2, 3,4 forward/reverse (Primer aus den entsprechenden Exons, s. auch Anhang 7.1/2)

Zur Überprüfung der Primerbindung in unterschiedlichen *Etched1* Allelen wurden die Wildtyp-Maislinien LC, W22, Q66 und B73 mit den *Etched1* Primerkombinationen der Linie LC getestet. Diese Überprüfung war notwendig, weil der genetische Hintergrund der zu untersuchenden Mutantenlinien nicht immer bekannt war. Daher war nicht sicher, ob die auf den Wildtyp abgestimmten Primer für andere genetische Hintergründe passen würden.

In allen getesteten Linien ließen sich mit den Primern Exon2 forward / Exon3 reverse, Exon2 forward / Exon4 reverse PCR Fragmente amplifizieren (Abb. 13A). Die Kombination der Primer aus:

Promotor forward / Exon3 reverse, Promotor forward / Exon4 reverse ergaben nur bei der Linie Q66 PCR-Fragmente (Abb. 13B)



Abbildungen 13
 PCR Banden der verschiedenen Wildtyp DNAs mit den Wildtyp LC Primern Exon2 forward / Exon3 reverse, Exon2 forward / Exon4 reverse (A), Promotor forward / Exon3 reverse und Promotor forward / Exon4 reverse (B). Als Kontrolle wurden PCR-Produkte mit einem *Bam*HI-Fragment der Wildtyplinie als Matrize hergestellt.

Die Größe der amplifizierten PCR-Fragmente aus den getesteten Wildtyplinien entsprachen alle den für die Linie LC erwarteten Größen (s. Abb. 12). Die erwartete Fragmentgröße für Produkte mit der Primerkombination Ex2for / Ex3rev ist 829 bp, für Produkte mit der Primerkombination Ex3for / Ex4rev ist sie 1116 bp.

Für die Linie Q66 konnten mit dem Promotorprimer und den Primern Ex3rev und Ex4rev PCR Fragmente in der Größe der für LC erwarteten Fragmente gezeigt werden. Hierbei sollten mit dem Ex3rev Primer Banden in der Größe von 1140 bp und mit dem Ex4rev Primer 1430 bp herauskommen.

Da die Ergebnisse der Fragmentgröße der PCR-Produkte mit den erwarteten Fragmentgrößen sehr gut übereinstimmen, kann man darauf schließen, daß alle der getesteten Wildtyplinen keine gravierenden Unterschiede innerhalb der Sequenz, der mit den Primern amplifizierten Bereiche zwischen Exon 2 und Exon 4, des *Etched1* Gens aufweisen. Daher sollte man mit den verwendeten Primern, bei PCR-Experimenten mit *et1*-Mutantenlinien, ebenfalls Fragmente zu amplifizieren können. Außerdem scheint die Linie Q66 einen ähnlichen Promotorbereich wie LC zu besitzen, da hier mit Primern der LC-Sequenz gearbeitet wurde. Als Kontrolle der PCR wurde ein Plasmid mit einem 3 kb *BamHI* LC Fragment (Garg, 2002) verwendet. Das 3 kb *BamHI*-Fragment enthält den kompletten Genbereich des *Etched1* Gens der Linie LC (s.a. Abb.19 /3.1.4) und sollte mit den verwendeten LC Primern auf jeden Fall ein Amplifikat ergeben (Abb. 12).

Nach dem PCR Test mit den Wildtyplinen wurden die verschiedenen genomischen DNAs der *etched1* Mutantenlinien getestet. Bei allen *etched1*-Mutanten Linien, bei denen in der PCR mittels *Etched1*-Primern Fragmente amplifiziert werden konnten, war die Größe der Fragmente des Genbereichs zwischen den Primern aus Exon 2 und Exon 4 identisch.

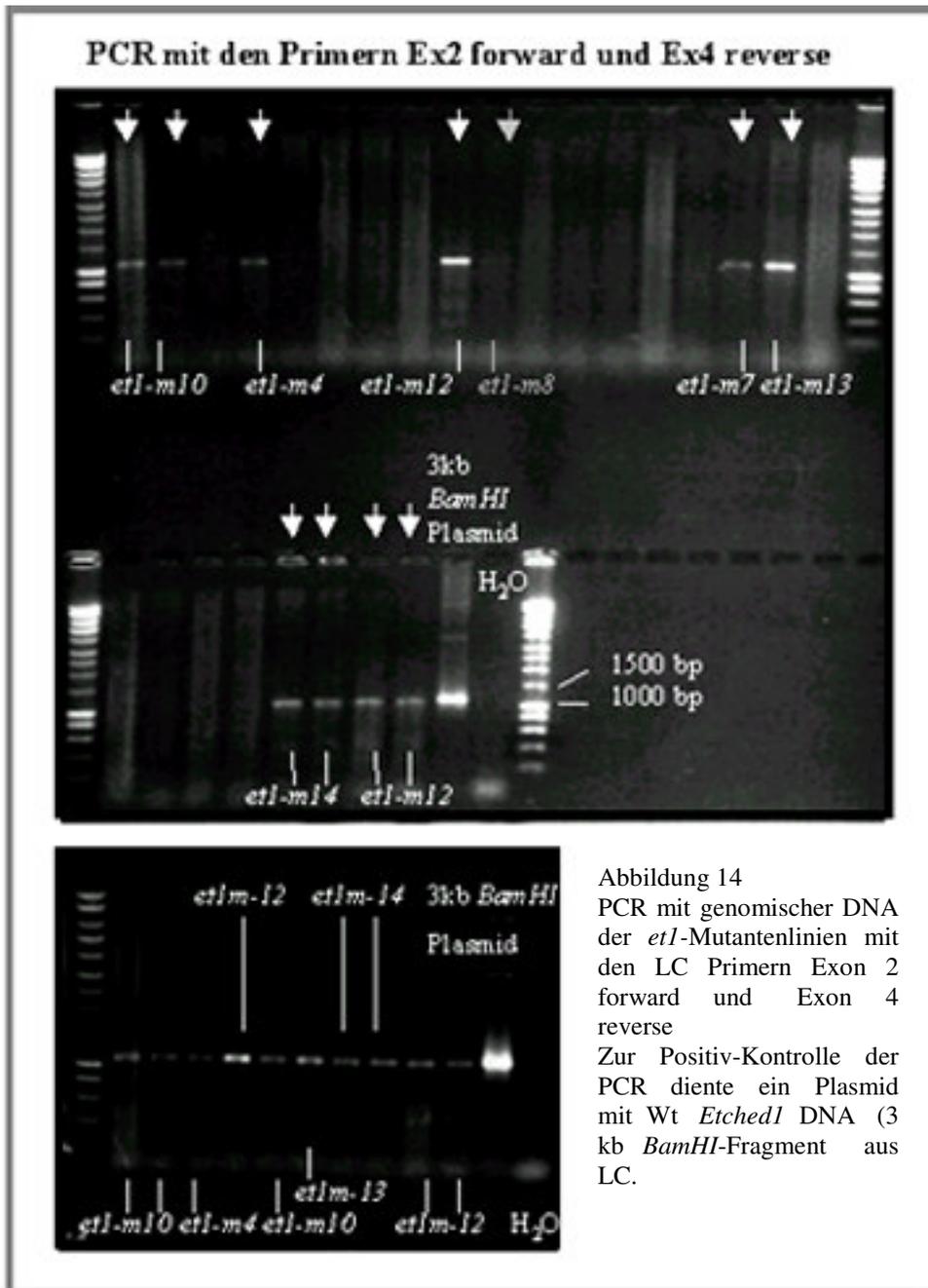


Abbildung 14
 PCR mit genomischer DNA
 der *etl*-Mutantenlinien mit
 den LC Primern Exon 2
 forward und Exon 4
 reverse
 Zur Positiv-Kontrolle der
 PCR diente ein Plasmid
 mit Wt *Etched1* DNA (3
 kb *Bam*HI-Fragment aus
 LC.

Die PCR (Abb. 14) zeigt, daß bei den verschiedenen *etched1*-Mutantenlinien gleich große PCR Fragmente mit den Primern Exon2 forward und Exon4 reverse amplifiziert wurden. D.h., das in dem Bereich zwischen Exon 2 und Exon 4 offensichtlich keine Insertion eines Mutatorelements in den betreffenden Linien vorhanden ist. Falls Mutatorelemente im putativen *Etched1* Gen vorhanden sind, müssen sich diese an einer Position vor dem Primer in Exon2 befinden. Zur genaueren Bestimmung der Insertionsereignisse wurden deshalb PCR mit den Primern Exon2 rev, Exon3 rev und Exon4 rev in Kombination mit einem Primer, aus einer Sequenz in den terminal inverted repeats einiger Mutatorelemente, durchgeführt.

Für die genomischen DNAs der Mutantenlinien *et1-m4*, *et1-m10* und *et1-m12* konnten PCR Produkte aus der Primerkombination Mu/Ex4 rev (Abb. 15) und Mu/Ex3 rev (hier nicht gezeigt) amplifiziert und aus dem Gel ausgeschnitten und isoliert werden. Zur Kontrolle der Ergebnisse wurden außerdem genomische Klone aus den beiden *et1-m15* Banken für die PCR eingesetzt und ebenfalls mit einer Kombination des Mutatorprimers und des Ex3rev bzw. Ex4rev Primers amplifiziert, ausgeschnitten und isoliert. Diese Fragmente entsprachen alle in der Größe dem erwarteten Fragment der Linien *et1-m3* und *et1-m15* (ca.1150 bp), von denen die Sequenzen ja bereits bekannt waren. Die Insertionspositionen des jeweiligen Mutatorelements dieser drei Linien wären dann im Bereich der Insertionsposition des Mu Elementes bei *et1-m3* und *et1-m15*.

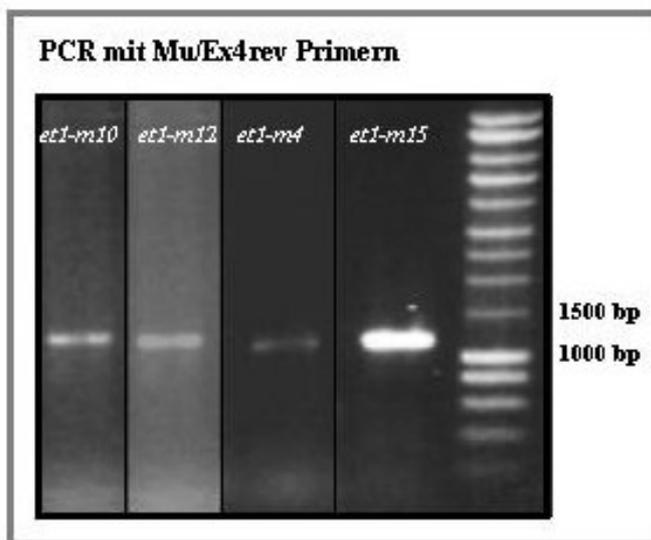


Abbildung 15 PCR-Produkte der Linien *et1-m10*, *et1-m12*, *et1-m4* und *et1-m15* (Kontrolle). Sie wurden mit den Primern Mutator und Exon4reverse amplifiziert.

Diese PCR-Fragmente wurden zur Sequenzierung in einen Vektor kloniert (s. 2.2.17) und über einen Southernblot mit der *Etl* cDNA Sonde überprüft. Mit der DNA der positiv getesteten Klone wurden dann Sequenzreaktionen mit den Primern UP, RP, Mu und Ex3 rev durchgeführt.

Die Insertionspositionen für die Mutatorelemente (Mu8) bei den Linien *et1-m10* und *et1-m12* sind um vier Basenpaare in 5' Richtung des *etl* Gens verschoben (bezogen auf die Insertionsposition der Linien *et1-m3* und *et1-m15* (Abb.17)). Ein Unterschied besteht aber in der Insertionsrichtung des Mutatorelementes. Ein Mutatorelement des Typs Mu8 ist in den Linien *et1-m3* und *et1-m15* in der 3' -5' Orientierung inseriert, in den Linien *et1-m10* und *et1-m12* in 5' -3' Orientierung. Da ein Unterschied im genetischen Hintergrund der beiden Linien besteht, zeigt das *et1-m12* Gen den genetischen Hintergrund der Wildtyp Linie LC, hat also neun Basenpaare weniger im Exon1.

Diese Unterschiede zeigen, daß es sich, obwohl fast alle Mutatorinsertionen in dieser sehr kleinen Region stattgefunden haben, um unabhängige Ereignisse handeln muß und Kontaminationen aus anderen Phagenbanken sehr unwahrscheinlich sind.

3.1.3 Übersicht über alle analysierten *etched1* Linien

Die Analysen der verschiedenen *etched1* Linien konnten neue Erkenntnisse über die Position bzw. die Orientierung von Mutatorelementen in den *et1-m* Allelen mit verschiedenen genomischen Hintergründen des Mais liefern. Zur Gesamtübersicht des *Etched1*-Locus wurden daher auch ältere Daten, zu den Sequenzen der Linie *et1-m3* und *et1-m16* (da Costa é Silva, unveröffentlicht) in einen generellen Vergleich einbezogen. Dabei ergaben sich folgende Gemeinsamkeiten bzw. Unterschiede:

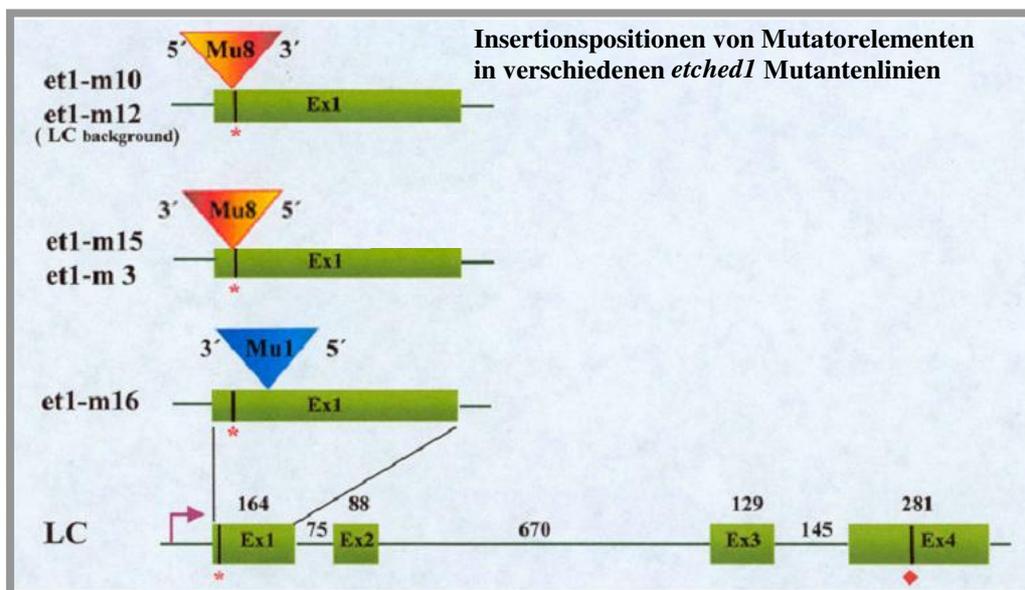


Abbildung 16 Mutator Insertionen der bisher analysierten *et1*-Mutantlinien. Hier ist die Art der Mutatorelemente, die Orientierung der Mutatorelemente und die Insertionsposition der Mutatorelemente dargestellt. Zusätzlich ist die Genstruktur des *Etched1* Gens aus der Wildtypenlinie LC abgebildet.

☆ = Startcodon, ◇ = Stopcodon

Es gibt einen „HOT SPOT“ für Insertionen von Mutatorelementen im *Etched1* Gen. Insgesamt erfolgten alle Insertionen von Mutatorelementen, die bisher analysiert wurden im Bereich des Exon1. Viermal erfolgte die Insertion im Bereich der Basenpaare 9 bis 13 Basenpaare vor dem Startcodon im 5' UTR des Gens, einmal an Position 35 nach dem Startcodon. Wie bereits unter 3.1.2 und 3.1.3 beschrieben, sind die Orientierung und Position des Mu8 Elementes bei den Linien *et1-m3* und *et1-m15* identisch. Die Orientierung des Mu8 Elementes in den Linien *et1-m10* und *et1-m12* ist genau umgekehrt (5' - 3' statt 3' -5') und die Insertion des Mutatorelementes ist 9 und nicht 13 Basenpaare vor dem Startcodon erfolgt. Bis auf die Linie *et1-m12*, die den gleichen genetischen Hintergrund besitzt wie die Linie LC, ist bei allen anderen Mutantenlinien eine Sequenz von 9 zusätzlichen Basenpaaren (CCTCCTCCT), in der Position 125 (ab Startcodon), im Exon1 vorhanden, und es sind fünf Nukleotide in der *Etched1*-Sequenz ausgetauscht.

Die Linie *et1-m16* unterscheidet sich stärker von den anderen getesteten Linien, da eine Insertion eines anderen Mutatorelementes (Mu1) stattgefunden hat und die Insertion nicht vor dem Translationsstart des *Etched1* Gens erfolgt ist.

3.1.4 Southernanalysen verschiedener weiterer *etched1*-Linien

Um Hinweise auf eine Mutator Insertionsposition in weiteren *etched1*-Mutantenlinien zu erhalten, wurde eine Southernanalyse durchgeführt (Abb. 18). Als Referenz wurde genomische DNA der Linien *et1-m3* und *et1-m12* verwendet, weil die Insertionspositionen der Mu8-Elemente in diesen Linien bereits bekannt waren. Ein genomischer Southernblot mit *HindIII*-gespaltener DNA wurde mit der LC cDNA-Sonde hybridisiert, um Unterschiede bezüglich der Bandengröße der Restriktionfragmente, der einzelnen *et1*-Mutantenlinien, detektieren zu können. Eine Abweichung der Bandengröße von denen aus Wildtyplinien, bzw. auch aus Wildtypsequenzen von *et1*-Mutantenlinien (weil die Insertion eines Mutatorelementes in *et1-m3* und *et1-m12* außerhalb des *HindIII*-Fragmentes liegt), könnte auf die Insertion eines Mutatorelementes hinweisen (z. B. + 1,4 kb bei einer Mu8-Insertion).

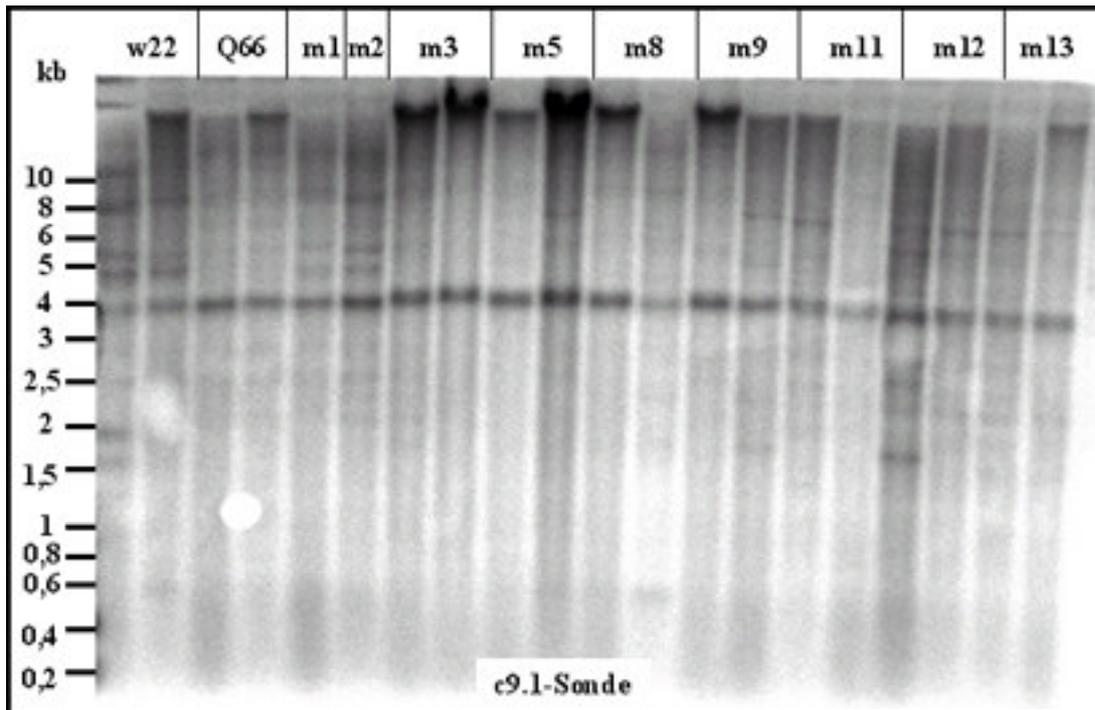


Abbildung 18 Genomischer Southernblot von *etl*-Mutantenlinien nach *HindIII*-Restriktion detektiert mit der *EtI* cDNA Sonde

Bei allen Wildtyp- und *etl*-Mutantenlinien sind nahezu gleich große Banden im Bereich von 4 kb zu erkennen. D. h. die *HindIII*-Schnittstellen sind in allen Linien vorhanden und auch der genetische Hintergrund der einzelnen Linien (bezüglich der Intronsequenz bzw. Intronlänge) scheint nicht sehr unterschiedlich zu sein. Da bei einzelnen Mutantenlinien keine deutlich größeren DNA-Fragmente (je nach Mu-Element mindestens 1,4 kb) zu detektieren sind, sind Integrationen der Mutatorelemente, in den Bereich dieser ca. 4 kb großen *HindIII*-Fragmente, auch nicht erfolgt. Abbildung 19 zeigt einen Ausschnitt eines genomischen LC-Klons, mit den enzymatischen Schnittstellen des Bereiches der vier *Etched1* Exons.

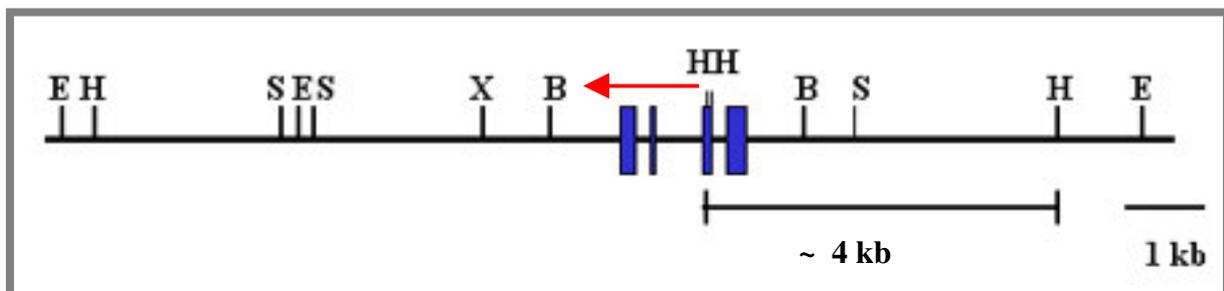


Abbildung 19 Schnittstellen eines genomischen LC Klons und Position des 4 kb *HindIII*-Fragments, Die Buchstaben bezeichnen Schnittstellen: E=*EcoRI*, H=*HindIII*, S=*Sall*, B=*BamHI*, X=*XhoI*. Die vier Exons des *EtI* Gens sind in blau dargestellt.

Abbildung 19 zeigt, daß falls Insertionen von Mutatorelementen in den getesteten Mutantenlinien (*et1-m1*, *et1-m2*, *et1-m5*, *et1-m8*, *et1-m9*, *et1-m11* und *et1-m13*) erfolgen, diese nur im 5' Bereich von der *HindIII*-Schnittstelle (s. roter Pfeil) erfolgt sein können. Dieser Fall konnte für die bereits näher analysierten und sequenzierten Linien *et1-m3* und *et1-m12* bestätigt werden. Es ist davon auszugehen, daß aufgrund der bisher aufgetretenen Insertionspräferenzen der Mutatorelemente in den vorderen Bereich (5' Ende/ Exon I) des *Etched1* Gens, auch andere Linien eventuell eher dort Insertionen der Mutatorelemente aufweisen.

3.2 Lokalisation des *Etched1* Genprodukts

3.2.1 *In situ* Experimente mit Maiskörnern und *Et1*-Sense und Antisense RNA-Sonden

In dieser Arbeit sollten *in situ* Hybridisierungen mit vollständigen *Etched1*-RNA-Sonden (700 bp) an Maiskörnern von Wildtyp-Linien und der *etched1-reference* Linie durchgeführt werden, um Expressionsorte des *Etched1* Gens und linienspezifische Unterschiede der Wildtyplinien LC und Q2 und der Linie *et1-ref* zu erkennen. Es wurden Körner zweier Wildtyplinien eingebettet, weil die entwickelten Körner der Linie LC gelb und die der Linie Q2 dunkelrot gefärbt sind. Zum Zeitpunkt des Einbettens sind alle Wildtyp Maiskörner gelb gefärbt.

Für die *in situ* Hybridisierung wurden 8-14 DAP (Tage nach der Befruchtung) alte halbierte Maiskörner der Linien in BMM (Butylmethacrylat/Methylmethacrylat) eingebettet (2.2.11.1). Es wurden 8 DAP (Tage nach der Befruchtung) alte LC und Q2 Wildtyp Körner und 8 DAP alte *et1-ref* Körner verwendet. Außerdem wurden 14 DAP alte LC Körner eingebettet. Diese eingebetteten Körner wurden mit dem Mikrotom zu 8-10 µm dicken Schnitten verarbeitet und auf Objektträger gelegt. Die Schnitte wurden für die Detektion vorbereitet (2.2.11.2), mit den Sonden (2.2.11.4) hybridisiert und mittels BCIP/NBT detektiert (2.2.11.3).

Nach der Hybridisierung der Schnitte der Wildtyplinie Q2 mit der *Etched1*-Antisense RNA-Sonde, wurden bei Betrachtung im Dunkelfeld verstärkt Signale in Zellen beidseitig der Aleuronschicht, in den Zellschichten des äußeren Perikarp (Abb. 25: A2, A3, A5) und im Bereich des Embryos beobachtet (Abb. 25: A7). Im Unterschied dazu zeigen die mikroskopischen Durchlicht-Aufnahmen (linke Spalte), nach Hybridisierung mit der *Etched1*-Antisense-Sonde, dazu eine intensiv blau-violette Färbung des kompletten Perikarps, aber auch Embryo und Aleuron sind angefärbt (Abb. 25: A1, A4, A6). Bei den Kontrollhybridisierungen, die mit den *Etched1*-Sense RNA-Sonden durchgeführt wurden, konnte nach der Detektionsreaktion (ü.N.) bei Durchlicht keine blauviolette Verfärbung festgestellt werden (Abb. 25: B1, B4, B6). Bei Dunkelfeldbetrachtung mit der Antisense-Sonde sind im gesamten Perikarp schwächere Signale zu sehen, als bei Durchlichtbetrachtung.

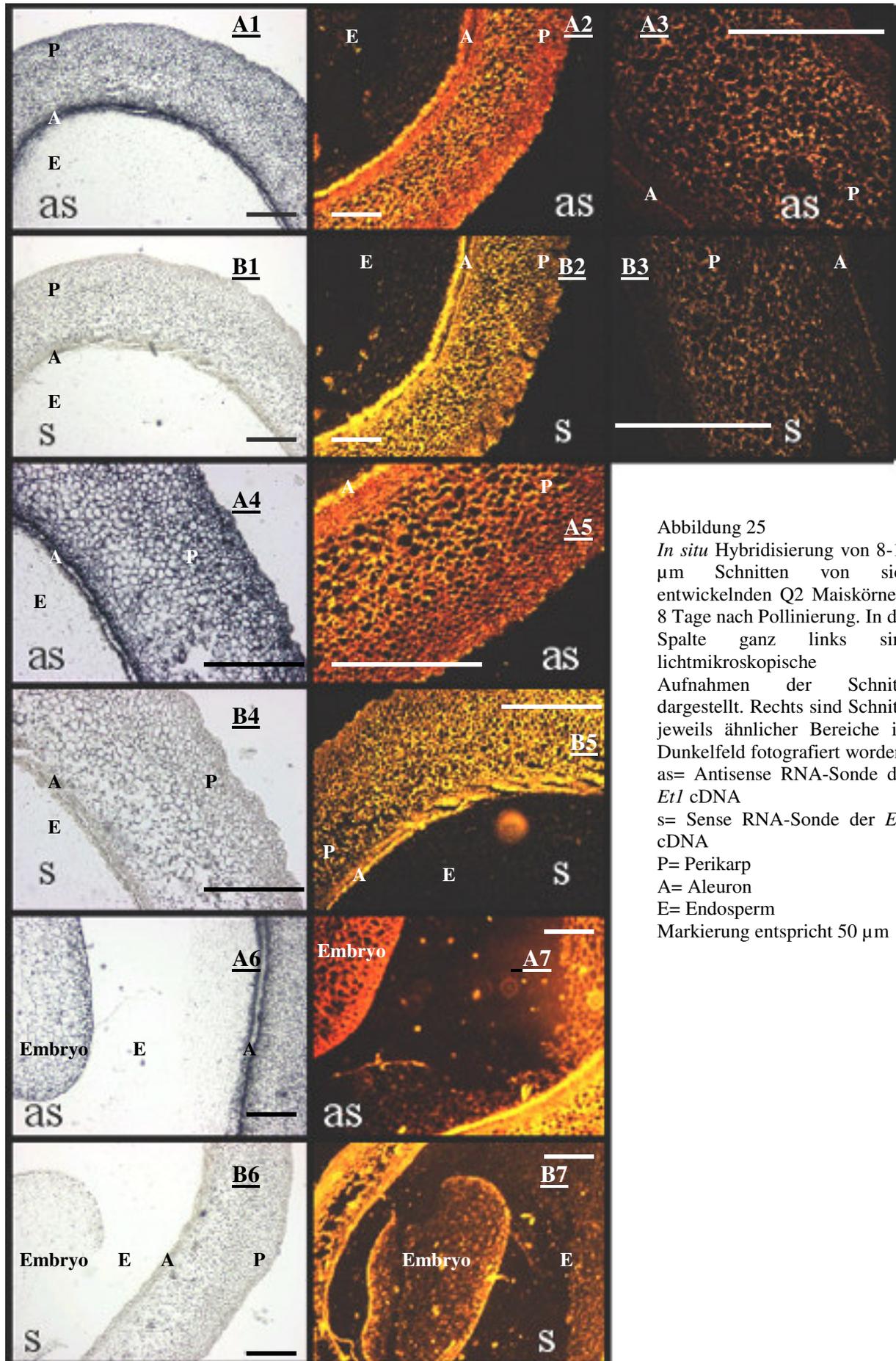


Abbildung 25

In situ Hybridisierung von 8-10 µm Schnitten von sich entwickelnden Q2 Maiskörnern 8 Tage nach Pollinierung. In der Spalte ganz links sind lichtmikroskopische Aufnahmen der Schnitte dargestellt. Rechts sind Schnitte jeweils ähnlicher Bereiche im Dunkelfeld fotografiert worden
 as= Antisense RNA-Sonde der *Et1* cDNA
 s= Sense RNA-Sonde der *Et1* cDNA
 P= Perikarp
 A= Aleuron
 E= Endosperm
 Embryo
 Markierung entspricht 50 µm

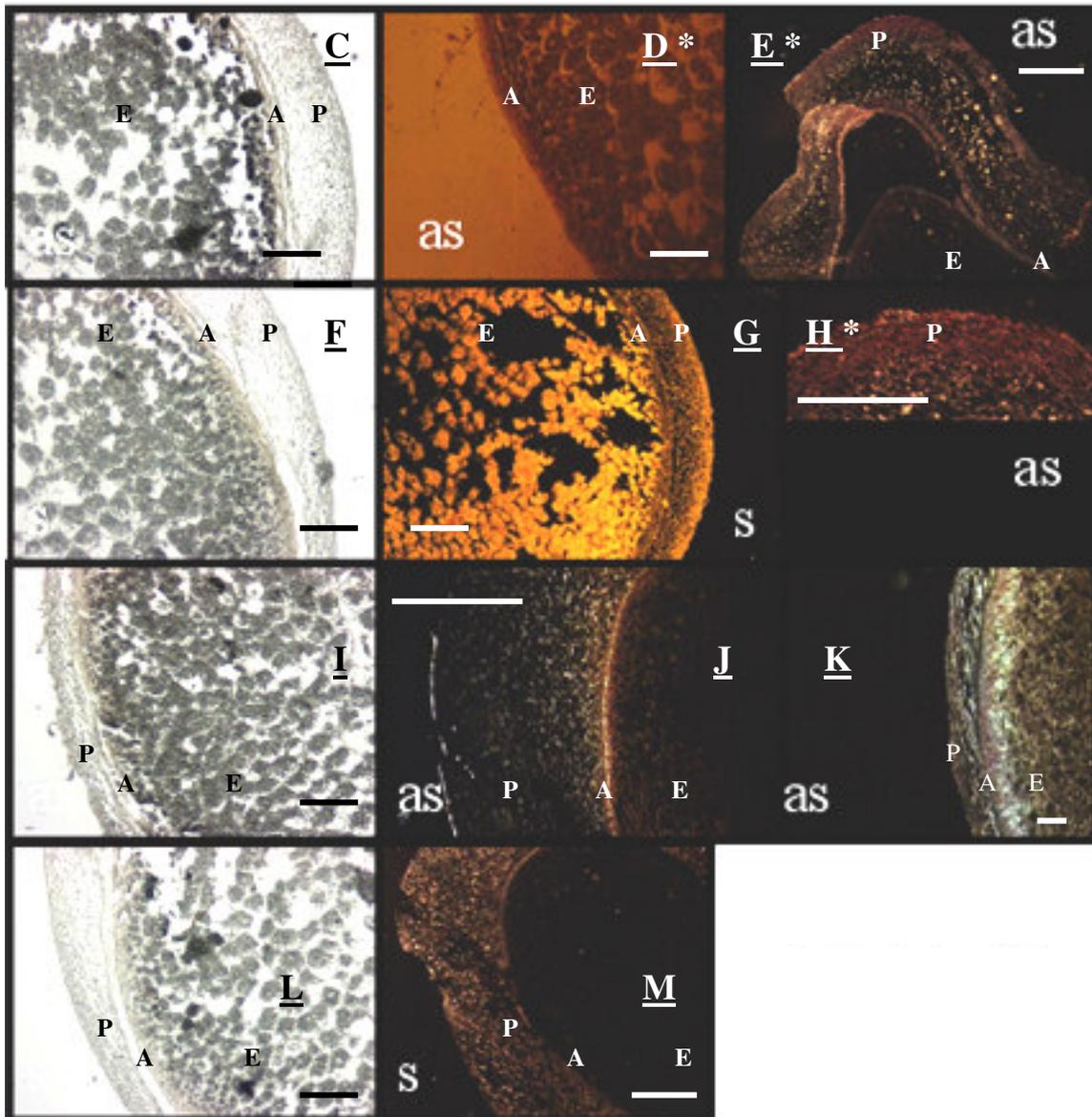


Abbildung 26 *In situ* Hybridisierung von sich entwickelnden Körnern der Linie LC (8-10µm Schnitte) 8 und 14 Tage nach der Befruchtung . 8 DAP Körner (D, E, H, J) sind mit * markiert

P= Perikarp, A= Aleuron, E= Endosperm Markierung = 50µm; as = Antisense-RNA-Sonde, s = Sense-RNA-Sonde

Die Unterschiede zwischen den Hybridisierungen mit den *Etched1*-Sense- und Antisense-Sonden bei Schnitten der Linie LC, betrachtet mit dem Lichtmikroskop, sind nicht sehr groß (Abb. 26: Sense: F, L; Antisense: C, I). Lediglich der Endospermbereich der mit der Antisense-Sonde hybridisierten Schnitte erscheint etwas dunkler (C, I), als bei der Hybridisierung mit der Sense-Sonde. In den Dunkelfeldaufnahmen kann die Färbung des Aleuronbereiches und des äußeren Perikarps bei Antisense-Hybridisierungen teilweise sehr gut erkannt werden (D, E, H, J, 8 DAP), während mit der Sense-Sonde keine Signale zu detektieren sind. Im Gegensatz zu Q2-Körnern (8 DAP) ist im Endosperm der LC Körner (14 DAP/ Abb. 26: G, M) schon sehr viel Stärke gespeichert. Dies könnte vielleicht ein Grund der

schlechteren Detektierbarkeit der Signale in den Geweben der 14 DAP LC-Körner im Verhältnis zur anderen Wildtyplinie Q2 sein.

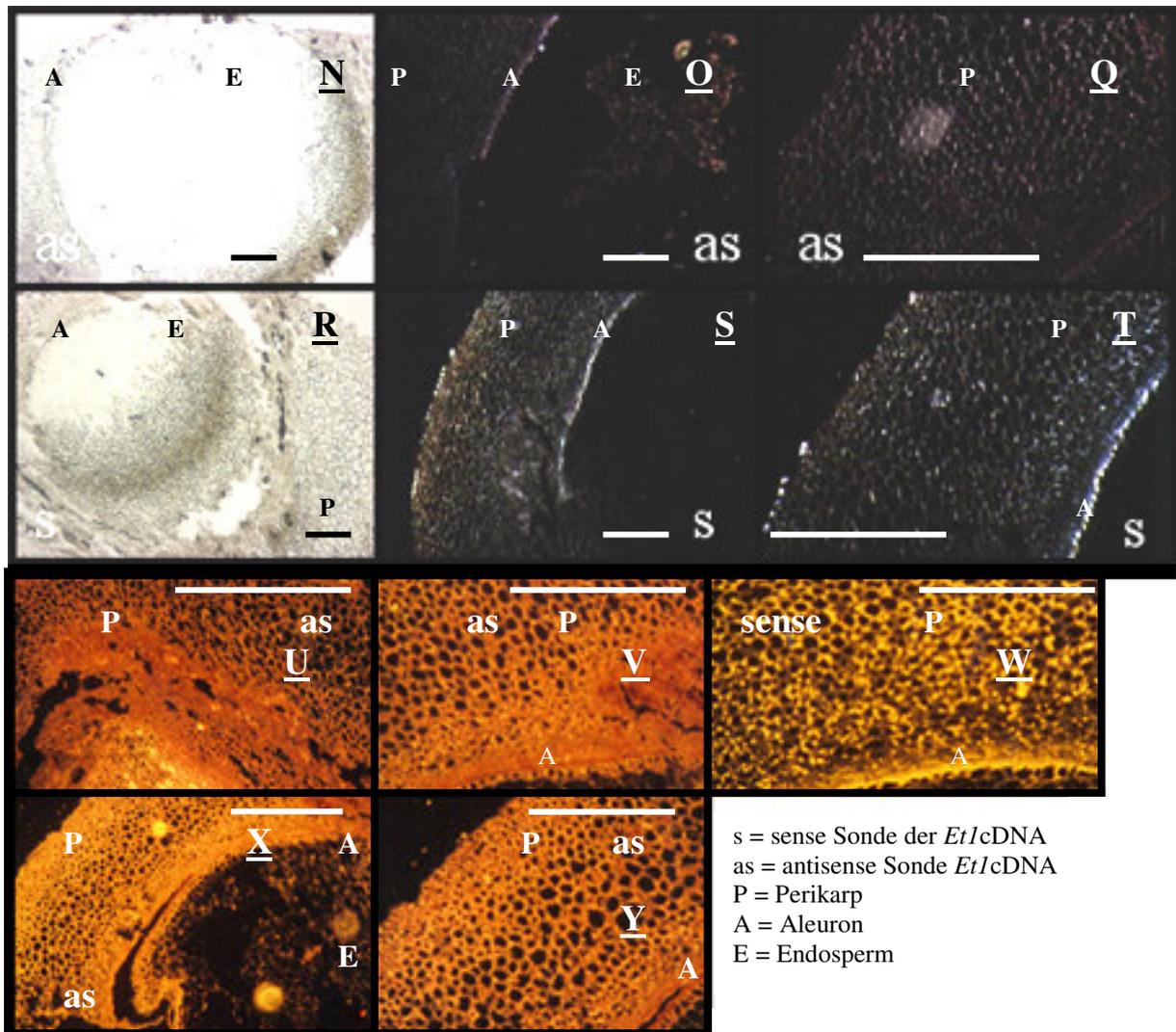


Abbildung 27 *In situ* Hybridisierung von 8-10µm Schnitten von sich entwickelnden Körnern (8 DAP) der Linie *et-ref*. Markierung = 50 µm

Schnitte von *et1-ref* Körnern (8Tage DAP) zeigen, wie erwartet, keine definierten Hybridisierungs-Signale, weder mit der Sense- noch der Antisense-Sonde (Abb.27: N, R). Im Dunkelfeld ist jedoch auch hier eine leichte violette Verfärbung der Aleuron und Perikarp-Zellschichten, nach der Hybridisierung mit der Antisense-Sonde festzustellen (Abb. 27: Q, Q). Die Fotos U, V, X und Y (Abb.27) zeigen diesbezüglich eine intensivere Farbe von Perikarp und Aleuron, als der mit der Sense Sonde hybridisierte, unter gleichen Bedingungen fotografierte Dünnschnitt W.

In diesem Experiment konnte gezeigt werden, daß starke Hybridisierungssignale in Körnern der Wildtypelinie Q2 in Kombination mit der *Etched1*-Antisense-Sonde auftreten. Diese treten besonders im Bereich des Überganges der äußeren Endospermschicht zum Aleuron und im Embryo auf. In den LC-Schnitten sind diese Effekte nicht so stark ausgeprägt, aber trotzdem zu erkennen. Die abgeschwächten Signale könnten auf die fortgeschrittene Stärkeeinlagerung der 14 DAP LC-Körner zurückzuführen sein, oder darauf, daß nach 14 Tagen die Expression der *Et1*-mRNA in diesen Geweben schwächer wird. Die jeweiligen Kontrollhybridisierungen mit den *Etched1*-Sense-Sonden zeigen keinerlei Verfärbung dieser Bereiche. In *et1-ref* sind wie erwartet keine eindeutigen gewebespezifischen Signale mit *Et1*-Antisense-Sonden zu erkennen.

In situ Hybridisierungen mit den jeweiligen Sense und Antisense 3'UTR Sonden der cDNA der Linien LC und *Zmzr1* (je 300 Ribonukletide lang) zeigten, trotz mehrfacher Wiederholung der Einzelerperimente, keine Signale innerhalb der Gewebeschnitte (Abb. 28). Da die spezifischen Signale der 3'UTR Bereiche nicht detektierbar waren, ist nicht klar ob die vorherigen Signale, nach der Hybridisierung mit *Etched1*-Antisense-Sonden (der gesamten *Etched1*-cDNA-Sequenz) spezifisch für die *Etched1*-mRNA sind, oder ob nicht vielleicht doch, z.B. in den *et1-ref*-Schnitten die mRNA des *Zmzr1* detektiert worden ist.

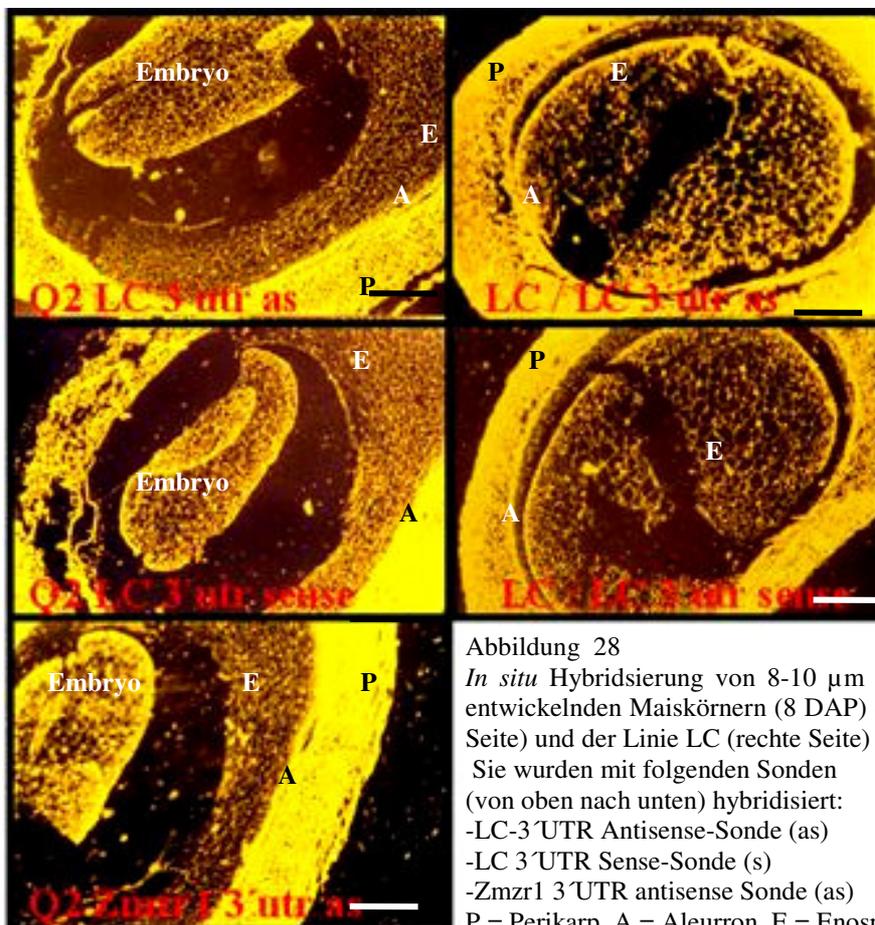


Abbildung 28

In situ Hybridisierung von 8-10 µm Schnitten von sich entwickelnden Maiskörnern (8 DAP) der Linie Q2 (linke Seite) und der Linie LC (rechte Seite)

Sie wurden mit folgenden Sonden

(von oben nach unten) hybridisiert:

-LC-3'UTR Antisense-Sonde (as)

-LC 3'UTR Sense-Sonde (s)

-*Zmzr1* 3'UTR antisense Sonde (as)

P = Perikarp, A = Aleuron, E = Endosperm

3.2.2 Überexpression eines *Etched1*-Fusionsproteins

Das ET1-Protein sollte in *E. coli* überexprimiert und isoliert werden, um gegen das gereinigte Protein ein Antiserum für Western-Analysen herzustellen. Die Überexpression eines *Etched1*-Fusionsproduktes sollte mittels des IMPACT™-CN- Systems über ein Intein-Fusionsprotein geschehen (s. a. 2.2.3.3). Dazu wurde die komplette *Etched1*-LC cDNA (c9.1) C- und auch N-terminal zum Intein in zwei Intein-Vektoren pTYB2 und pTYB12, über die *NdeI* und *XhoI*-Schnittstellen kloniert.



Abbildung 20 Multiple Klonierungsstellen der beiden Vektoren zur Herstellung N- und C-terminaler *Et1*-Intein-Fusionsproteine

Die verschiedenen Klone wurden in den *E. coli* Stamm ER2566 transformiert. Parallel wurde auch das Kontrollplasmid pMYB5 transformiert. Dann wurde eine Zeit-Kinetik der IPTG-induzierten Expression bei 37°C durchgeführt. Ab einer OD von 0,8 wurde IPTG zu den 50 ml-Kulturen hinzugegeben und für fünf Stunden jede Stunde ein 1 ml Aliquot entnommen, abzentrifugiert und eingefroren. Die eingefrorenen Proben wurden mit je 40 µl DTT-freiem Probenpuffer aufgenommen, aufgeköcht und 5 min bei 4°C zentrifugiert. 10 µl dieser Proteinsuspensionen wurden auf 8% ige SDS-PAGEs aufgetragen. Die fertigen Proteingele wurden geblottet und die Membranen einer Ponceau-Färbung unterzogen. Dabei konnten nur Proteine aus der Kontrolle angefärbt werden. Eine anschließende Immundetektion mit einem gegen das Intein gerichteten, mit alkalischer Phosphatase gekoppelten Antikörper und dem Substrat BCIP/NBT zeigte nur eine Proteinbande bei den jeweiligen Kontrollen (1,2,3,4 und 5 h nach IPTG-Induktion, nicht gezeigt). Der gleiche Versuch wurde mit bei 30°C angezogenen Bakterien bei einer Temperatur von 15°C und 30°C nach der Induktion mit IPTG wiederholt. Dadurch sollte der Einfluß der Temperatur auf eine eventuelle Verbesserung der Induktion der Expression des Fusionsproteins getestet werden. Aber auch bei diesem Versuch wurde lediglich das Kontrollplasmid überexprimiert (nicht gezeigt).

Deshalb wurden erst einmal nur Überexpressionsversuche der Intein-Vektoren ohne Inserts, zusammen mit der Kontrolle, durchgeführt. Bei diesen Tests wurde die Induktion der Expression mit IPTG bei einer OD von 0,5-0,6 und 0,8 (bis zur Induktion wurden die Bakterien bei 37°C inkubiert) parallel bei 20°C und bei 30°C gestartet. 4 Stunden nach der Induktion der Expression wurde je 1 ml Bakteriensuspension pelletiert, das Pellet in Puffer aufgenommen und die Proteine in SDS-Gelen aufgetrennt. Die Westernblots dieser Gele wurden zunächst nach Ponceau gefärbt und dann einer Immundetektion unterzogen. Auch dieses Mal konnten lediglich schwache Proteinbanden der Kontroll-Proteine (MYB5), bei jeweils 20°C und 30°C überexprimiert, (OD bei der Induktion $\geq 0,8$) detektiert werden (nicht gezeigt)). Um Detektionsschwierigkeiten auszuschließen, wurde eine neue Verdünnung des ersten Antikörpers (Intein-AK 1:750) angesetzt. Tatsächlich konnten jetzt auch Protein-Banden durch Expression der Vektoren pTYB2 und pTYB12, mit einem Molekulargewicht von etwa 54 kDa, detektiert werden (Induktion bei OD $\geq 0,8$, 30°C).

Aufgrund der vorangegangenen Schwierigkeiten der Überexpression der Intein-Fusionsproteine, sollten die Bereiche der Transitsequenz des Etched1-Protein und des hinteren, zum TFIIIS homologen, Bereiches separat in die beiden Vektoren pTYB2 und pTYB12, je C- und N-terminal, kloniert werden. Dazu mußten mittels modifizierter Primer, wie auch bei der Gesamtsequenz, PCR-Fragmente hergestellt und kloniert werden.

(s. auch Material und Methoden 2.2.3.3 /S.37 Abb. 8)

ET1	<u>MTTTAAGHGCCWAGIPPFALLPRILSTGRETPPPRASLVASSSKLRALAP</u>	50
	<u>RLRVSNRPRLIVS</u> ASSSGEANSDAVPSPTAAIDIKLPRRSLLVQFTCN	100
	ACGERTKRLINRVAYERGTVFLQCAGCQVYHKFVDNLGLVVEYDLREENE	150
	<u>LQGENAVDTSS</u> ED	163

Die Fragmente für die Klonierung in die Fusionsproteine entsprechen den unterstrichenen Aminosäuresequenzen. Der rot markierte Bereich entspricht der Transitsequenz des ET1, der blau markierte der Sequenz, die homolog zur Zinc-Ribbon-Domäne des TFIIIS ist. Allerdings wurde durch den Einsatz modifizierter Primer ein neues Startcodon in die DNA-Sequenz eingefügt. Daher ist im Vektor das Isoleucin (erste AS des blau unterstrichenen Bereichs) in der Sequenz durch ein Methionin ersetzt. Die Sequenzen und die Klonierungsstrategie sind in 2.2.3.3 genauer beschrieben.

Nach der Sequenzierung aller vier Klone wurden die Etched1-Intein Fusionsplasmide transformiert und überexprimiert. Das Fusionsprotein aus dem TFIIIS-homologen Bereich, C-terminal in den Vektor pTYB12 kloniert, wurde bei 37°C überexprimiert (s. Abbildung 21). Es sind sowohl ohne als auch mit IPTG Induktion Proteinbanden, des für dieses Fusionsprotein erwarteten Molekulargewichts, in Bakterienlysaten und dem Überstand der Lysate, detektierbar. Der Überstand wurde für eine Affinitätschromatografie auf eine Säule mit Chitinbeads aufgegeben (Intein-Chitin-Affinität, 2.2.3.3, Abb. 7).

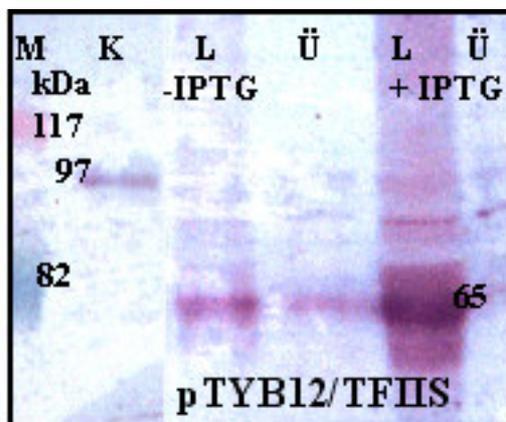


Abbildung 21

Lysate und Überstände von, mit dem Intein-*Etched1*-TFIIIS Fusionsprotein transformierten, Bakteriensuspensionen, mit und ohne IPTG-Induktion, Banden bei 65 kDa entsprechen dem Fusionsprotein des 56 kDa Intein plus dem 10 kDa großen Bereich der zu TFIIIS homologen Domäne des ET1-Proteins. Zur Expressionskontrolle wurde das pMYB5-Intein-Fusionsprotein (K) ebenfalls überexprimiert und aufgetragen (97 kDa).

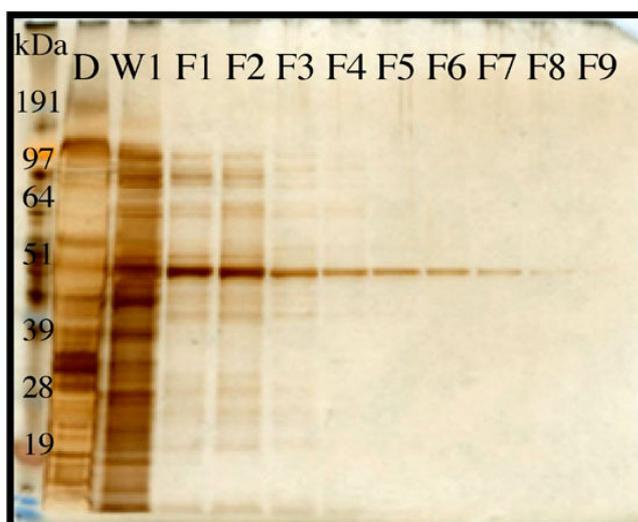
L = Bakterienlysat

Ü = Überstand des zentrifugierten Lysates

-IPTG = ohne IPTG Induktion

+IPTG = IPTG Induktion

Die Säulenaufreinigung des pTYB12 TFIIIS Intein-Fusionsprotein wurde mit Protein aus dem Überstand von transformierten, überexprimierenden, lysierten und pelletierten Bakterien durchgeführt. Die Proteingele mit den Proben wurden einer Silberfärbung unterzogen. Die durchgehend sichtbaren Proteinbanden in den einzelnen Fraktionen lagen bei ca. 47 kDa.



Dieses Molekulargewicht kann weder dem Intein-(Rest)-Protein, es besitzt ein Molekulargewicht von 55 kDa und sollte noch über Affinität an die Chitinbeads gebunden sein, noch dem TFIIIS-homologen ET1-Zielprotein zugeordnet werden. Das verkürzte ET1-Zielprotein sollte ein Molekulargewicht von 11 kDa besitzen. Ein Protein dieses Molekulargewichts kann hier aber in keiner Fraktion detektiert werden.

Abbildung 22 Gel (Nu-PAGE/MOPS-Puffer) mit je 20 µl Proteinprobe aus Durchlauf (D), der ersten Waschfraktion (W1) und den Fraktionen 1-9 der Elution beladen. Die Auftrennung erfolgte für 50 min, danach erfolgte eine Silberfärbung. Das gesuchte 11 kDa Etched1-Protein ohne Signalsequenz ist trotz hochsensitiver Silberfärbung nicht zu detektieren.

Da die Abspaltung des Zielproteins mit dieser Methode nicht zu erreichen war, sollte von der Firma BioGenes ein Peptid synthetisiert und zur Immunisierung von Kaninchen und damit zur Herstellung polyklonaler ET1 Antikörper verwendet werden.

3.2.3 Proteingele, Westernblots und Immunodetektion versch. Pflanzengewebe

Von der Firma BioGenes (Berlin) wurde zur Immunisierung zweier Kaninchen ein Peptid hergestellt. Es besteht aus 11 Aminosäuren inklusive eines C-terminalen Cysteins für die Kopplung an einen Carrier:

SDAVPSPTEA-C

Das Epitop (**grün**) befindet sich hinter dem Bereich der Transitsequenz (**rot**):

ET1	MTTTAAGHGCCWAGIPPFALLPRILSTGRETPPPRASLVASSKLRALAP	50
	RLRVSNRPRLIVSASSSGEANSDAVPSPTEAAIDIKLPRRSLVQFTCN	100
	ACGERTKRLINRVAYERGTVFLQCAGCQVYHKFVDNLGLVVEYDLREENE	150
	LQGENAVDTSSSED	163

Polyklonale Antikörper gegen dieses Peptid können dadurch theoretisch sowohl gegen das Prä-Protein mit der Transitsequenz als auch nur gegen das prozessierte Protein eingesetzt werden. Gleichzeitig kann auch das Proteinprodukt des *Zmzr1* detektiert werden, weil die Sequenz dieses Epitops absolut identisch im vorhergesagten ZMZR1-Protein vorhanden ist. Bei der anderen Wildtypelinie B73 ist eine Aminosäure der *Etched1*-Sequenz im Bereich des Epitops ausgetauscht: **SDAAPSPTEA**. Die vierte Aminosäure dieser Peptidsequenz ist dort Alanin statt Valin. Vermutlich sind daher die Antikörper auch für Proteine der Linie B73 geeignet, da eine aliphatische Aminosäure durch eine kleinere aliphatische Aminosäure substituiert ist.

Zur Detektion der Proteine wurden verschiedene Gewebe aus den Linien *et1-ref*, LC und einer Albino-Linie (grüne und weiße Sämlinge durch Auskreuzung) zu verschiedenen Zeitpunkten aufgearbeitet. Dabei wurde das Gesamtprotein aus den oberirdischen Bereichen von Sämlingen isoliert und auch Chloroplasten-Protein aus den vorher isolierten Chloroplasten extrahiert (s. 2.2.3.1, 2.2.13). Die Konzentrationsbestimmung der Proben erfolgte durch Doppelbestimmungen nach Bradford (1976). Die Proben wurden auf NuPAGE Fertiggele (12%) aufgetragen und nach dem Lauf geblottet. Die Westernblots wurden erst mit Ponceau-Reagenz gefärbt und gescannt und danach der Immunodetektion (s. 2.2.3.2.5) mit den Antikörpern unterzogen.

Parallel wurden auch die Prä-Immunsereen 4206 und 4207 getestet (2.2.17). Hier zeigten sich aber keine Banden im Bereich der für das ET1-Prä-Protein erwarteten 18 kDa, alle Banden waren größer als 35 kDa (ohne Abbildung). So konnten die Antiseren eingesetzt werden, ohne daß zu befürchten war falsch positive Banden, im Molekulargewichtsbereich des putativen ET1-Proteins, zu detektieren. Später wurde aber nur noch der Antikörper 4207 verwendet, da bei der Verwendung dieses Antikörpers unterschiedliche Protein-Banden bei LC und *et1-refl* Linien detektiert werden konnten.

Die Detektion mit dem 1:500 verdünnten 1.Ak (4207), dem 1:1000 verdünnten 2.AK (Anti-Kaninchen-AK) eines Westernblots zeigte ein unterschiedliches Bild, bezüglich der Größe einzelner Proteinbanden in Gesamtprotein und Chloroplastenprotein der beiden untersuchten Linien.

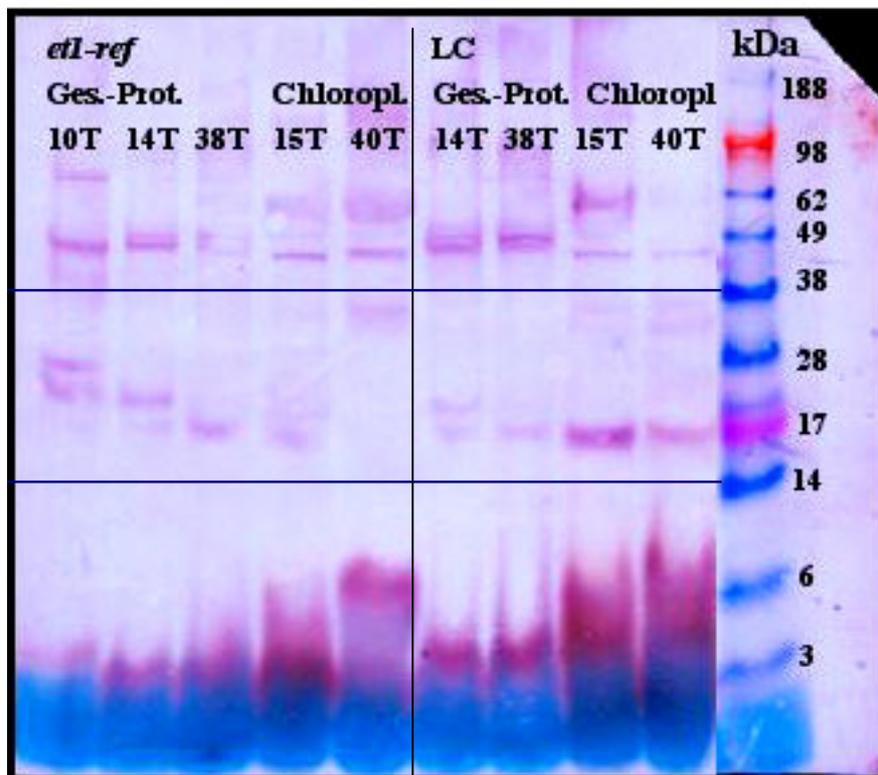


Abbildung 23
Gesamtprotein und Chloroplastenprotein von *et1-ref* und LC, nach verschiedenen Zeitpunkten (T= Tage nach der Keimung). Die Proben wurden über ein 10%iges Nu-PAGE / MES Gel aufgetrennt und das Gel geblottet. Das putative ET1-Protein besitzt ein Molekulargewicht von ca. 18 kDa. In diesem Größenbereich ist ein deutlicher Unterschied der Proteinbanden zu den verschiedenen Zeitpunkten und den beiden Linien *et1-ref* und LC zu erkennen.

Auf dem Westernblot ist deutlich zu erkennen, daß Unterschiede der Proteinbanden im Bereich um 18 kDa, die in ihrer Größe dem putativen ET1-Protein entsprechen, bestehen. Bei 10 Tage alten *et1-ref* Sämlingen kann man eine Doppelbande mit einem Molekulargewicht von ca. 23 und 26 kDa detektieren. Bei 14 Tage alten Sämlingen ist ebenfalls eine Doppelbande zu sehen, sie hat sich aber zu kleineren Molekulargewichten von 20 und 23 kDa verschoben. Bei 38 Tage alten Sämlingen ist die 23 kDa Bande nur schwach zu erkennen und die 20 kDa Bande tritt in den Vordergrund. Die Proteinbanden der 15 Tage und 40 Tage alten Chloroplasten aus der Linie *et1-ref* sind sehr schwach. Dadurch ist eine Aussage bezüglich

der Bandengröße schwierig. Es könnte sich bei den Proteinbanden der 15 Tage alten Chloroplasten um eine Doppelbande, entsprechend der Größe der Gesamtproteinbanden der 38 Tage alten Sämlingen handeln. Es sind keine Proteinbanden der 40 Tage alten *etl-ref* Chloroplasten zu erkennen. Die Spur mit dem Gesamtprotein aus 14 Tage alten LC-Pflanzen zeigt eine Doppelbande die, wie bei gleichalten *etl-ref* Pflanzen, 20 bzw. 23 kDa groß ist. Beim Gesamtprotein der 38 Tage alten Pflanzen ist die höhere Bande der Doppelbande nahezu verschwunden, wie bei der Linie *etl-ref*. In den Chloroplasten tritt nach 15 und 40 Tagen eine Bande auf die um 18 kDa groß ist. Diese Größe entspricht etwa dem unprozessierten Protein.

Zur genaueren Überprüfung und gleichzeitiger Analyse von Pflanzen die zu anderen Zeitpunkten geerntet, bzw. deren Chloroplasten isoliert wurden, wurden neue Westernblots hergestellt. Diese wurden jedoch nicht mit den Reagenzien BCIP/NBT und alkalischer Phosphatase detektiert, sondern mit HRP (Horseradish Peroxidase) und einem Gemisch aus Luminol, Coumarsäure und H₂O₂. Zusätzlich zu *etl-ref* und LC Pflanzen wurden auch Proteine aus weißen und grünen Albino-Linien bearbeitet.

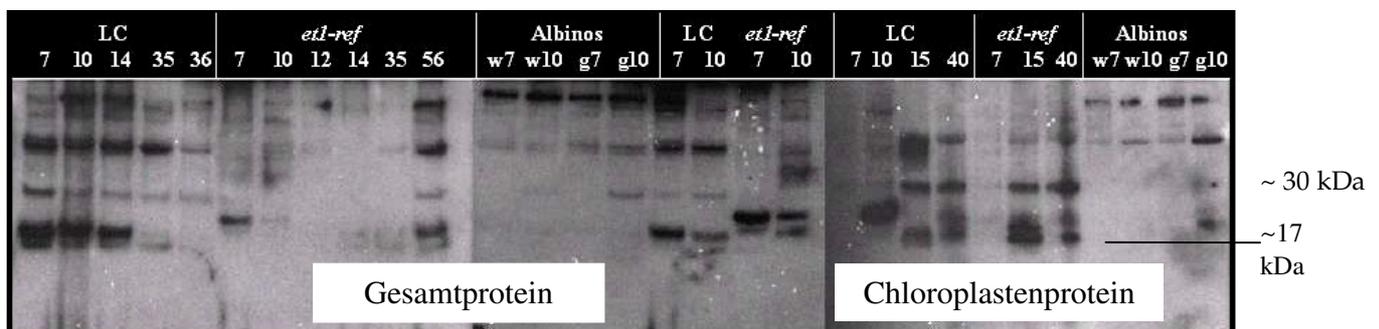


Abbildung 24

Westernblots mit Gesamtprotein und Chloroplastenprotein der Linien LC, *etl-ref* und weißen sowie grünen Pflanzen aus einer Albino Linie. Die Zahlen bedeuten Zeitpunkt der Aufarbeitung nach der Keimung. Links ist Gesamtprotein, auf der rechten Seite Chloroplastenprotein aufgetragen.

Bei grünen und weißen Pflanzen aus einer ausgekreuzten Albino-Linie sind weder im Chloroplastenprotein noch im Gesamtprotein nennenswert starke Signale im Bereich der erwarteten 18 kDa des ET1 zu erkennen. Wie im vorherigen Versuch sind beim LC-Gesamtprotein bis zu 14 Tagen erst Doppelbanden zu erkennen, die sich aber danach zu einer kleineren Bande (17 kDa) verschieben. Bei den *etl-ref* Spuren hingegen zeigt sich bei 7 und bei 10 Tage alten Pflanzen die größere Doppelbande. Dabei ist die obere dieser Banden bei 7 Tage alten Pflanzen noch etwas stärker als bei 10 Tage alten Pflanzen (Abb. 24, Mitte). Bei 14, 36 und 56 Tagen wird eine Doppelbande wie bei bis zu 14 Tage alten LC Pflanzen detektiert. Eine etwa 30 kDa große Proteinbande taucht im *etl-ref* Gesamtprotein bei jüngeren

Pflanzen nicht auf. Diese erscheint erst bei den 56 Tage alten *etl-ref* Pflanzen. Sie tritt aber in allen Altersstufen beim Gesamtprotein der LC-Pflanzen und in 10 Tage alten "grünen" Albinos auf.

In 7 Tage alten Chloroplasten kann in keiner der getesteten Linien ein Protein des Molekulargewichts um 18 kDa detektiert werden, obwohl alle Spuren sehr gleichmäßig beladen waren (Ponceaufärbung, n. gezeigt). In Chloroplasten von 10 Tage alten LC Pflanzen ist ein Protein mit einer Größe von ca. 25 kDa detektierbar. Bei 15 Tage alten Chloroplasten ist eine kleine Bande, die etwa 17-18 kDa entspricht, zu sehen. Nach 40 Tagen ist eine Doppelbande zu detektieren, die in etwa den Doppelbanden der Proteine aus 15 und 40 Tage alten Chloroplasten von *etl-ref* entspricht. Diese Doppelbanden scheinen ein Molekulargewicht wie die Doppelbande im Gesamtprotein der bis zu 14 Tage alten LC-Pflanzen zu besitzen (18+20 kDa). 10 Tage alte Chloroplasten grüner Albinos zeigen eine ca 22-23 kDa große Bande, etwa in der Größe der größeren Doppelbande des *etl-ref* Gesamtprotein nach 7 Tagen. Es scheint daher eher eine Gemeinsamkeit von Albino-Proteinen zu *etl-ref* Proteinen, als zu Wildtyp-(LC)-Proteinen zu bestehen.

Die Westernblots mit Antiseren gegen das synthetisierte ET1-Peptid konnten nicht dem Nachweis des ET1-Proteins in Sämlingen und Chloroplasten dienen. Es handelt sich wohl um Proteine die zum ET1-Peptid homologe Domänen aufweisen. Wäre das Antiserum spezifisch für das ET1-Protein, müßte im Gesamtprotein der Wildtyplinien eine ca. 18 kDa große Bande des unprozessierten ET1-Proteins detektiert werden können. Zusätzlich sollte man in den Chloroplastenproteinen des Wildtyps ein prozessiertes, 11 kDa großes Protein nachweisen können. Es ist bereits gezeigt worden, daß *in vitro* translatiertes ET1 Protein in Chloroplasten transportiert wird (Garg, 2002).

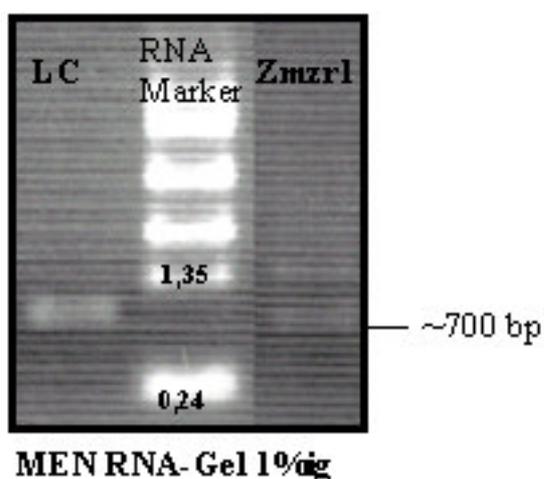
Um die Antiseren auf ihre Spezifität zu testen könnte daher auch *in vitro* translatiertes ET1-Protein verwendet werden.

3.3 Funktionsanalysen zum *EtchedI*-Gen

3.3.1 *In vitro* Transkription von LC cDNA, *ZmzrI* cDNA und einem LC cDNA-Fragment ohne Transitsequenz

Um Funktionsanalysen zum ET1-Protein durchführen zu können, sollte RNA von der *EtchedI* cDNA (LC/c9.1) und von der cDNA des zum *EtchedI* Gen sehr homologen *ZmzrI* Gens *in vitro* transkribiert werden. Außerdem sollte eine 5' verkürzte RNA einer *EtchedI* cDNA (LC), die der Aminosäuresequenz ohne Transitsequenz entspricht, transkribiert werden. Mittels eines Reticulocyten Systems sollte aus der RNA *in vitro* das jeweilige Protein translatiert werden. Die bereits in den pBAT-Translationsvektor klonierten cDNAs von LC und *ZmzrI* wurden von Garg (Hamburg) zur Verfügung gestellt. Der Vektor mit der LC cDNA ohne Transitsequenz mußte noch über PCR hergestellt werden (s. 2.2.14.1 und Abbildung 30 nächste Seite).

Zur Vorbereitung für die *in vitro* Translation wurden die drei Klone (LC-*EtchedI* cDNA, *ZmzrI* cDNA und LC-*EtchedI* cDNA mit verkürztem 5' Ende) am 3' Ende des untranslatierten Bereiches restringiert, aus dem Agarosegel ausgeschnitten, aufgereinigt und ihre Konzentrationen bestimmt. Je 250-400 ng der DNA wurden dann für den Transkriptionsansatz verwendet. Zuerst wurde die Transkription (s. 2.2.14.2) allerdings ohne die Zugabe eines CAP-Analogons durchgeführt, weil laut Literatur kein großer Unterschied in



der Translationseffizienz Cap-markierter und nicht-markierter RNAs im Kaninchen-Reticulocytensystem besteht. Es sollte lediglich Unterschiede in der eventuell einzustellenden Kalium- und Magnesium-Ionenkonzentration geben. Da die *in vitro* Translation aber nicht funktioniert hat, wurde in den folgenden Transkriptionsversuchen das CAP-Analogon der *in vitro* Transkription hinzugefügt.

Abbildung 29 *In vitro* transkribierte RNA der linearisierten Plasmide von pBAT LC und pBAT *ZmzrI*, ohne ein Cap-Analogon hinzuzufügen. Es sind 4 µl von 100 µl aufgetragen. Die *in vitro* transkribierte RNA von pBAT *ZmzrI* zeigt eine Doppelbande ~700 bp und ~1400 bp.

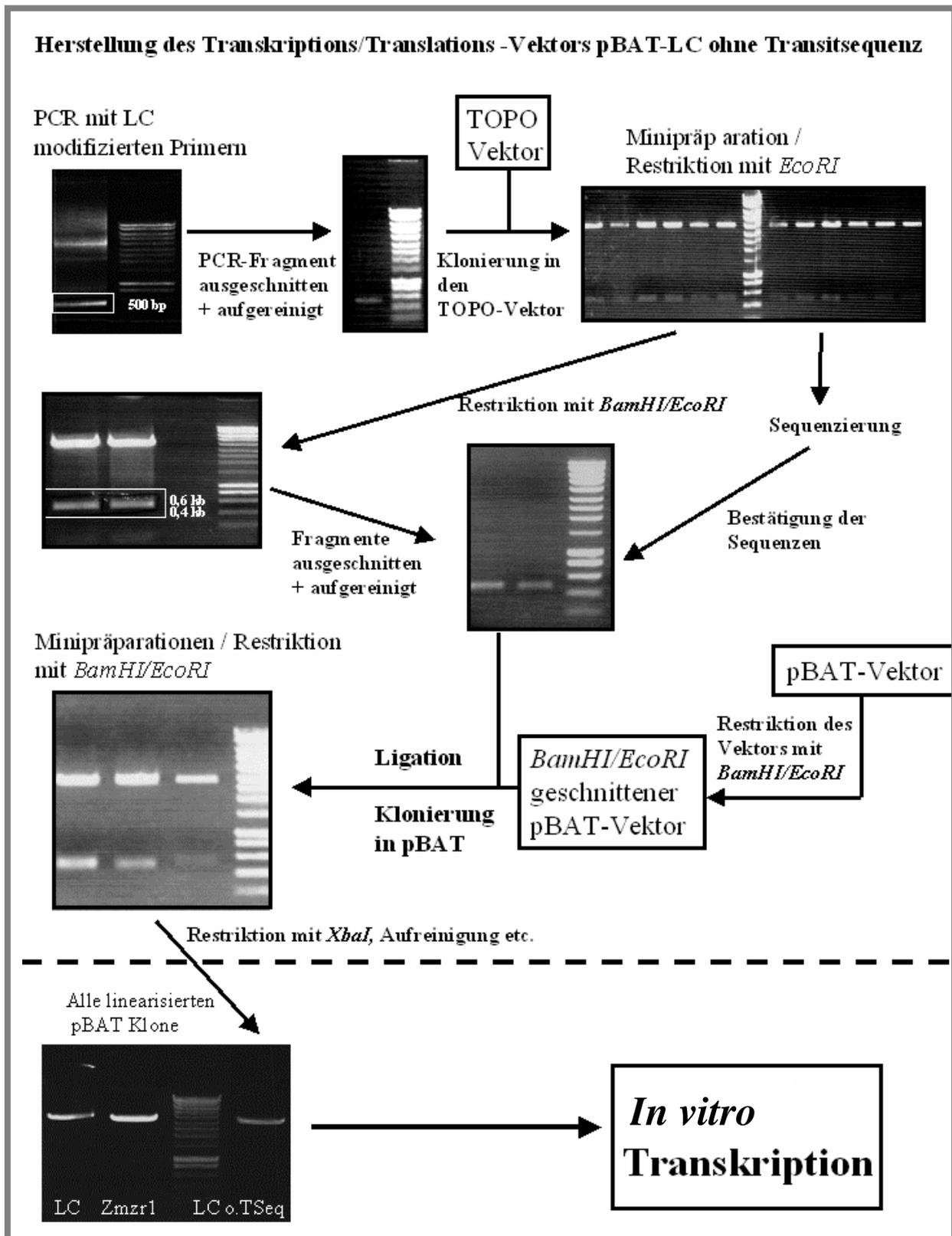
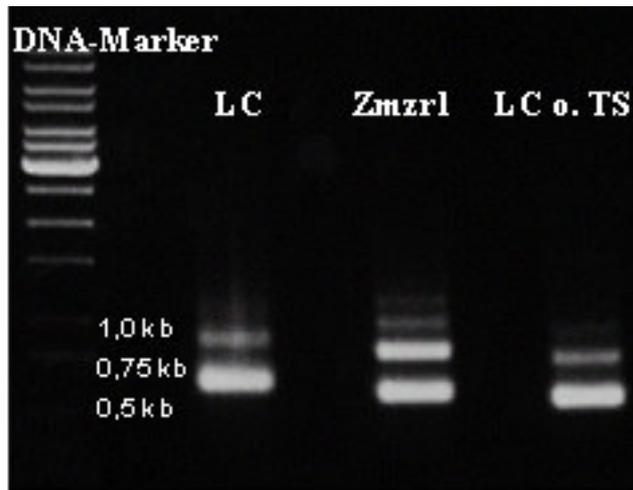


Abbildung 30 Alle nötigen Schritte und Zwischenprodukte der Herstellung des pBATEt1-ohne-Transitsequenz Vektors schematisch dargestellt und erläutert (2.2.13.1)

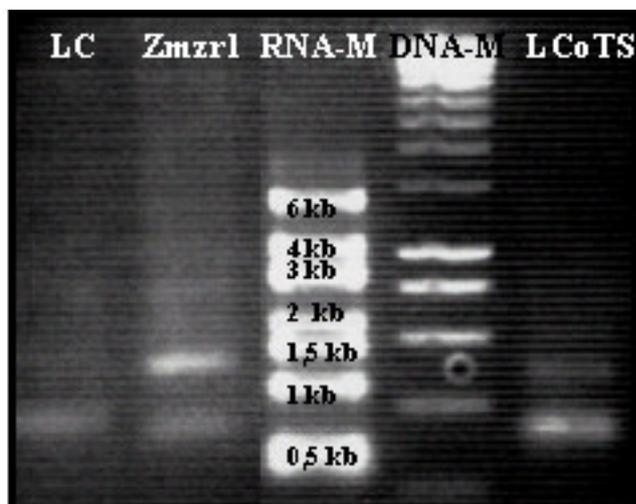
Die *in vitro* Transkription mit dem Cap-Analogon ergab in allen Fällen RNA-Doppelbanden. Dabei fällt auf, daß diese trotz der offensichtlich erfolgreichen Linearisierung (s. Abb. 30



0,8%iges Agarosegel mit TAE (DNA)

Abbildung 31 *In vitro* transkribierte RNAs auf einem DNA-Gel mit einem DNA-Marker aufgetragen um grob Größen der jeweiligen RNA abschätzen zu können und um ungefähr die Menge der transkribierten RNA zu erkennen. Es wurden 4 µl eines 100 µl großen Reaktionsansatzes aufgetragen.

Da sich die Abschätzung der Größe der Transkripte in DNA-Agarosegelen als sehr schwierig erwies und eigentlich auch jeweils nur eine RNA-Bande statt Doppel- und Mehrfachbanden erwartet wurden (Linearisierungen der Vektoren jeweils am Ende des 3' UTR schienen erfolgreich), wurden sowohl die Linearisierung als auch die *in vitro* Transkriptions-



MEN RNA-Gel 1%ig

Abbildung 32 *In vitro* translatierte RNAs der pBAT-cDNA-Klone von LC, *Zmzr1* und LC ohne Transitsequenz auf einem RNA-Agarosegel aufgetragen (je 4 µl von 100 µl Transkriptionsansatz). Zum Transkriptionsmix wurde ein Cap-Analogon hinzugefügt, um die *in vitro* Translation zu verbessern.

unten), die stärkste größere RNA-Bande wieder, wie vorher schon beobachtet, bei der RNA der *Zmzr1* cDNA vorkommt. Ausnahmsweise wurden die RNAs in einem TAE-Agarosegel getestet und ein DNA-Marker lediglich zum groben Abschätzen der Größen der *in vitro* transkribierten RNAs verwendet.

Reaktionen wiederholt. Es wurde ein RNA-Gel (MEN-Puffer) verwendet und auch ein RNA-Marker aufgetragen. Die 4 kb Bande des RNA-Markers läuft auf der gleichen Höhe wie die 1 kb Bande des DNA-Markers. Bei der Auswertung des Gelfotos fällt wieder auf, daß gerade bei der RNA von pBAT*Zmzr1* zwei Banden erscheinen.

Die größere Bande besitzt mit ca. 1300 Nukleotiden wieder die doppelte Größe der kleineren Bande (650 Nukleotide), wie bereits beim ersten *in vitro* Transkriptionsversuch ohne CAP-Analogon (s. Abbildung 29) beschrieben. Außerdem ist die Verdoppelung der Bandengröße auch ebenso bei den *in vitro* Transkripten des Vektors pBAT LC ohne Transitsequenz zu sehen (700/1400 Nukleotide). Die Größenunterschiede der kleinsten RNA-Banden von pBAT LC und pBAT *Zmzr1* sind ursächlich durch die verschieden langen 3' UTR der Genen zu erklären, da das 3' Ende bei *Zmzr1* nicht genau bekannt ist. Der *Zmzr1*-Klon wurde mit Hilfe spezifischer Primer amplifiziert und isoliert (Garg, 2002). Die RNA-Bande des Transkripts von pBAT LC ohne Signalsequenz ist erwartungsgemäß etwa 200 Nukleotide kürzer als die Bande des vollständigen pBAT LC Transkript. Diese drei *in vitro* transkribierten RNAs mit CAP-Analogon wurden dann für die *in vitro* Translationen (s. a. 2.2.14.2) mit ³⁵S-markiertem Cystein oder auch Methionin eingesetzt.

3.3.2 *In vitro* Translation

Die *in vitro* Translation wurde mit dem Rabbit Reticulocyte Lysate System, der Firma Amersham Pharmacia Biotech durchgeführt. Zuerst wurde die Translation mit nicht „gecapten“ RNAs und ³⁵S-markiertem-Methionin durchgeführt. Es konnte bei einer Einbaubestimmung und in der SDS-PAGE kein Protein der drei mRNAs detektiert werden, die Kontrolle hatte jedoch funktioniert. Zur Kontrolle ist dem Kit eine RNA (RNA B) beigelegt, von der ein Protein translatiert wird, welches als Precursor-Protein eine Protease ist. Durch diese Proteaseaktivität wird das Gesamtprotein in mehrere kleinere Polypeptide gespalten. Dadurch dient es nicht nur zur Kontrolle der Translation, sondern auch als Proteinmarker:

AS	Molekulargewicht kDa
741	82323
665	73751
460	51993
281	30348
205	21776
56	6323

Tabelle 8

Es war nicht klar, ob das einzelne radioaktiv markierte Methionin (**M** s. Abb. 33), kodiert durch das ATG der Startcodons, in den synthetisierten Proteinen ausreichend starke Signale in der SDS-PAGE bzw. bei der Einbaumessung zeigen würde. Daher wurde die *in vitro* Translation der drei RNAs mit ^{35}S -markiertem-Cystein wiederholt. Die Aminosäure Cystein (**C**) ist viel häufiger im Protein vertreten und kommt sechsmal in der LC-Etched1-Aminosäuresequenz, siebenmal in der Zmzr1-Aminosäuresequenz und viermal im verkürzten LC- ET1 ohne Transitsequenz vor.

ET1 LC	:	MTTTAAGHG CC WAGIPPFALLPRILSTG-RETP---PPRASLVASSSKLR	46
ET1 Zmzr1	:	MATTAAGYG CC LAGLPPFP LLPGILSTRLRREPS--PPRVALVASSPKLR	48
ET1 LC	:	ALAPRLRVSNRPRRLIVSASSSGEANSDAVPSPTEAAIDIKLPRRSLLVQ	96
ET1 Zmzr1	:	APAPRLRV SC GPRL---ASSSGKANSDAVPSPTEATIDIKLPRRSLLVQ	95
ET1 LC o.TS:	:	M ANSDAVPSPTEAAIDIKLPRRSLLVQ	27
ET1 LC	:	FT C N A C G ERTKRLINRVAYERGTVFL Q C A G C QVYHKFVDNLGLVVEYDLR	146
ET1 Zmzr1	:	FT C N A C G ERTKRLINRVAYERGTIFL Q C A G C QVYHKFVDNLGLVVEYDLR	145
ET1 LC o.TS:	:	FT C N A C G ERTKRLINRVAYERGTVFL Q C A G C QVYHKFVDNLGLVVEYDLR	77
ET1 LC	:	EENELQGENAVDTSSSED	163
ET1 Zmzr1	:	EENVVQGENVIDTNSSED	162
ET1 LC o.TS:	:	EENELQGENAVDTSSSED	94

Abbildung 33 Proteinsequenzen aller *in vitro* zu translatierenden Proteine. Die Aminosäure Methionin, der Startcodons, ist rot markiert, Cysteine sind blau markiert.

Die ersten *in vitro* Translations-Versuche mit ^{35}S Cystein schlugen komplett fehl. Es war durch keine Einbaubestimmung ein Einbau nachzuweisen, weil die Negativ-Kontrollen bereits viel zu hohe Werte aufwiesen, obwohl überhaupt keine RNA in die Translations-Ansätze gegeben worden war. Die verschiedenen Methoden zur Einbaubestimmungen der radioaktiv markierten Aminosäuren (3 versch. Methoden) waren: Über die Fällung der Proteine mittels kochender TCA (hatte bei Methionin gut funktioniert), die Fällung mit TCA/Casein nach Vorschrift im Reticulocytenkit und einer TCA/DOC-Fällung. Außerdem zeigten diverse SDS-PAGEs, daß auch die RNA B-Kontrolle nicht funktioniert hatte. Daher wurden sowohl mit Methionin, als auch mit Cystein als markierte Aminosäuren, der Kontroll-RNA und der RNA von pBAT-LC die Translations-Bedingungen getestet. Bei diesen Tests wurden die Kaliumionen-Konzentrationen von 40, 115, 140, 165, 190, 215 und 240 mM mit pBAT-LC-RNA verwendet, aber trotzdem wurde bei den Einbaubestimmungen kein Transkript gemessen, bzw. auf dem Gel (mit Imagerplatte) nachgewiesen.

Die RNA-Kontrollen wurden beide, für ^{35}S -Methionin und ^{35}S -Cystein, mit 190 mM Kalium behandelt, aber nur bei der Methionin-Kontrolle konnte ein geringer Einbau des radioaktiv markierten Methionins gemessen und eine sehr schwache Proteinbande (ca. 17 kDa) im Gel nachgewiesen werden (nicht gezeigt).

Aufgrund der negativen Ergebnisse wurden dann *in vitro* Transkriptions-Ansätze mit dem CAP-Analogon durchgeführt (s. 2.2.14.2) und diese „gecapten“ RNAs mit markierten Cystein und Methionin translatiert. Es konnte, bis auf eine sehr schwache Bande (ca. 17 kDa) bei der *in vitro* Translation der pBAT-LC-RNA mit ^{35}S -Cystein, kein Protein nachweislich translatiert werden (nicht gezeigt).

3.3.3 Transgene sense und antisense Pflanzen

Transgene Pflanzen, mit Expressionskonstrukten der *Etched1* cDNA (c9.1) in sense und antisense Orientierung, sollten hergestellt werden um die Auswirkung auf den Phänotyp von Körnern und Sämlingen zu testen. Damit könnte die Funktion des *Etl* Gens bzw. des *Etl*-Genproduktes/ ET1-Proteins näher charakterisiert werden. Zur Expression der Transgene wurde der in Mais konstitutiv stark exprimierte Actin Promotor des Actin1-Gen aus Reis verwendet (McElroy *et al.*, 1990). Die Herstellung der Sense- und Antisense-Plasmide für die transgenen Pflanzen erfolgte wie in 2.2.11 beschrieben. Sowohl das pAct*Etl*-Sense-Konstrukt als auch das pAct*Etl*-Antisense-Konstrukt wurden mittels biolistischer Transformation in Mais transformiert. Zur Selektion der erfolgreichen Transformation erfolgte eine Co-Transformation mit einem 35Spat-Plasmid (zur Basta-Resistenz) und teilweise zusätzlich mit einem 35S-GFP-Plasmid. Insgesamt wurden in 3 Experimenten 193 Embryonen, bzw. embryogene Kalli mit dem pAct*Etl*-Sense Konstrukt und in 10 Experimenten 720 Embryonen, bzw. embryogene Kalli mit dem pAct*Etl*-Antisense-Konstrukt biolistisch transformiert.

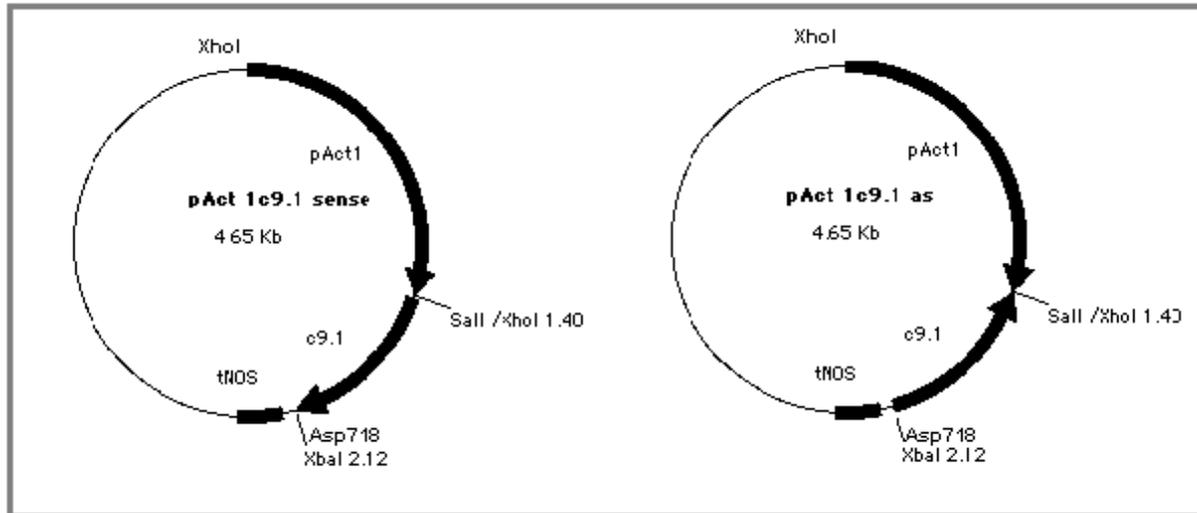


Abbildung 34 Darstellung der pActin*EtI*-Sense- und Antisense-Vektoren mit Restriktions-Schnittstellen

3.3.3.1 Analyse transgener pAct*EtI*-Sense Pflanzen

Positive transgene *EtI*-Sense-Pflanzen sind unter anderem die Linien 1921, 1933, 1934, 1940, 1946 und 1947 (Tabelle 9). Diese Linien wurden mittels Southernblot und einige auch mit einem Northernblot analysiert (Abb. 35 + 36).

GH-Nr.	Transformiert in Linie
1921	A188xPa91
1933	A188xPa91
1934	A188xPa91
1940	A188xPa91
1946	A188xPa91
1947	H99xPa91

Tabelle 9

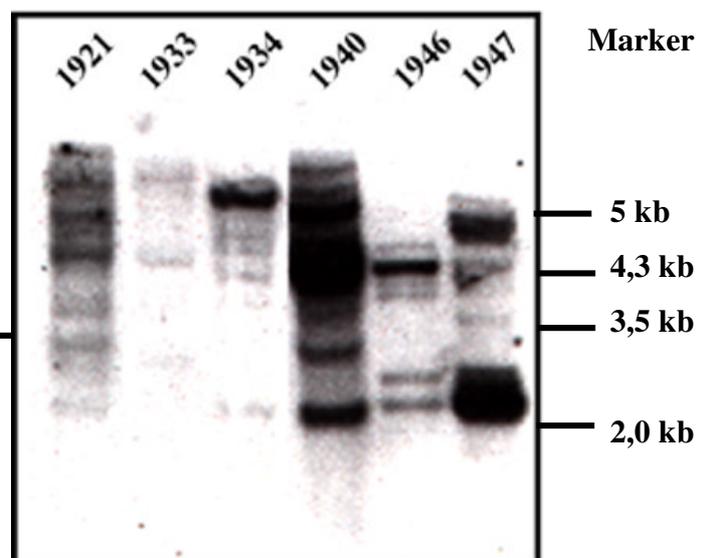
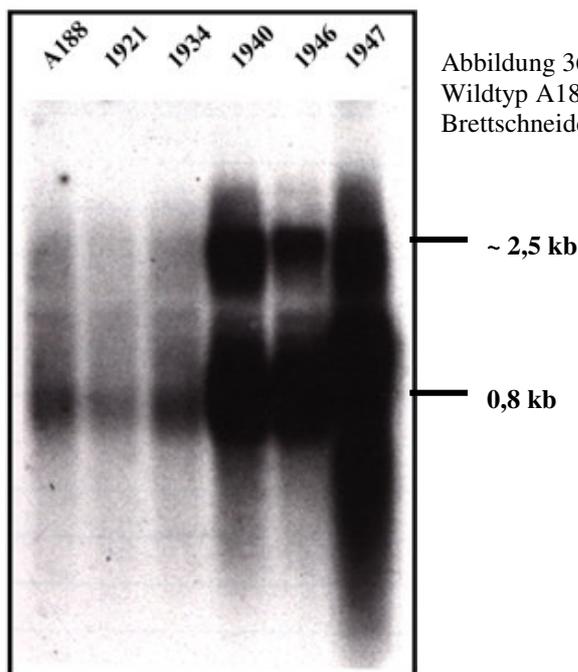


Abbildung 35 Genomischer Southernblot DNA transgener pAct*EtI*-Sense-Pflanzen, *XhoI* und *Asp718* geschnitten (komplettes Transformations-Konstrukt, ca. 2,1 kb) Detektion mit einer DIG-Actin-Sonde (Daten von Dr. Reinhold Brettschneider)

Für den genomischen Southernblot sollte mittels der Restriktion durch die Enzyme *Asp718* und *XhoI* (Abb. 34) der Bereich des Promotors mit der, in sense Orientierung klonierten, *EtI* cDNA (2,1 kb) aus dem Plasmid (Abb. 34) ausgeschnitten werden können. Ist eine Bande der Größe von 2,1 kb im Southernblot zu detektieren, konnte ein komplettes Konstrukt (ohne NOS-Terminator) transformiert werden. Fast alle der im Southernblot gezeigten transgenen Sense-Linien zeigen mit der Actin-Sonde eine starke Hybridisierung, und meist auch mehrere Banden. In den Linien 1940, 1946 und 1947 ist vermutlich das vollständig Konstrukt des Sense-Transgens vorhanden.



RNA 4 Wochen alter Pflanzen, der bereits in Southernblots getesteten transgenen Linien, wurde in einem Northernblot (Abb. 36) mit der *EtI* cDNA-Sonde hybridisiert. Die Expression der *EtI*-RNA der Linien 1940, 1946 und 1947, die vollständige Konstrukte enthalten (Abb. 35), ist um ein vielfaches höher, als zum Beispiel in der Wildtyp Linie A188, in der nur die endogene *EtI*RNA exprimiert wird. Aufgrund der starken *EtI*-(Über-)Expression wurden deshalb bevorzugt die Nachkommen der Linien 1940 und 1946 weiter analysiert. Ein starke Expression der Transgene wird durch den sehr starken Actin-Promotors ermöglicht.

Aus den geselbsteten Linien 1940 und 1946 entstanden die Linien 2010, 2011, 2012, 2013, 2014, 2015, 2017, 2034.1, 2034.2 und 2034.3 (Tabelle 10). Einige der Körner zeigen den *etched1*-Phänotyp (Abb. 37)

GH-Nr.	Hergestellt aus Linie
2010	1946 ⊗
2011	1946 ⊗
2012	1946 ⊗
2013	1946 ⊗
2014	1940 ⊗
2015	1940 ⊗
2017	1940 ⊗
2034.1	1946 ⊗
2034.2	1946 ⊗
2034.3	1946 ⊗

Tabelle 10

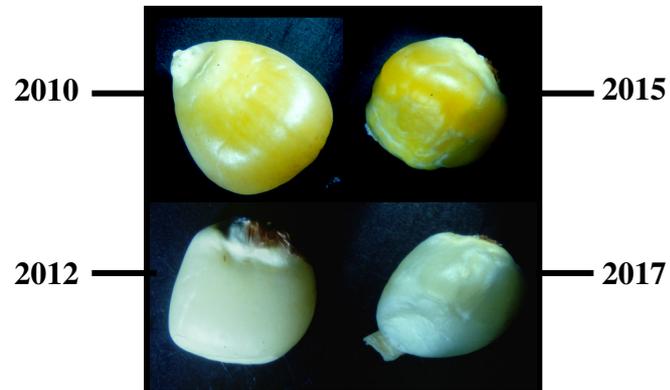


Abbildung 37 F1-Körner transgener *EtI*-Sense-Linien. Das Korn der Linie 2010 zeigt einen schwachen, Körner der Linien 2015, 2017 einen stärkeren *etI*-Phänotyp. Das Korn der Linie 2012 hat keinen *etI*-Phänotyp.

Als Ergebnis der Transformationen mit dem *EtI*-Sense-Konstrukt sind nur phänotypische Veränderung der Körner (Abb. 37) und nie der Sämlinge aufgetreten. D. h. eine zusätzliche, transgene *Etched1* Gendosis hatte keinen visualisierbaren Effekt auf die meisten regenerierten *etI*-sense transgenen Pflanzen. Die *EtI*-Sense transgenen Linien haben fast alle mindestens einen leichten *etched1* Phänotyp im Korn gezeigt. Die Überexpression des *EtI* Gens hat in Körnern also eher zu einem Antisense-Effekt geführt. Die Linien 2015 und 2017 wurden geselbstet und für neue Southernanalysen verwendet (siehe Abbildung 38A + 38B).

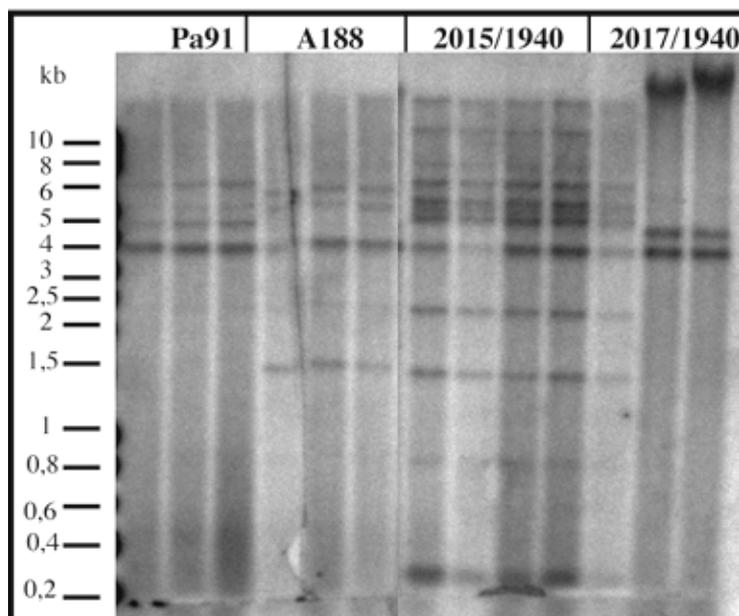


Abbildung 38A
Genomischer Southernblot mit Wildtyplinien (Pa91, A188) und transgenen pAct*EtI*-Sense Nachkommen, geselbstete Linie 2015 (aus Linie 1940) und geselbstete 2017 (aus Linie 1940). *HindIII*-Restriktion, Hybridisierung mit der *EtI* cDNA-Sonde

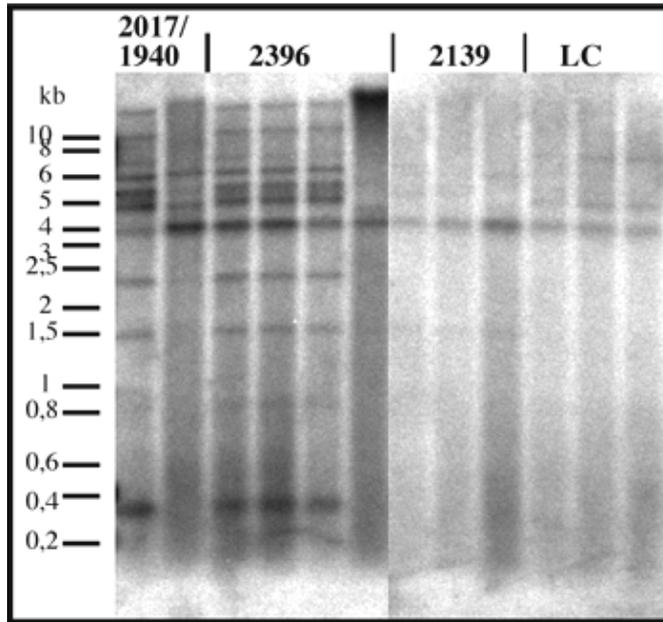


Abbildung 38B Genomischer Southernblot mit Nachkommen der geselbsteten Linie 2017 (1940), 2139 einer pAct*Et1*-Sense negativen, aber pat positiven Linie und LC DNA zur Kontrolle. Die Linie 2396 ist auch aus einer Selbstung der Linie 2015 entstanden. *HindIII*-Restriktion, Hybridisierung mit der *Et1* cDNA -Sonde.

Die Southernblots der DNA der Nachkommen der Linien 2015 und 2017 zeigen viele zusätzliche Banden im Vergleich zu A188, LC und negativen pAct*Et1*-Sense transgenen Pflanzen (2139). Die Nachkommen der Linie 2015 (2015 und 2396) zeigen dabei ein sehr homogenes Bandenmuster. Einzige Ausnahme dabei ist die nicht richtig restringierte 4. DNA der Linie 2396. Innerhalb der geselbsteten Linie 2017 ist die Anzahl der Banden und die Struktur der Bandenmuster nicht so homogen. Allerdings sind die zweite und die dritte DNA von 2017 nicht vollständig mit *HindIII* geschnitten. Die 1,5 kb Bande scheint aus der Linie A188 zu stammen. Wenn sie nach mehreren Generationen fehlt (2017/4) liegt das am gemischten genetischen Hintergrund der ursprünglichen Transformanden (aus A188x Pa91). Nach mehreren Generationen wurde A188 herausgekreuzt. Die Banden mit den Größen 2,3 kb, 0,9 kb und 0,3 kb und Banden über 10 kb erscheinen nur bei transgenen Linien. Hier haben Fragmente der Actin*Et1*-Antisense Konstrukte mit der *Et1* cDNA-Sonde hybridisiert.

Etched1-Phänotypen der Sämlinge konnten bei den geselbsteten Nachkommen der Linie 2017 nicht mehr beobachtet werden, obwohl die Elternkörner noch einen *etched1*-Phänotyp gezeigt hatten (Abb. 35). Nachkommen aus der Selbstung von Körnern der Linie 2015 hingegen, zeigten weiterhin einen *etched1*-Phänotyp (Abbildung 39).



Abbildung 39 Nachkommen aus geselbsteten Körnern der Linien 2015 und 2017 (F2-Generation der transgenen Ursprungslinie 1940). Nachkommen der Linie 2015 zeigen einen „etched“-Phänotyp, die Nachkommen der Linie 2017 nicht, obwohl die Elternpflanze aus einem „etched“-Korn stammt.

3.3.3.2 Analyse transgener pAct*Et1*-Antisense Pflanzen

Mittels Southernblots wurden auch transgene Antisense-Pflanzen analysiert. Der Nachweis erfolgte über eine DIG-markierte *Etched1*-Sonde (LC (c9.1) cDNA). Die Restriktion erfolgte mit den Enzymen *XhoI* und *Asp718* um das Fragment mit dem Actin-Promotor und der *etched1*cDNA, in antisense Orientierung, komplett auszuschneiden (Abb. 34).

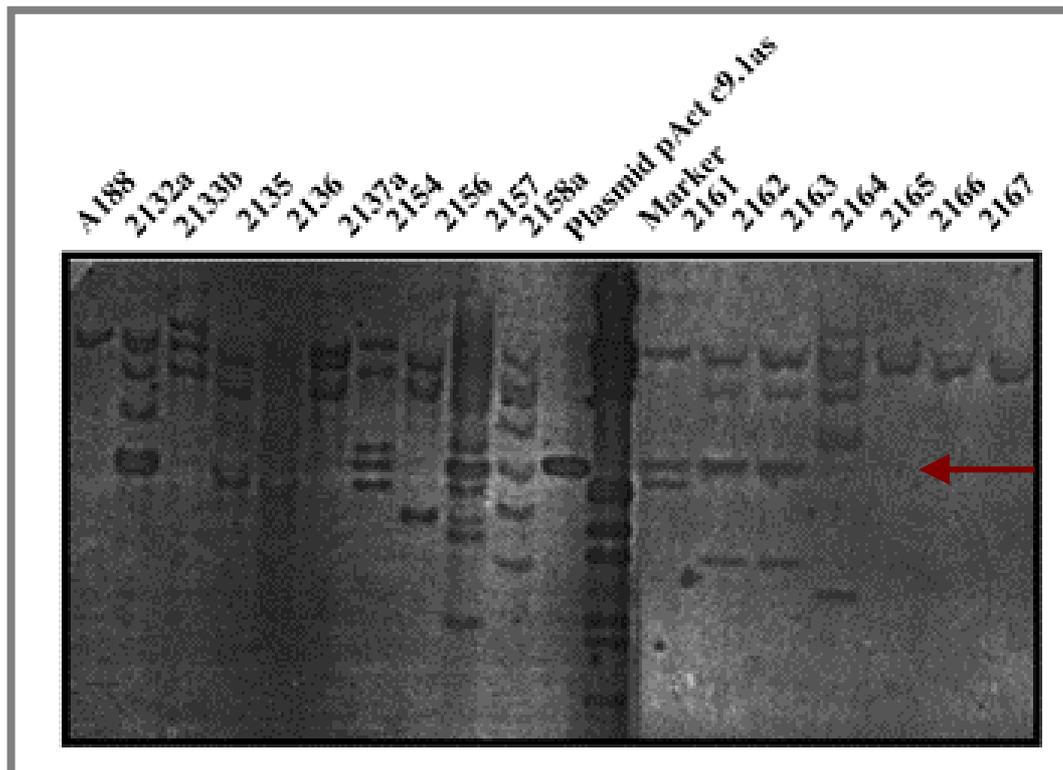


Abbildung 40 Genomischer Southernblots von transgenen Antisense-Pflanzen. Die DNAs wurden mit den Enzymen *XhoI* und *Asp718* restringiert. Die Sonde ist ein DIG-markiertes *Etched1* cDNA-Fragment. Diese Daten und die Pflanzen wurden freundlicherweise von Dr. Reinhold Brettschneider zur Verfügung gestellt. Als Kontrolle wurde das geschnittene Antisense-Plasmid eingesetzt. Alle transgenen Pflanzen, die eine Bande der Größe (2,1 kb) dieser Kontrolle (Pfeil) enthielten wurden geselbstet oder gekreuzt und weiter analysiert.

Transgene Antisense-Pflanzen, die genotypisch positiv waren, d.h. laut genomischem Southernblot (Abb. 38) ein Fragment in Plasmidgröße enthielten, wurden geselbstet bzw. gekreuzt. Von den Nachkommen wurde je 8 ausgepflanzt:

GH Nr.	Anzahl	Kreuzung aus GH Nr.	Ursprünglich transformiert in Linie	Basta-Resistenz bei Nr.
2661	8	2105 x A188	A188xH99	Keine Resistenz bei allen 8 gewachsenen Pflanzen
2662	8	2119 b ⊗	A188	2, 3, 5, 6 von 8 Pflanzen
2663	8	2120 ⊗	A188	Keine Resistenz bei allen 8 gewachsenen Pflanzen
2664	8	2132 a ⊗	A188xH99	6, 7, 8 von 8 Pflanzen
2665	8	2135 ⊗	A188xH99	2, 6, 8 von 8 Pflanzen
2666	8	2154 ⊗	A188xH99	3,7 von 8 Pflanzen
2667	8	2158a ⊗	A188xH99	2, 3, 5, 6 von 8 Pflanzen
2668	8	2161 ⊗	Q2	Keine Resistenz bei 1, 2 keimt schlecht, alle anderen gar nicht
2669	8	2162 ⊗	A188	5 , 1-4 keimen schlecht, 6-8 keimen gar nicht
2670	8	2163 ⊗	A188	Nur 1 sieht normal aus, aber keine Resistenz, 2 keimt schlecht, alle anderen haben gar nicht gekeimt

Tabelle 11

In den Abbildungen 41 und 42 werden einige Nachkommen dieser transgenen Antisense-Pflanzen gezeigt.

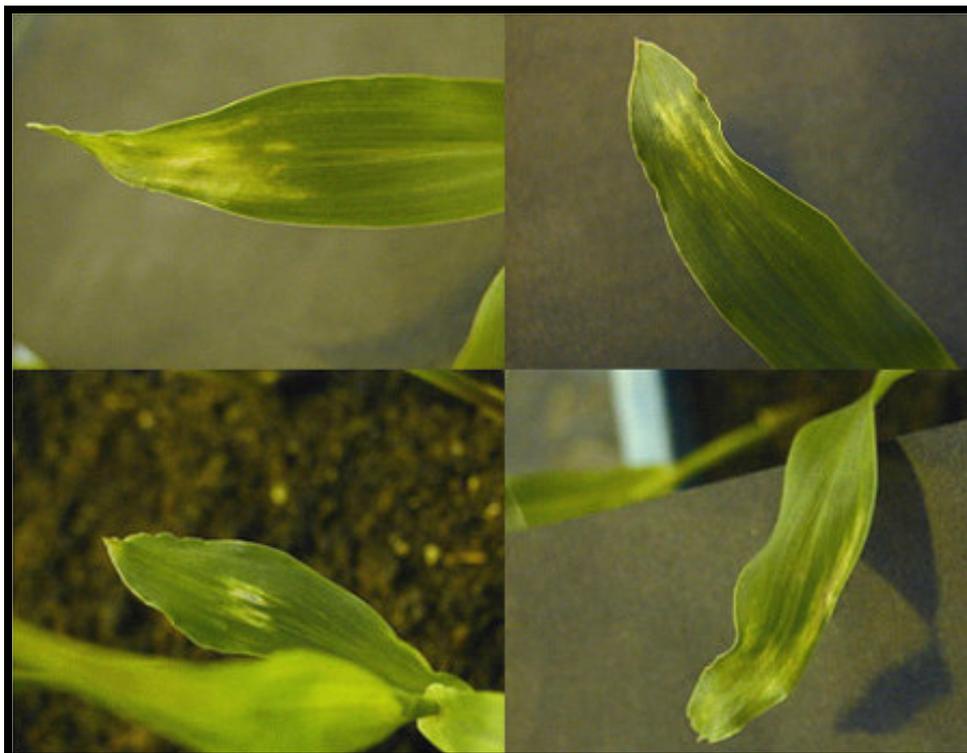


Abbildung 41
Vier Nachkommen einer positiv getesteten transgenen pActEtl-Antisense-Pflanze (Southernblot), F1-Generation nach Selbstung

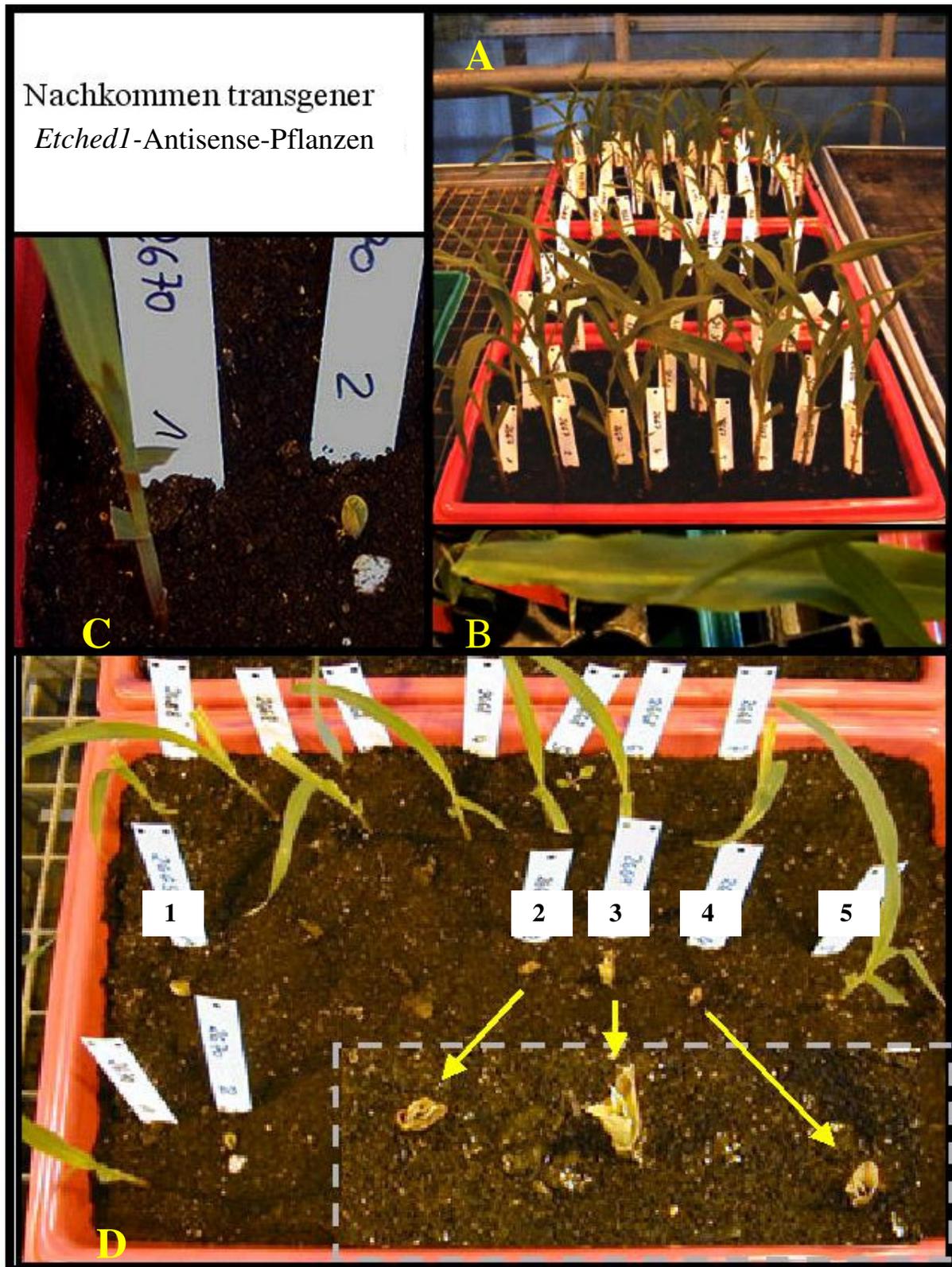


Abbildung 42 Diese Abbildung zeigt Nachkommen von genotypisch positiv transgenen *Etched1*-Antisense-Pflanzen. **A**: Die meisten dieser Pflanzen entsprechen einem normalen Phänotyp junger Maispflanzen. **B** Nahe der Mittelrippe des dritten Blattes eine deutliche Veränderung der Pigmentierung dieses Blattes. Die Bilder zu **C** und **D** zeigen einige deutlich blasser und vor allem fehlentwickelte junge Pflänzchen, keine normale Entwicklung nach der Keimung. Bei der unter **C** dargestellten Linie ist ein Sämling einer Linie normal und der andere fehlentwickelt. Die bei **D** in der Mitte dargestellte zeigt vier fehlentwickelte Sämlinge von fünf Geschwistern.

Die Transformationen mit dem Antisense-Konstrukt haben, im Gegensatz zu den Sense-Transformationen, häufiger Veränderungen des Phänotyps von Sämlingen bewirkt. Dabei waren aber die „klassisch virescenten“ Pflanzen, sowohl bei den direkt regenerierten Pflanzen, als auch bei deren Nachkommen nie vertreten. Es traten aber Sämlinge mit hellen Blattbereichen oder Streifen auf (Abbildung 41) und auch welche, die deutliche Störungen bezüglich der Keimung zeigten.

Diese Sämlinge (siehe auch Abbildung 42) waren deutlich blaß, aber man kann sie nicht als virescent bezeichnen, weil sie nicht weiterwachsen, sondern eingingen. Bei diesen transgenen Pflanzen scheint durch die antisense Wirkung des *pActEtI*-Antisense-Konstrukts ein massiver Eingriff auf die ersten Entwicklungsschritte der Keimung und Blattentwicklung erfolgt zu sein.

3.4 Physiologische Analysen zum *etched1* Phänotyp

Der Phänotyp der *etl-ref* Sämlinge, ist durch den vireszenten Zustand in einem Alter bis zu durchschnittlich 15 Tagen gekennzeichnet. Um den Einfluß der *etched1* Mutation auf die Effizienz des Photosystems II zu bestimmen, sollte die Messung der Chlorophyllfluoreszenz bei Blättern junger Sämlinge der Wildtyplinie LC und der Linie *etl-ref* erfolgen. Zusätzlich wurden auch Sämlinge anderer Wildtyplinien, die für Transformationsexperimente genutzt werden und drei transgene Linien vermessen. Zwei der transgenen pAct*Etl*-Sense Linien stammen aus der F3 Generation der Linien 1940 und 1946, die nachweislich das pAct*Etl*-Sense-Konstrukt enthielten und die *Etched1* RNA überexprimierten (2.2.10.1/3.3.3.1, Abb. 36). Eine transgene Linie enthält kein *Etched1*-Sense-Konstrukt, sie enthält nur den Actinpromotor und wurde als Kontrolle verwendet. Die Daten sollten erstens zeigen, ob die Effizienz des Photosystems II bei vireszenten *etl-ref* Sämlingen meßbar geringer ist, als bei Wildtyp LC Sämlingen. Zweitens sollten Messungen mit den transgenen Pflanzen zeigen, ob die *Etl*-Sense transgenen Sämlinge, aufgrund der Überexpression der *Etched1*-RNA Unterschiede in ihrer Photosyntheseeffizienz aufweisen. D.h. es sollte getestet werden, ob möglicherweise transgene Pflanzen aufgrund dieses Parameters von nicht-transgenen Pflanzen zu unterscheiden sind.

3.4.1 Bestimmung der Chlorophyllfluoreszenz als Parameter für die Aktivität des Photosystems II

Die Messung der Chlorophyllfluoreszenz wurde mittels eines PAM (Puls-Amplituden-Modulation) Fluorometers durchgeführt. Zur Bestimmung der Chlorophyllfluoreszenz wurden Pflanzen 30 min im Dunkeln inkubiert, um die Reaktionszentren der Photosysteme II zu oxidieren. Mit gepulstem 1,6 kHz Schwachlicht wurde eine Grundfluoreszenz F_0 erzeugt. Durch Auslösung eines sättigenden Weißlichtpulses von 1 s Dauer konnten alle vorhandenen PS II- Reaktionszentren reduziert und die maximale Fluoreszenz F_m induziert werden. Der Quotient $(F_m - F_0) \div F_m$ dient als Maß für die Quantenausbeute der an der photochemischen Reaktion beteiligten aktiven PS II-Reaktionszentren. $F_m - F_0$ wird auch als variable Fluoreszenz F_v bezeichnet.

Vor der Messung, zum besseren Vergleich der Entwicklung der Pflanzen, wurde die Größe der Maispflanzen bestimmt und dann das erste und das zweite Blatt vermessen. Wenn es schon ein ausreichend großes drittes Blatt gab, wurde auch dieses vermessen.

Für die Messung vorbereitet wurden 10 Pflanzen des Wildtyps LC, 10 Pflanzen der Linie *et1-ref*, 5 Pflanzen A188xB73, 5 Pflanzen A188, 5 Pflanzen Pa91, 5 Pflanzen H99 und je 5 transgene Pflanzen (F3 Generationen nach der Transformation, s.o.). Eine der transgenen Linien ist 2395 (Gewächshausbuch-Nr.). Sie ist pAct*Etched1*-Sense negativ und stammt aus der Linie 2139. Die zweite verwendete transgene Linie ist 2396. Sie ist pAct*Et1*-Sense positiv. Die Körner der Vorfahren aus Linie 2015 zeigten einen *etched1* Phänotyp (3.3.3.1 Abb. 37). Die dritte getestete Linie 2397 stammt ebenfalls aus einer pAct*Et1*-Sense positiven Linie (2017) allerdings war bei diesen Körnern nie ein *etched1*-Phänotyp aufgetreten (siehe auch 3.3.3.1 Transgene *Etched1*-Sense Pflanzen).

Die einzelnen Meßwerte und die grafische Darstellung der Werte (Fv/Fmax) sind unter 7.3 im Anhang aufgeführt.

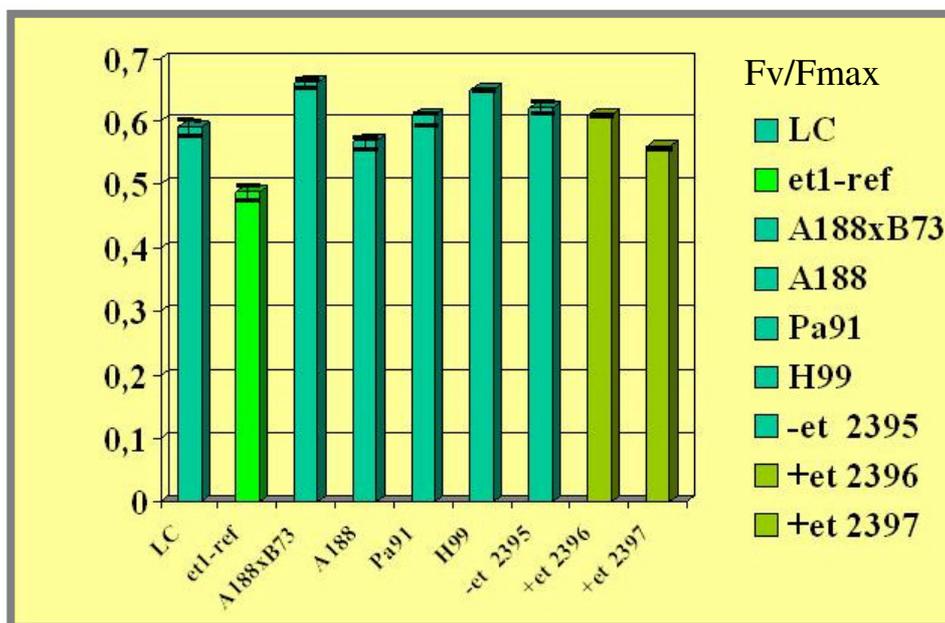


Abbildung 43 Photochemische Effizienz des PS II (Fv/Fmax) in Blättern verschiedener Maislinien. Die Mittelwerte ergeben sich aus den Messungen folgender Einzelpflanzen: 9 x LC, 9 x *et1-ref*, 5 x (A188 x B73), 5 x A188, 5 x Pa91, 2 x H99, 4 x TG der Linie 2395, 3 x TG der Linie 2396, 5 x TG der Linie 2397. Vermessen wurde jeweils das 1. und 2. und teilweise ein drittes Blatt.

Die Ergebnisse zur Messung der Chlorophyllfluoreszenz wurden für die einzelnen Linien gemittelt (Abbildung 43). Hierbei ist zu erkennen, daß die *etl-ref* Pflanzen eine niedrigere photochemische Effizienz aufweisen als alle anderen gemessenen Wildtyp-Pflanzen. Auch die transgenen pAct*Etl*-Sense-Pflanzen zeigen eine höhere photochemische Aktivität des PSII als die *etl-ref* Pflanzen. Die Werte für die Wildtyp-Pflanzen liegen alle im Bereich von etwa 0,6 bis 0,64, während der Wert für *etl-ref* bei 0,49 liegt. Transgene Pflanzen mit dem *Etl*-Sense-Konstrukt unterscheiden sich aber nicht durch einen, durch die Überexpression der *Etched1*-RNA und vielleicht des ET1-Proteins, möglichen, höheren Wert. Die gemittelten Werte für Pflanzen der Linie 2397 sind eher etwas niedriger (0,56), als die Werte der Wildtypllinien und Kreuzungen von Wildtypllinien. Der Mittelwert für die Linie 2396 hingegen liegt mit 0,61 im Bereich der Werte von Wildtypllinien und Wildtyp-Hybrid (A188 x B73).

Das Ergebnis dieses Experimentes für die Effizienz des PSII im Bezug auf die transgenen pAct*Etl*-Sense-Pflanzen ist, daß kein großer meßbarer Unterschied zwischen den Wildtypllinien und den, das *Etl*-Transgen überexprimierenden, transgenen Pflanzen besteht. Im Bezug auf virescente *etl-ref* Sämlinge kann gezeigt werden, daß deren photochemische Effizienz, wie erwartet unter den durchschnittlichen Werten der Wildtypllinien und eines Wildtyphybrids liegt.

4. Diskussion

Handelt es sich bei dem klonierten Gen tatsächlich um das von der *etched1* Mutation betroffene Gen?

Im Rahmen dieser Arbeit sollte vorrangig überprüft werden, ob es sich bei dem, von O. da Costa é Silva klonierten, *Etched1* Gen wirklich um das von der *et1*-Mutation betroffene Gen handelt. Die pleiotrope rezessive *etched1*-Mutation bewirkt Risse und Fissuren durch anomale Endospermentwicklung in Körnern und einen vireszenten Phänotyp in den Blättern junger Sämlinge, durch eine gestörte Chloroplastenentwicklung. Zwei *etched1*-Mutantenlinien *et1-m3* und *et1-m16* sind im Vorfeld bereits von Dr. da Costa é Silva molekular analysiert und sequenziert worden. In der Linie *et1-m3* ist 9 Basenpaare vor dem Startcodon ein Mu8-Element in 3'-5'-Orientierung inseriert. In Linie *et1-m16* ist die Insertion eines Mu1 Elements (3'-5'-Orientierung) 35 Basenpaare nach dem Startcodon festgestellt worden.

4.1.1 Analyse der Genstruktur der Mutantenlinien

Um Kenntnisse über die Struktur des *Etched1* Gens in *etched1*-Mutantenlinien aus Mais zu erhalten, wurden genomische Banken hergestellt und mit *Etched1*- und Mutator-Sonden isolierte Klone sequenziert. Zusätzlich wurden PCR-Fragmente aus genomischer DNA von zwei *etched1*-Mutantenlinien, mit *Etched1* und Mutator-Primern amplifiziert, kloniert und ebenfalls sequenziert.

Alle drei untersuchten Mutantenlinien (*et1-m15*, *et1-m10*, *et1-m12*) wurden über die Methode des Transposon Tagging durch die Kreuzung von Wildtyplinien oder *et1-ref* Linien mit einer Mutatorlinie hergestellt. Aus genomischer DNA, die von zwei *et1-m15* Mutantenlinien (1738/1739) stammte (Nachkommen von Geschwisterkörnern, nebeneinander auf dem Kolben), wurden genomische Lambda-Banken hergestellt und einige Klone isoliert (4 aus Linie 1738 und 12 aus Linie 1739). Die Sequenzierung von insgesamt 4 Klonen der beiden *et1-m15* Linien ergab hinsichtlich der Integrationsstelle des Elementes und der Orientierung, daß die Sequenzen der Klone der beiden *et1-m15* Linien nicht nur untereinander, sondern auch mit der Sequenz von *et1-m3* identisch sind. Sogar die Insertionsrichtung der Mutator-Elemente (Mu8) ist überall gleich (3'-5'-Orientierung).

Aus genomischer DNA der Linien *etl-m10* und *etl-m12*, mit einem Mu-Primer und *Etched1*(LC) Reverseprimern aus Exon 3 und Exon 4, wurden über PCR-Experimente Fragmente amplifiziert. Die Sequenzierung der isolierten subklonierten Fragmente ergab erstaunlicherweise die gleiche Insertionsposition eines Mu8 Mutatorelementes für die beiden untersuchten Linien. Beide Linien (*etl-m10/etl-m12*) zeigen die Insertion eines Mu8 Elements 13 Basenpaare vor dem Startcodon, also nur 4 Basenpaare entfernt von den Insertionspositionen der Mutatorelemente in den Linien *etl-m3* und *etl-m15*. Allerdings sind in den Linien *etl-m10* und *etl-m12* die Mu8-Elemente in entgegengesetzter Orientierung (5' - 3') inseriert. Zwischen den beiden Linien besteht auch noch ein Unterschied im genetischen Hintergrund. Die Linie *etl-m12* entspricht der Sequenz der Wildtyplinie LC. Im Vergleich zu allen anderen analysierten Linien, die im Exon 1 neun zusätzliche Basenpaare an Position 125 nach dem Startcodon besitzen, fehlt diese Sequenz in der Linie *etl-m12* und in der Linie LC. Da es sich innerhalb der verschiedenen *etched1* Allele um eine direkte Wiederholung der vorhergehenden neun Basenpaare CCTCCTCCT handelt, kann es sich dabei um direkte Wiederholungssequenzen aus einer vorher einmal erfolgten Transposition (Insertion mit Verdoppelung der Zielsequenz und anschließender Excision) eines Mutatorelementes handeln.

Zusätzlich zu Sequenzanalysen der *etl*-Mutantenlinien wurde eine Southernblot Analyse mit genomischer DNA, restringiert mit dem Enzym *HindIII*, durchgeführt. Die Banden des genomischen Southernblots (3.1.4, Abb. 18) der verschiedenen *etl*-Mutantenlinien, mit der LC *Etched1* cDNA-Sonde hybridisiert, befinden sich alle im Bereich von etwa 4 kb. Das ist die Fragmentgröße, die dem Fragment der Wildtyp-DNA (z.B. LC, w22, Q66) entspricht.

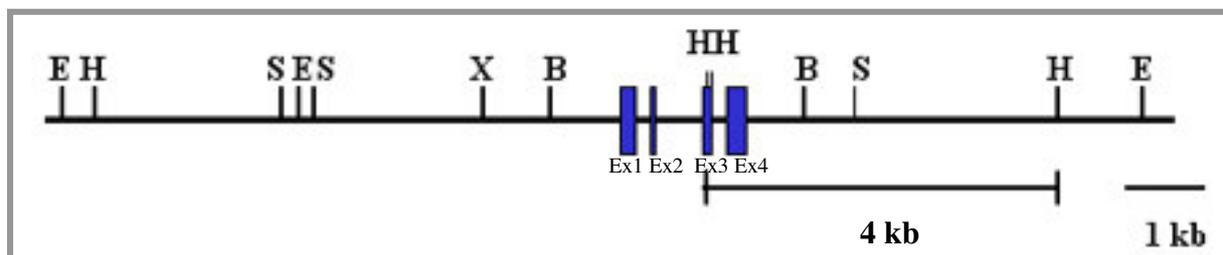


Abb.44 Schnittstellen eines LC Wildtyp-Klons im Bereich der 4 Exons (blau, Ex1-4) des *Etched1* Gens. Markierter Bereich eines ca. 4 kb großen *HindIII*-Fragments das dem Wildtyp Fragment entspricht. H=*HindIII*, E = *EcoRI*, S= *Sall*, B= *BamHI*, X= *XhoI*

Da das ca. 4 kb große *HindIII*-Fragment dem hinteren Genbereich des *Etl*-Gens mit Teilen von Exon 3 und Exon 4 entspricht (Abb. 49), müßten auch in den getesteten Linien *etl-m1*, *etl-m2*, *etl-m5*, *etl-m8*, *etl-m9*, *etl-m11*, *etl-m12* und *etl-m13* Insertionen von Mutator-Elementen in den vorderen Genbereich erfolgt sein. Die Insertionen der Mutator-Elemente könnten in die Exons 1 und 2, in die Introns 1 und 2 und in den Promotorbereich erfolgt sein. Durch weitere Southernblot-Analysen mit anderen Enzymkombinationen (z.B. auch *XhoI* und *BamHI* in Kombination mit *HindIII*) und Enzymen die direkt in den Exons schneiden, könnten konkretere Schlüsse über die einzelnen Insertionspositionen in den verschiedenen Linien gezogen werden.

Die Frage warum die Insertionspräferenz der Mutator-Elemente offensichtlich im vorderen Bereich des *etched1* Gens liegt (gezeigt für *etl-m3*, *etl-m10*, *etl-m12*, *etl-m15* und *etl-m16*) kann hier nicht beantwortet werden, weil die genauen Bedingungen für Transposition transponierbarer Elemente bei den *etched1*-Mutanten bisher noch nicht näher untersucht wurden. Es muß sich um spezielle Strukturen der DNA, oder mit der DNA assoziierter Moleküle, des vorderen *Etched1*-Genbereiches handeln, die besonders gute Voraussetzungen für die Aufnahme eines transponierbaren Elementes bietet, bzw. Strukturen im hinteren Genbereich, die die Transposition eher unterbinden. Analysen von Mutator-induzierten Mutantenlinien des *glossy8* Gens zeigten, daß Insertionen unterschiedlichster Mutatorelemente zu einem sehr hohen Prozentsatz (83%) in den 5' -UTR-Bereich erfolgten (Dietrich *et al.*, 2002). Die meisten dieser Insertionen erfolgten in einen etwa 50 Basenpaare langen 5' -Bereich, zwischen Position 80 und 20. Die Insertionshäufigkeit und Position deckte sich mit Wiederholungen bestimmten Sequenz-Motive (CACNG), die je nach Allel vier bis sechsmal auftraten. Insgesamt erfolgten die Insertionen in GC-reiche Regionen.

Die Insertionen der Mutatorelemente in die *etched1*-Mutantenlinien hingegen, sind nicht in GC-reiche Regionen erfolgt. Es gibt auch keine Sequenzmotive, die Homologie zum CACNG-Motiv des 5' -UTR des *glossy8* Gens zeigen. Daher bleibt vorerst offen, welche molekularen Hintergründe im *Etched1* Gen zur Häufung der Insertion der Mutatorelemente im 5' UTR-Bereich führen.

4.1.2 Die Klonierung des *Etched1* Gens wird ebenfalls durch den Phänotyp der Maisköner und der Sämlinge transgener Pflanzen bestätigt!

In transgenen pAct*Etched1*-Sense Linien wurde zusätzlich zur Expression des *Etched1* Gens der Wildtyplinien die RNA des transgenen *Etched1* exprimiert. D.h. der Effekt dieser Transformation war eine deutliche Steigerung der *Et1*-RNA-Transkriptionsrate bei einigen Transformanten (s Abb. 34 /3.3.1). Nachkommen dieser, in Northernblots mit der *Etched1* cDNA-Sonde und in Southernblots mit einer Actin-Sonde, positiv getesteten Linien, zeigten in der F1-Generation (nach Selbstung) einen *etched1*-Phänotyp der Körner (Abb. 37, 39).

Dieses Phänomen könnte auf das, bei transgenen Pflanzen vorkommende, PTGS (Posttranscriptional Gene Silencing) zurückzuführen sein. PTGS führt zum Abbau der, vom transgenen Element kodierten, mRNA. Untersuchungen haben gezeigt, daß in der Pflanze Antisense-RNA-Fragmente nachgewiesen werden können, die der transgenen mRNA komplementär waren (Hamilton *et al.*, 1999). Es soll eine RNA-abhängige RNA Polymerase an der Synthese dieser antisense RNA beteiligt sein. Doppelstrang-RNA-Strukturen werden von einer speziellen *RNase* zu kurzen Nukleotid-Fragmenten abgebaut. Ein solcher Mechanismus könnte der Abwehr von Viren dienen und eine Art Immunsystem der Pflanze darstellen. Es könnte auch ein Mechanismus zu Regulation der Transkription sein.

Ein virescenter Phänotyp der Sämlinge ist nie bei den *Et1*-Sense transgenen Linien und deren Nachkommen aufgetreten. Vielleicht ist der vorher beschriebene Effekt des Posttranskriptionalen Gene Silencing in Sämlingen nicht so stark ausgeprägt, wie in den Körnern. Eine Steigerung der Transkriptionsraten des transgen in die Pflanze eingebrachte *Etched1* Gens hatte auch keine steigernde Wirkung auf physiologische Parameter wie die Chlorophyllfluoreszenz (3.4.1/Abb. 43).

Antisense-Konstrukte

Die Transformation mit pAct*Etched1*-Antisense Konstrukten, bewirkte in F3-Generationen transgener Pflanzen mit normalen Körnern ohne Risse und Fissuren, Veränderungen des Phänotyps der Sämlinge. In den meisten Fällen sahen die jungen Pflanzen normal aus (Abb.42 A/3.3.3.2), manchmal keimten sie zu einem geringen Anteil nicht aus. In einigen Fällen traten hellere Blattbereiche auf (Abb.42 B/ Streifen, Abb. 41/ unterschiedliche Strukturen). In einer Linie trat bei 80% aller Sämlinge ein sehr seltsamer Phänotyp auf. Diese Pflanzen zeigten nur sehr wenig morphologische Gemeinsamkeiten im Vergleich zu Wildtyp Sämlingen. Alle Pflanzen waren blaß-gelb und zeigten kaum Längenwachstum. Dieser Phänotyp kann nicht als virescent bezeichnet werden, weil die Pflanzen nicht grün wurden, sondern abstarben. Es hatte den Anschein, daß die gesamte Entwicklung der Sämlinge während der Keimung und Blattentwicklung massiv gestört war. Die Pflanzen besaßen, obwohl sie bereits zwei bis drei, sehr kleine Blätter hatten, keinen richtigen Stengel (Sproßachse), sondern hatten nur Blätter ausgebildet.

Insgesamt bot sich das Bild von Sämlingen, die nur die Energiereserven aus dem Korn (Endosperm) erhielten, und die nicht in der Lage waren ihren Photosyntheseapparat zu aktivieren. Im Gegensatz dazu „schaffen“ es virescente *etched1*-Mutanten in den meisten Fällen bis spätestens zum Wachstumszeitpunkt des vierten Sämlingsblattes, die Mutation des *Etched1* Gens zu kompensieren und ergrünen.

Die Ausprägung dieser Phänotypen einiger Sämlinge, aus Körnern verschiedenen F2-Linien einer einzigen transgenen Linie, deutet auf einen Antisense-Effekt hin und bestätigt, daß das klonierte *Etched1* Gen tatsächlich der Auslöser der *etched1*-Mutation ist.

Die Ausbildung von RNA Doppelsträngen, aus *Etched1*-mRNA und transgener antisense mRNA kann zum Abbau durch RNA-Doppelstrang-erkennende *RNase* führen und ist wohl ebenfalls auf PTGS (siehe vorher, *Et1*-Sense-Konstrukte) zurückzuführen.

Interessant ist in diesem Zusammenhang, daß bei Sense-Transformanden hauptsächlich der *etched1*-Phänotyp der Körner zu beobachten ist, während manche Antisense-Transformanden eher phänotypische Veränderung der keimenden Körner und Sämlinge zeigen.

4.2 In welchen Geweben des Maiskorns erfolgt die Expression der *Etched1*-RNA?

Die Orte der Expression des *Etched1* Gens in Maiskörnern sollten durch *in situ* Hybridisierung mit *Et1*-RNA Sense- und Antisense-Sonden überprüft werden (s. 3.2.1). Die Sense- und Antisense-RNA-Transkripte entsprechen der kompletten *Et1* cDNA. Die Ergebnisse der Hybridisierung der Dünnschnitte 8 Tage alter Körner ergaben, daß starke Signale im Bereich des äußeren Perikarps, des Aleurons, des Endosperms und Aleuron-naher Zellschichten bei dem Wildtyp Q2 zu detektieren waren (s. Abb. 25). Bei dem anderen untersuchten Wildtyp LC war die Intensität der Signale, bei Dünnschnitten der 8 Tage alten Körner etwas schwächer und bei 14 Tage alten Maiskörnern, sehr schwach. Die Fotodokumentation mit Dunkelfeldmikroskopie zeigt aber auch bei dieser Linie stärker gefärbte Zellschichten des äußeren Perikarps (s. Abb. 26). Aufgrund der vermehrten Stärkeeinlagerungen in das Endosperm der 14 DAP LC Körner sind wahrscheinlich nicht alle Signale so deutlich, wie bei den Schnitten der Linie Q2. In *et1-ref* Dünnschnitten kann mittels Durchlicht kein Unterschied zwischen Sense- und Antisense-Hybridisierungen detektiert werden. Im Dunkelfeld erscheinen alle Gewebe der Dünnschnitte, die mit der Antisense-Sonde hybridisiert wurden, ein wenig stärker gefärbt, als die mit der Sense-Sonde hybridisierten Dünnschnitte (Abb. 27).

Die intensiven Signale in den Wildtypschnitten verwundern ein wenig, da bei Northernanalysen von Körnern und jungen Pflanzen mit einer *Et1*-cDNA-Sonde nicht so starke Signale zu erkennen waren, d. h. die Expression der *Etched1*-mRNA war insgesamt eher schwach. Die Intensität der Signale ist jedoch bei Körnern zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Befruchtung gleich stark (s. Abb. 45).

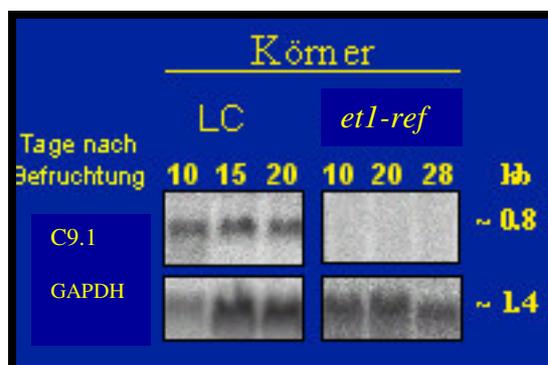


Abbildung 45 Northernblot mit *et1-ref* und LC Körnern 10-20 Tage nach der Befruchtung, Hybridisierung mit der *Etched1* cDNA-Sonde und zur Beladungskontrolle mit einer GAPDH-Sonde (Daten: Garg, Hamburg)

Die Erkenntnisse die aus den *in situ* Experimenten gewonnen werden konnten sind, daß eine stärkere Expression des *Etched1* Gens in den Wildtypelinien Q2 und LC in Aleuron und im äußeren Perikarp (Perikarp-Peripherie) und aleuron-nahen Perikarp-Schichten nachzuweisen ist. In Schnitten der Linie Q2 sind außerdem noch Signale im Embryo zu sehen.

Die schwachen Signale, die bei Schnitten von *etl-ref* Körnern zu detektieren sind, könnten aus einer Hybridisierung der *Et1*-Antisense RNA-Sonden mit anderen, zu *Etched1* oder *Zmzr1* homologen, mRNAs, resultieren. Vielleicht sind die schwachen Signale auch direkt auf die Hybridisierung mit *Zmzr1* mRNA zurückzuführen, da in der Linie *etl-ref* das *Zmzr1* Gen stärker exprimiert zu sein scheint, als in anderen Linien.

Bei Southernanalysen tauchen bei Hybridisierung mit *Etched1* DNA-Sonden schwache Banden auf, die aufgrund ihrer Größen dem *Zmzr1* Gen entsprechen und vielleicht auch noch mindestens einem weiteren Gen mit Homologie zum *Etched1*- bzw. *Zmzr1*-Gen. In Datenbankanalysen konnten ESTs aus Mais, die Homologie zu *Etched1* und *Zmzr1* zeigen, gefunden werden (Garg, 2002). D.h. es könnten durchaus noch einige andere zu *Etched1* homologe Gene in Mais existieren.

Die Hybridisierung und Detektion mit den RNA-Sonden der 3' untranslatierten Bereiche der cDNAs von LC und *Zmzr1* erbrachte leider keine Signale in den verschiedenen Geweben. Nur erfolgreiche Detektionen mit diesen sehr spezifischen Sonden hätten die eventuellen, gewebespezifischen Expressionsunterschiede des *Et1* Gen und des *Zmzr1* Gens aufzeigen können. Ohne diese Ergebnisse ist nicht klar, wo, welches der beiden Gene, in welcher Stärke, exprimiert wird.

Zusätzlich können *in situ* Hybridisierungen statt mit RNA-Sonden mit den aufgereinigten *Et1*-Peptid-Antikörpern durchgeführt werden, die in Westernblot von Chloroplastenfraktionen funktioniert hatten (s. 4.3).

Zum besseren Verständnis der Funktion des *Etched1* Gens in Maiskörnern und Maispflanzen sollten *in situ* Analysen von, mit pAct*Etched1*-Sense- und pAct*Et1*-Antisense-Konstrukten transformierten, transgenen Pflanzen durchgeführt werden.

4.3 Wo erfolgt die Expression des ET1-Proteins in Sämlingen/Chloroplasten?

Die Analyse von Westernblots mit Anti-ET1 Kaninchen Antikörpern (3.2.2, Abbildungen 23 und 24) zeigte mit einem der beiden Antiseren u.a. Proteinbanden bei ca. 18-26 kDa, die aufgrund des Molekulargewichts dem unprozessierten Gesamtprotein (ungef. 18 kDa) entsprechen würden. Interessant ist, daß diese Proteine (Doppelbanden) bei Proteinsuspensionen aus jungen *et1-ref* Sämlingen größer sind als in älteren Sämlingen. Die Protein-Doppelbanden besitzen auch ein höheres Molekulargewicht als die Proteine in LC-Wildtyp Sämlingen jeden Alters. In älteren Chloroplasten (ab 15 Tage alte Sämlinge) werden etwa gleich große Banden bei LC und *et1-ref* detektiert. Chloroplasten junger Sämlinge scheinen weder bei LC noch bei *et1-ref* diese Protein-Doppelbande in detektierbarer Menge aufzuweisen. In 7 und 10 Tage alten weißen und grünen Sämlingen einer Albinolinie (ausgekreuzt) sind mit dem Anti-Etched1-Peptid-Antikörper gar keine Proteine der Größenordnung 18-26 kDa zu detektieren, auch in den Chloroplasten der Pflanzen gleichen Alters, scheint nur eine Einzelbande bei 10 Tage alten „grünen“ Albinos detektierbar zu sein. Diese entspricht in ihrer Größe (22 kDa) etwa der größeren Bande der *et1-ref* Chloroplasten-Doppelbande.

Da jedoch der Import des ET1-Proteins in Spinat-Chloroplasten durch Versuche bestätigt werden konnte (Dissertation Preeti Garg, 2002), ist davon auszugehen, daß ein Signal des prozessierten ET1-Proteins in den Wildtyp-Chloroplasten bei 11 kDa zu erkennen sein sollte. Diese 11 kDa Banden sind aber weder bei Westernblots die mit alkalischer Phosphatase und BCIP/NBT detektiert wurden noch bei Westernblots die mit HRP und Luminol/Coumarsiure behandelt wurden, in den Chloroplastenfraktionen sichtbar. Daher ist die Frage, ob die richtigen Banden (ET1) detektiert werden konnten, oder ob es sich um Proteine, die ein ähnliches Epitop wie das putative ET1-Protein aus LC oder auch das ZMZR1-Protein enthalten, handeln könnte (Abb. 46). In Abbildung 46 sind Aminosäuresequenzen der ET1-Proteins und des zum *Etched1* homologen Proteins ZMZR1 gezeigt. Das Epitop das für die Synthese eines ET1-Peptids zur Immunisierung ausgesucht wurde ist 100% homolog für das entsprechende ZMZR1-Protein. Im Datenbank-Vergleich zu anderen Zinc-Ribbon Proteinen (hier nicht gezeigt) wird deutlich, daß diese Sequenz in anderen Organismen nicht in Kombination mit (bereits bekannten) Zinc-Ribbon Motiven vorkommt.

ET1 (LC)	MTTTAAGHGCCWAGIPPFALLPRILSTG-RETP---PPRASLVASSSKLR :46
ET1 (et1-m3)	MTTTAAGYGCCWAGIPPFALLPRILSTR-RETPPPPPRASLVASSSKLR :49
ZMZR1	MATTAAGYGCCLAGLPPFFLLPGILSTRLRREPS--PPRVALVASSPKLR :48
ET1 (LC)	ALAPRLRVSNRPRRLIVSASSSGEANS <u>SDAVPSPTEA</u> AIDIKLPRRSLLVQ :96
ET1 (et1-m3)	ALAPRLRVSNRPRRLIVSASSSGEANS <u>SDA</u> <u>APSPTEA</u> AIDIKLPRRSLLVQ :99
ZMZR1	<u>AP</u> APRLRVSCGPRRL---ASSSGKAN <u>SDAVPSPTEA</u> TIDIKLPRRSLLVQ :95
ET1 (LC)	FTCNACGERTKRLINRVAYERGTVFLQ CAGCQVYHKFVDNLGLVVEYDLR :146
ET1 (et1-m3)	FTCNACGERTKRLINRVAYERGTVFLQ CAGCQVYHKFVDNLGLVVEYDLR :149
ZMZR1	FTCNACGERTKRLINRVAYERGTIFLQ CAGCQVYHKFVDNLGLVVEYDLR :145
ET1 (LC)	EENELQGENAVDTSSSED :163
ET1 (et1-m3)	EENELQGENAVDTSSSED :166
ZMZR1	EENVVQGENVIDTNSSED :162

Abbildung 46 Aminosäuresequenz der Proteine von ET1 aus LC und *et1m3* (B73) und ZMZR1, blau markierte Aminosäure unterscheiden sich von denen der anderen Linien, grün und unterstrichen ist die Sequenz des synthetisierten Peptids für die Immunisierung der Kaninchen. Die AS-Sequenz der putativen Proteine von ET1 (LC) und dem zum *Etched1*-homologen Gen *Zmzr1* unterscheiden sich nicht, die AS Sequenz vom ET1-Protein aus der Linie *et1-m3* unterscheidet sich in einer AS.

Erstaunlich ist auch die Tatsache, daß in den 7 und 10 Tage alten, ausgekreuzten, Albino-Pflanzen, weder in denen mit dem Wildtyp Phänotyp, noch in den klassischen Albinos, eine Detektion des Proteins erfolgte. Dabei ist nachweislich in Northern-Analysen die *et1*-RNA von diesen Albinos exprimiert worden. Es handelt sich daher vielleicht doch nicht um den Nachweis der richtigen Banden des ET1- oder ZMZR1-Proteins.

Daten von Northernblots (Garg, 2002) zeigen: Die Expression der *Etched1*-RNA erfolgt in jungen Sämlingsblättern der LC Wildtyplinie nachweisbar zu jedem Zeitpunkt vom 1. Tag nach der Keimung bis zur ausgewachsenen Pflanze. Im Gegensatz dazu ist weder in jungen, noch in adulten *et1-ref* Linien eine Expression des Gens nachzuweisen. Dadurch, daß keine RNA Expression des Gens bei *et1-ref* Pflanzen zu detektieren ist, sollte auch kein ET1-Protein detektierbar sein. Es ist aber auch in jungen *et1-ref* Sämlingen immer ein Signal in der Region bei ca. 18 kDa zu detektieren. Dies spricht ebenfalls gegen die Spezifität der Antikörper in Bezug auf das ET1-Protein.

Daher steht fest, daß der Nachweis wo eine Expression des ET1-Proteins in Sämlingen und Chloroplasten der einzelnen Linien erfolgt, mittels der benutzten Antiseren nicht geführt werden kann.

Fazit: Die im Westernblot detektierten Banden (s. Abb. 23/24) stehen vielleicht in einem weiteren Zusammenhang mit dem *Etched1* Gen, da Differenzen in der Größe der detektierten Proteine zwischen der *etched1-reference* Mutante und dem Wildtyp bestehen. Die Größe der Proteine stimmt jedoch nicht mit der erwarteten Größe von 18 kDa für das unprozessierte ET1-Gesamtprotein (inkl. Der Transitsequenz) überein. Nach dem Import in die Chloroplasten sollte das prozessierte Protein in Wildtyplinien als 11 kDa große Bande, nach Abspaltung der Transitsequenz, zu detektieren sein. Diese 11 kDa große Bande konnte jedoch in keiner Probe mit Wildtyp-Chloroplastenprotein nachgewiesen werden.

In Northernblots tauchen keinerlei Signale von *Etched1* RNA bei *etched1-ref* Blättern auf. Es muß sich schon aus diesem Grund bei detektierten Banden aus *et1-ref* Gesamtprotein um andere Proteine handeln, die auch ein höheres Molekulargewicht besitzen. Diese Proteine müßten ein ähnliches Epitop zur Bindung der Anti-ET1-Peptid-Antikörper aufweisen. Da es sich um polyklonale Antikörper handelt, mit denen die Detektion durchgeführt wurde, könnten diese durchaus geringfügig unterschiedliche Strukturen erkennen und daran binden. Die Albinolinien, die alle eine *Etched1* mRNA Expression zeigen, sollten zumindest Spuren des Proteins zeigen. Es könnte natürlich sein, daß eine Translation der *Etched1* mRNA in Albinolinien aus nicht bekannten Gründen gestört ist.

Westernblots, die die Arbeitsgruppe Krupinska/Universität Kiel mit den hier benutzten Antiseren/Antikörpern und isolierten Chloroplastenfraktionen durchgeführt hat, zeigten nach Aufreinigung der Antikörper, eine ca. 12 kDa große Bande eines Proteins. Diese Bande war mit der Chloroplastenfraktion des TAC-Komplexes (transcriptionally active chromosome) assoziiert. Der TAC-Komplex wird über biochemische Methoden isoliert und enthält zwei Untereinheiten der PEP (plastid encoded polymerase) der Chloroplasten.

Die Reaktion der aufgereinigten Antikörper mit den TAC-Komplexen aus Gerste und Spinat bestätigt die Vermutung, daß es sich beim Etched1-Protein um einen plastidären Transkriptionsfaktor handeln könnte. Es ist das erste Zinc-Ribbon Protein, das eine Funktion in Plastiden zu haben scheint. Insgesamt sind noch keine Funktionen der Zinc-Ribbon Proteine für Zellorganellen/prokaryotische Zellen beschrieben worden!

4.4 Warum war die Überexpression des ET1-Proteins in Bakterien schwierig?

Die Überexpression des ET1-Proteins in Bakterien und die anschließende Isolation des Proteins, sollte der Herstellung polyklonaler Antikörpern gegen das ET1-Protein dienen. Der Versuch das ET1 in Bakterien als Intein-Fusionsprotein überzuexprimieren scheiterte. Es gelang in den meisten Fällen auch nicht C- oder N-terminal klonierte Teile der cDNA (entsprechend der Transitsequenz und einer TFIIS-homologen Domäne) überzuexprimieren (3.2.1). Die Überexpression eines Fusionsproteins aus dem C-terminal in das Intein-Fusionsprotein klonierten TFIIS-homologen-Bereiches (AS-Sequenz ohne Transitsequenz/ Vektor pTYB12) der LC-*Etched1* cDNA war jedoch möglich.

Die Überexpression des Proteins war mit verschiedenen Bakterienstämmen, getestet bei verschiedenen Expressionsbedingungen (Temperatur, Inkubationszeiten, Schüttelfrequenz), offensichtlich ein Problem. Alle Bakterienstämme waren in der Lage bei nahezu allen Expressionsbedingungen das, mit dem IMPACT™-CN Kit mitgelieferte Kontrollprotein pMYB5 überzuexprimieren. Dabei ist das Kontrollprotein mit 97 kDa wesentlich größer als das ET1-Intein-Fusionsprotein (18+56kDa) oder das ET1-Intein-Fusionsprotein ohne Transitsequenz (11+56kDa).

In einem der Experimente konnte das ET1(ohne Transitsequenz)-Intein-Fusionsprotein überexprimiert werden (C-terminal pTYB12 kloniert s. 2.2.3.3). Da sich aber das Zielprotein (11 kDa ET1 ohne Transitsequenz) nicht mit DTT autokatalytisch vom, an die Chitinbeads assoziierten, Fusionsprotein abspalten ließ, konnte dennoch kein Protein isoliert werden. Vielleicht hätte die DTT-induzierbare Abspaltung des Proteins mit höheren DTT-Konzentrationen funktioniert, da jedoch die Antikörper gegen das ET1 für weitere Analysen dringend benötigt wurden, wurde die Synthese eines Et1-Peptids und die Immunisierung von Kaninchen bei der Firma BioGenes in Auftrag gegeben (s.a. 2.2.18/3.3.2)

Die Problematik der geringen Expression könnte durch das *Etched1*-Genprodukt bedingt sein. Das das ET1-Protein eine hohe Homologie zu dem Transkriptionsfaktor TFIIS zeigt, könnte es eine, die Transkriptionsraten verändernde Funktion, auch in den Bakterien haben, da viele Motive der Transkriptionsfaktoren ubiquitär in allen Lebewesen, von Archaeobakterien bis zu höher entwickelten eukaryotischen Spezies, vorkommen (Wang *et al.*, 1998). Als DNA-bindender Faktor, wäre sowohl eine aktivierende als auch eine reprimierende Wirkung des ET1-Proteins auf die Bakteriengene denkbar. Dadurch könnte der Lebenszyklus einer Bakterienzelle beeinflusst werden, so daß die Bakterien insgesamt schlechter wachsen und

sich langsamer teilen. Dadurch würden in einer Bakteriensuspension schließlich nur sehr kleine Mengen des ET1 überexprimiert.

4.5. *In vitro* Transkriptionen/Translationen der *Etched1* cDNA aus LC und der *Zmzr1* cDNA aus *et1-ref*

Es sollte RNA der cDNA des *Etched1*-Gens aus LC (c.9.1) und RNA der cDNA des *Zmzr1* Gens (kloniert in den Translationsvektor pBAT) *in vitro* transkribiert werden. Diese RNA sollte später mit ^{35}S radioaktiv-markierten Aminosäuren *in vitro* translatiert werden. Parallel wurde noch eine, um die DNA-Sequenz, die der AS-Transitsequenz des LC-ET1-Proteins entspricht, verkürzte cDNA der LC cDNA *in vitro* transkribiert und das Transkript zur *in vitro* Translation eingesetzt.

Die *in vitro* Translationen der drei *in vitro* transkribierten RNAs im Reticulocytensystem mit ^{35}S radioaktiv-markierten Aminosäuren (Methionin/Cystein) hat in den meisten Fällen nicht funktioniert.

Mit den *in vitro* translatierten Proteinen der beiden vollständigen ET1-Proteine aus LC und von *Zmzr1* und dem LC-ET1-Protein ohne Signalsequenz hätten die aufgereinigten Antikörper (s. 4.3 ET1-Expression in Sämlingen und Chloroplasten) auf ihre ET1-spezifische Bindung überprüft werden können. Damit hätte die Antikörper-Reaktion mit dem TAC-Komplex verifiziert werden können. Außerdem wäre es sehr interessant gewesen, das verkürzte ET1-Protein, ohne Transitsequenz, mit dem Antikörper zu testen. Das verkürzte Protein beginnt drei Aminosäuren vor der Sequenz des ET1-Epitops nach dem das Peptid für die Immunisierung der Kaninchen synthetisiert wurde (s. Abb. 52 und 3.3.2 Abb. 33).



Abbildung 47 Nukleotid und Aminosäure-Sequenzen des verkürzten pBAT *Etched1* cDNA-Klons. Rot ist das neu eingefügte Startcodon und das Methionin markiert, Blau die *EcoRI*-Schnittstelle zur Klonierung in den Vektor, grün sind die Sequenzen des Epitops homolog zum synthetisierte Peptid der Kaninchen-Immunisierung.

4.6 Unterscheidet sich die Effizienz des Photosystems II in *et1-ref*-, Wildtyp- und transgenen pAct*Etched1*-Sense-Pflanzen?

Die Fluoreszenzmessungen zur Bestimmung der Aktivität des Photosystems II bestätigten den niedrigsten Durchschnittswert für virescente *et1-ref* Pflanzen. Mit 0,49 ist er deutlich geringer als alle anderen Werte für Wildtyplinien, die im Bereich von durchschnittlich 0,6 bis 0,64 liegen. Vermessen wurden auch Blätter von Wildtyplinien und Kreuzungen von Wildtyplinien, die für Transformationsexperimente zur Herstellung transgener Pflanzen benutzt werden. Mit der Messung im Vergleich zu transgenen *Etched1*-Sense Pflanzen sollte getestet werden, ob es möglich ist aufgrund unterschiedlicher Chlorophyllfluoreszenz, transgene Pflanzen zu erkennen.

Die niedrigen Werte für die jungen *et1-ref* Pflanzen sind aufgrund des vireszenten Phänotyps, mit der gestörten Chloroplastenentwicklung bei diesen Sämlingen, keine große Überraschung. Bei gestörter Entwicklung der Thylakoidmembranen/Grana und verringerter Anzahl der Thylakoidmembranen in den Chloroplasten sind wahrscheinlich allein dadurch weniger Komplexe des Photosystems II vorhanden, als in normal entwickelten Wildtyp-Chloroplasten. Vielleicht ist auch insgesamt die Anzahl der Chloroplasten in jungen *et1-ref* Pflanzen verringert, weil sie sich langsamer entwickeln.

Die Werte der Chlorophyllfluoreszenz für die verschiedenen Transformationslinien unterscheiden sich nicht sehr stark voneinander, lediglich die Linie A188 liegt mit 0,58 etwas niedriger als die anderen Linien (0,6-0,64). Die transgenen Pflanzen stammen allesamt aus Kreuzungen/Selbstungen von Hybriden (A188 x Pa91). Die Photosyntheseeffizienz der transgenen Pflanzen sollte deshalb im Bereich der gemessenen Linien A188 und Pa91 liegen. Die Linie, die nicht pAct*Et1*-Sense transgen war, unterscheidet sich bei den Meßwerten der Chlorophyllfluoreszenz nicht wesentlich von der Linie, die transgen (pAct*Et1*-Sense) ist und einen "antisense" Phänotyp zeigt (leichter *et1*-Phänotyp der Körner // Meßwerte: 0,62 und 0,61). Eine positive Auswirkung der zusätzlichen Gendosis von *Et1* im Sinne einer gesteigerten Aktivität des Photosystems II ist hier nicht zu erkennen.

Die pAct*EtI*-Sense positive Linie, ohne „antisense“ Phänotyp der Körner, zeigt hingegen einen leicht verringerten Wert der Chlorophyllfluoreszenz (0,59). Dies könnte eine Art Antisense-Effekt sein. Da in den Zellen zuviel „Fremd-RNA“ des Transgen produziert wird, reagieren die Zellen mit dem verstärkten Abbau von RNA, was auch zur Senkung des normalen *etI* RNA Levels führen kann. Durch diesen Effekt, der sonst der Pathogenabwehr dienen kann (TIG Reviews 9/1999), könnte es auch zum *etchedI*-Phänotyp von transgenen Sense-Pflanzen kommen.

Es ist mit dieser Methode, der Messung der Chlorophyllfluoreszenz, nicht möglich transgene Sense-Pflanzen von nicht transgenen Pflanzen zu unterscheiden. Durch langfristige und häufige Messungen kann mittels dieser Methode aber „das Ergrünen“ der *etI*-Pflanzen dokumentiert werden, und dabei auch Unterschiede in der Chlorophyllfluoreszenz aufgezeigt werden, die rein optisch nicht festzustellen wären (Messungen Franticek Janoviak, Mitteilung). Selbst wenn *etI*-Pflanzen das dritte und vierte Sämlingsblatt grün ausbilden, liegt ihre Aktivität des Photosystem II noch unter der Effizienz der Photosysteme von Wildtyppflanzen. In den adulten Pflanzen liegt der Wert der *etI*-Pflanzen über dem der Wildtyplinien (bezogen auf alle Blätter, an definierten und immer wieder genutzten Meßpunkten an allen Pflanzen).

Man kann in diesem Fall also sagen, daß junge *etI-ref* Pflanzen, die zwei bis drei Blätter besitzen, eine deutlich geringere Chlorophyllfluoreszenz zeigen als alle anderen untersuchten Linien. Dabei weisen insgesamt die dritten Blätter aller Linien den jeweils geringsten Wert für die Chlorophyllfluoreszenz auf. Weiterführende Versuche, mit sehr vielen Einzelmessungen und Meßpunkten, zu vielen verschiedenen Zeitpunkten des Pflanzenwachstums haben auch gezeigt, daß sich innerhalb der Entwicklung der *etI-ref* und anderer *etchedI* Linien die Werte in Richtung der Wildtyplinien angleichen, bzw. diese im adulten Alter übertreffen (Franticek Janoviak, pers. Mitteilung). In den erwachsenen Pflanze könnten schon Seneszenz-Erscheinungen auftreten, die die Photosyntheseaktivität verringern.

4.7 Ausblick

Um die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse weiter ausweiten zu können, sollten weitere *etched1*-Mutantenlinien, über PCR-Fragmente auf ihre Mutatorinsertionen analysiert werden. Um die Insertionspositionen schon vor der Sequenzierung näher eingrenzen zu können, sollten genomische Southernanalysen, mit Schnittstellen innerhalb der Exons den Analysen und Sequenzierungen vorausgehen.

In vitro Transkriptions- und *in vitro* Translations-Versuche sollten nochmals durchgeführt werden. Vielleicht funktioniert eine Translation mit ^{14}C markiertem Leucin, oder in einem Weizenkeim-System besser als mit ^{35}S Methionin oder ^{35}S Cystein im Retikulozyten-System. Die Westerndetektionen mit den Antiseren haben eine Verbindung des *Etched1* mit dem TAC-Komplex der Chloroplasten gezeigt. Die weiteren Analysen zur näheren Funktionsbestimmung werden von der AG Krupinska (Lenard Müller)/Universität Kiel durchgeführt. Vielleicht kann schon sehr bald die genaue Funktion des ET1-Proteins in den Chloroplasten der Blätter und damit auch die Funktion in den Amyloplasten der Körner beschrieben werden. Die aufgereinigten *Etched1*-Peptid Antikörper könnten auch noch bei *in situ* Experimenten mit Mais Korn Schnitten eingesetzt werden, um aktuelle Expressionsgewebe dort näher zu charakterisieren.

Es sollten weitere Versuche unternommen werden Signale mit den 3' UTR-RNA-Sonden der cDNAs von LC und *Zmzr1* in *in situ* Experimenten zu detektieren. Dadurch könnten die Gewebe der Expression der beiden Gene noch genauer eingegrenzt und eventuelle Unterschiede der Expression in den verschiedenen Linien deutlich gemacht werden.

Bei der Herstellung und Analyse der transgenen Pflanzen sollten schwerpunktmäßig eher Antisense-Pflanzen untersucht werden, weil dort stärkere phänotypische Effekte (bei Sämlingen) aufgetreten sind. Wenn von den Linien mit den besonders stark ausgeprägten Phänotypen (Abb. 42), in ihrem Wachstum ähnlich eingeschränkte Sämlinge neu angezogen werden, könnte RNA isoliert werden und in Northernblots auf eine Antisense-Wirkung getestet werden.

Messungen zur Chlorophyllfluoreszenz zur Bestimmung der Aktivität des Photosystem II sind bereits in sehr großem Umfang durchgeführt worden (F. Janoviak). Diese Ergebnisse müßten weiter bearbeitet und ergänzt werden.

5 Zusammenfassung

Die pleiotrope Mutation *etched1* bei *Zea mays* L. bewirkt bei Maiskörnern und in Maissämlingen deutlich sichtbare Entwicklungsstörungen der Plastiden. Dabei zeigen reife Körner eine Vielzahl von Rissen und Fissuren, vor allem im Bereich der oberen Endospermschichten. In extremer Ausprägung des Phänotyps sind die Körner sehr stark deformiert und nicht mehr keimfähig. Junge Sämlinge aus *etched1*-Mutanten hingegen zeigen einen „virescenten“ Phänotyp. Die ersten beiden Blätter der Pflanzen sind weiß bis blaßgrün, aber regenerieren sich 10 bis 15 Tage nach der Keimung zu normal grünen Blättern. Alle weiteren Blätter der *etched1*-Pflanzen sind gleich von Anfang an genauso grün wie Blätter einer Wildtyp-Pflanze in der gleichen Wachstumsphase.

In dieser Arbeit sollte vorrangig die Fragestellung bearbeitet werden ob und wie das von da Costa é Silva klonierte *Etched1* Gen in *etched1*-Mutantenlinien vorhanden ist, die über Transposonumlagerung (mit dem Mutatorelement) hergestellt wurden. Die Sequenzanalyse unterschiedlicher *etched1*-Mutantenlinien hat gezeigt, daß das *Etched1* Gen in allen Linien durch die Insertion eines Mutatorelementes mutiert ist. Außerdem hat sich gezeigt, daß es für die Insertion von Mutatorelementen innerhalb des *Etched1* Gens einen Hot Spot im Bereich des Exon1 gibt. Die Insertionspräferenzen der Mutatorelemente führten dazu, daß in vier von fünf bisher analysierten Linien die Insertionen innerhalb von vier Basenpaaren, kurz vor dem Startcodon des *Etched1* Gens erfolgten. Dabei sind je zwei der vier Mutantenlinien bezüglich der Insertionssequenz/Zielsequenz ihres Mutatorelementes (Mu8) identisch (Linien *et1-m3/et1-m15* bzw. *et1-m10/et1-m12*). Sie unterscheiden sich teilweise aber durch die Orientierung (Insertionsrichtung) des Mutatorelementes und den genetischen Hintergrund.

Durch biolistische Transformation hergestellte transgene *Et1*-Pflanzen und ihre Analyse zeigten zum Teil einen „*etched1*-ähnlichen“ Phänotyp in Körnern und Sämlingen. Dies gibt einen weiteren Hinweis darauf, daß das untersuchte Gen tatsächlich für die *etched1*-Mutation verantwortlich ist.

Durch *in situ* Experimente mit sense und antisense RNA-Sonden der kompletten *Etched1*-cDNA, konnte die Expression des Gens in Maiskörnern des Wildtyps nachgewiesen werden. Die Expression des *Etched1* Gens scheint im Bereich des Aleurons, den äußeren Endospermschichten, im äußeren Perikarp und im Embryo zu erfolgen. Erwartungsgemäß konnte in der Mutantenlinien *et1-ref* keine *Etched1*-mRNA detektiert werden.

Die Effizienz des Photosystems II, ermittelt durch Messung der Chlorophyllfluoreszenz, ist bei Sämlingen von *et1-ref*-Pflanzen deutlich niedriger als bei transgenen *Etched1*-Sense- und Wildtyp-Pflanzen. Durch die Messung wird deutlich, daß die *et1*-Mutation nicht nur auf anatomischer, sondern auch auf physiologischer Ebene Einfluß auf die Chloroplasten-Entwicklung nimmt. Dieser Einfluß konnte bei den transgenen Linien nicht nachgewiesen werden.

In Westernblots, die mit dem Gesamtprotein und dem Chloroplastenprotein verschieden alter Wildtyp und *et1-ref* Pflanzen, mit *Etched1*-Antiseren, durchgeführt wurden, konnten vermutlich nur unspezifische Protein-Banden detektiert werden. Bei einem spezifischen Nachweis für das ET1-Protein hätte man Proteine mit einem Molekulargewicht von 11 kDa in den Chloroplasten (prozessiertes Protein) und 18 kDa im pflanzlichen Gesamtproteinextrakt erwartet. Proteine mit einem Molekulargewicht von 11 kDa konnten aber auch in Wildtyp-Chloroplasten nie mit den Antiseren nachgewiesen werden. Alle in Chloroplasten detektierten Proteine waren mindestens 17 kDa groß.

Weiterführende Analysen der Arbeitsgruppe Krupinska/Universität Kiel deuten darauf hin, daß aufgereinigte *Etched1*-Antikörper bei der Immunodetektion mit verschiedenen hochaufgereinigten Chloroplastenfraktionen von Mais und Spinat ein 11 kDa großes Protein detektieren, das Teil des „transcriptionally active chromosome“ ist (Krupinska, Müller, pers. Mitteilung).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigen die erfolgreiche Klonierung des *Etched1* Gens aus *Zea mays*. Durch die umfangreiche Analyse Mutator-induzierter Mutantenlinien und das Auftreten eines „*etched1*-ähnlichen“ Phänotyps in *Etched1*-transgenen Pflanzen, konnte gezeigt werden, daß Mutationen des *Etched1* Gens mit *etched1*-Phänotypen korrelieren. Das putative ET1-Protein könnte in die Regulation der frühen Plastidenentwicklung in Körnern und Blättern, möglicherweise als Komponente des TAC-Komplexes, involviert sein. Somit könnte das ET1-Protein an Metabolismen beteiligt sein, die direkt oder indirekt in die Plastidenentwicklung eingreifen. Es sind aber noch weitere vertiefende Analysen nötig, um die Art der Interaktion des *Etched1* Genproduktes innerhalb der Plastidenentwicklung näher charakterisieren zu können.

6 Literatur

Ahrend, M., 1988 Molekulare Analyse der *etched1-reference* Mutante von *Zea mays* L. Diplomarbeit, AMPI, Universität Hamburg

Alberts, B., Bray, D., Lewis J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J. D., 1995, Molekularbiologie der Zelle, VCH, Weinheim - New York - Basel - Cambridge - Tokyo

Annweiler, A., Hipskind, A. Wirth, T., 1991, A strategy for efficient *in vitro* translation of cDNAs using the rabbit beta-globin leader sequence, *Nucleic Acid Res.* **19**, 3750

Awrey, D.E., Shimasaki, N., Koth, C. Weilbaecher, R., Olmsted, V., Kazanisi, S., Shani, X., Arellano, J., Arrowsmith, E. H., Kane, C. M., Edwards, A.M., 1998, Yeast Transcript Elongation Factor (TFIIS), Structure and FunctionII: RNA POLYMERASE BINDING, TRANSCRIPT CLEAVAGE AND READ-THROUGH, *J. Biol.Chem.* **273 (35)**, August 28, 22595-605

Bradford, M., 1976, A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding, *Anal. Biochem.* **72**: 248-254

Chang, M.T., Neuffer M.G., 1994, Endosperm-Embryo interaction in maize. *Maydica* **39**: 9-18

Chédin, S., Riva, M., Schultz, P., Senetac, A., Carles, C., 1998, The RNA cleavage activity of RNA polymerase III is mediated by essential TFIIS-like subunit and is important for transkription termination., *Genes Dev.* **12**, 3857-71

Chen, H.T., Legault, P., Glushka, J., Omichinski, J. G., Scott, R. A., Structure of a (Cys³His) zinc ribbon, a ubiquitous motif in archeal and eucaryal transcription, *Protein Sci.*, Sep., **9(9)**, 1743-52

Chomet, P.S. , 1994, Transposon Tagging with Mutator. In: The Maize Handbook, Freeling, M. Walbot, V., Eds. Springer-Verlag, New York, Inc., pp 243-249

Coe, E. H. Jr., Neuffer, G. F., Sprague, M. G., 1988, The genetics of Corn, in *Corn and Corn Improvement* third edition, American Society of Agronomy Madison, 139-223

Cline, K., Henry, R., 1996, Import and Routing of Nucleus-Encoded Chloroplast Proteins, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **12** : 1-26

Czihak, G., Langer, H., Ziegler, H., 1990, *Biologie: Ein Lehrbuch*, Springer- Verlag, Berlin – Heidelberg - New York - Tokyo

da Costa é Silva, O., Garg, P., Waßmann, M., Lorbiecke, R., Lauert, P., Scanlon, M., Hsia, A.-P., Schnable P. S., Wienand, U., 2002, The *Etched1* gene product of *Zea mays* L. encodes a zinc-finger protein with homology to the eukaryotic transcription elongation factor TFIIS (Manuskript eingereicht)

De Boer A. Douwe, Weisbeek, Peter J., 1991, Chloroplast protein topogenesis: import, sorting and assembly, *Biochimica et Biophysica Acta* **1071**: 221-253

Dellaporta, S. L., Wood, J., Hicks, B.C., 1983, A plant DNA Miniprep: Version II, in *Plant Mol. Biol.* **4**, 419-421

Dietrich, C. R., Cui, F., Packila, M. L., Li, J., Ashlock, D. A., Nikolau, B. J., Schnable, P. S., 2002, Maize *Mu* Transposons Are Targeted to the 5' Untranslated Region of the *gl8* Gene and Sequences Flanking *Mu* Target-Site Duplications Exhibit Nonrandom Nucleotide Composition Throughout the Genome, *Genetics*, **160**: 697-716

Fiedler, U., Timmers, H.Th. M., 2001 Analysis of the open region of RNA polymerase II transcription complexes in the early phase of elongation, *Nucleic Acids Research* **29** (13), 2706-2714

Frey, M., Stettner, C., Gierl, A., 1998, A general method for gene isolation in tagging approaches: Amplification of Insertion Mutagenized Sites (AIMS), *The Plant Journal* **13**(5), 717-721

Gall, J. G., Bellini, M., Wu, Z., 1999, Assembly of the Nuclear Transcription and Processing Machinery: Cajal Bodies (Coiled Bodies) and Transcriptosomes, *Molbiolcell* **10(12)**, 4385-4402

Garg, P., 2002, Molecular Characterisation of the *et1* gene of *Zea mays* L, Dissertation, Universität Hamburg

Gaut, B. S., Le Thierry d'Ennequin, M., Peek, A. S., Sawkins, M. C., 2000, Maize as a model for the evolution of plant nuclear genomes, *PNAS* **97(13)**, 7008-7015

Hausner, W., Lange, U., Musfeldt, M., 2000, Transcription Factor S, a Cleavage Induction Factor of the Archaeal RNA Polymerase, *J. Biol. Chem.* **275 (17)**, 12393-99

Hemleben, Vera (1990): *Molekularbiologie der Pflanzen*, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart

Howe, C. J., 1996, RNA Polymerases and plastid evolution, *Trends Plant Sci.*, Okt., **1 (10)**, 323-324

Hudson A., Carpenter R., Doyle S., Coen E.S., 1993, *Olive*: a key gene required for chlorophyll biosynthesis in *Antirrhinum majus*. *The EMBO Journal* **12(10)**: 3711-3719

Humbeck, K., Melis, A., Krupinska, K., 1994, Effects of Chilling on Chloroplast Development in Barley Primary Foliage Leaves, *Plant Physiol.* **143**: 744-749

Keddie, J. S., Carroll, B., Jones J. D.G., Grissem, W., 1996, The *DCL* gene of tomato is required for chloroplast development and palisade cell morphogenesis in leaves, 1996, *The EMBO Journal* **15(16)**: 4208-4217

Khan, A. A., Tao, K.-L., 1977, Hormonal regulation of nucleic acids and proteins in germination. In Khan, A. A.: *The Physiology and Biochemistry of Seed Dormancy and Germination*, pp. 413-426. Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam, Niederlande

- Kiesselbach T.A., 1980, The structure and reproduction of corn. *University of Nebraska Press, Lincoln and London, Research Bulletin 161*
- Knight, J. S., Madueno, F., Gray, J. C., 1993, Importing and sorting of proteins by chloroplasts. *Biochem Soc. Trans.* **21(1)**: 31-36
- Krupinska, K., Falk, J., 1994, Changes in RNA-Polymerase Activity during Biogenesis Maturation and Senescence of Barley Chloroplasts. Comparative Analysis of Transcripts Synthesized Either in Run-on Assays or by Transcriptionally Active Chromosomes, *J. Plant Physiol.* **143**, 298-305
- Kulish, D., Struhl, K., 2001, TFIIIS Enhances Transcriptional Elongation through an Artificial Arrest Site In Vivo, *Mol. Cell Biol.* **21(13)**, 4162-4168
- Mayer, A. M., Poljakoff-Mayber, A., 1982, The germination of seeds, 3. Auflage *Pergamon Press Ltd., Oxford, London*
- Markov, D., Naryshkina, T., Mustaev, A., Severinov, K., 1999, A zinc-binding site in the largest subunit of DNAdependent RNA polymerase is involved in enzyme assembly, *Genes Dev.* **13**, 2439-48
- Meshi, T., Iwabuchi, M., 1995, Plant Transcription Factors, *Plant Cell Physiol.* **36(8)**, 1405-1420
- Nakanishi, T., Shimoaraiso, M., Kuvo, T., Natori, S., 1995, Structure-Function Relationship of Yeast S-II in Terms of Stimulation of RNA Polymerase II, Arrest Relief and Suppression of 6-Azauracil Sensitivity. *J. Biol. Chem.* **270**, 8991-95
- Olmstedt, V. K., Awrey, D. E., Koth, C., Shan, X., Morin, P. E., Kazanis, S., Edwards, A. M., Arrowsmith, C. H., 1998, Yeast transcript Elongation Factor (TFIIIS), Structure and Funktion, *J.Biol.Chem.*, Aug. 28, **273 (35)**, 22589-94
- Olsen, O.-A., Brown, R. C., Lemmon, B. E., 1995, Pattern and process of wall formation in developing endosperm. *BioEssays* **17(9)**: 803-812

- Oppenheimer, D. G., Pollock, M. A., Vacik, J., Szymanski, D. B., Ericson, B., Feldman, B. K., Marks, D. M., 1997, Essential role of a kinesin-like protein in Arabidopsis trichome morphogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci* **94**: 6261-6266
- Powell, W., Bartholomew, B., Reines, D., 1996, Elongation factor SII Contacts the 3'-End of RNA Polymerase II Elongation Complex. *J. Biol. Chem.* **271** (37), 22301-04
- Quia, X., Jeon, C., Yoon, H.-S., Weiss, M. A., 1993, Structure of a new nucleic-acid-binding motif in eukaryotic transcriptional elongation factor TFIIS, *Natur*, Sep., 16, 365, 277-279
- Racchi, M.L., Chiusi, A.P., Bagnoli, F., Manzocchi, L.A., 1997, Characterization of maize defective kernel (dek) mutants affecting seed germination. *Maydica* **41**: 271-277
- Ramesh, S.V., .Santha Kumari, A., Reddy A.R., 1984, Photoacoustic and physiological studies on a maize mutant: A delay in leaf pigment synthesis in virescent seedlings. *Biochemistry International* **8(1)**: 121-128
- Richter, G., 1998, Stoffwechselfysiologie der Pflanzen, Georg Thieme Verlag Stuttgart - New York
- Robinson, C., 1994 The assembly of chloroplasts. *Subcell Biochem.***22**: 183-198
- Sangeetha, H.G., Ramesh, S.V., Jayaram, Ch., Reddy, A.R., 1991, Studies on chlorophyll and protein accumulation in thylakoids and chloroplast development in virescent seedlings of maize mutant. *Biochemistry International* **12(2)**: 181-188
- Sangeetha, H.G., Reddy, A.R., 1988, The effect on the *etched* (*et*) mutation on the amylolytic enzyme activities in germinating kernels and seedlings of *Zea mays*. *Theor. Appl. Genet.* **76**: 381-384
- Sangeetha, H.G., Reddy, A.R., 1991, Genetic and biochemical analysis of the *etched* (*et*) mutant of *Zea mays* L., *Maydica* **36**: 343-354

- Scanlon, M. J., Stinard, P. S., James, M. G., Myers, A. M., Robertson, D. S., 1994, Charakterization of ten mutations of the maize *Etched-1* locus. *Maydica* **39**:301-308
- Scanlon, M. J., Stinard, P. S., James, M. G., Myers, A. M., Robertson, D. S., 1994, Genetic analysis of 63 mutations affecting maize kernel development isolated from *mutator* stocks. *Genetics* **136**: 281-294
- Schultes, N. P., Brutnell, T. P., Allen, A., Dellaporta, S. L., Nelson, T., Chen, J., 1996, *Leaf permease1* gene of maize is required for chloroplast development. *The Plant Cell* **8**: 463-475
- Shilatifard, A., 1998, Factors regulating the transcriptional elongation activity of RNA polymerase II, *FASEB J.* **12**, 1437-46
- Shimasaki, N. B., Kane, C. M., 2000, Structural Basis for the Species-specific Activity of TFIIS, *J. Biol. Chem.* **275(47)**, 36541-36549
- Smeekens, S., Weisbeek, P., Robinson, C., 1990, Protein transport into and within chloroplasts, *Trends Biochem Sci.* **15(2)**: 73-76
- Stern, D. B., Higgs, D. C., Yang, J., 1997, Transcription and translation in chloroplasts, *Trends Plant Sci.*, Aug., **2 (8)**, 308-315
- Stinard, P., S., Robertson, D, S., 1986, The *etched1* A mutant of maize, *Biochemistry International* **12(2)**: 2-13
- Stinard, P., Scanlon, M., Schnable, P., 1994, *etched2 (et2)*, a new etched endosperm/albino seedling mutant, is located on 2S, *Maize News Letter*, **68**: 107-108
- Strickberger Monroe, W., 1988, Genetik, Carl Hauser Verlag München - Wien
- Stryer, L., 1994, Biochemie, Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg – Berlin - Oxford

Waegemann, K., Soll, J., 1996, Phosphorylation of the Transit Sequence of Chloroplast Precursor Proteins, *J. Biol. Chem.* **271** (11), 6545-54

Wang, B., Jones, D., Kaine, B. P., Weiss, M. A., 1998, High-resolution structure of an archeal zinc ribbon defines a general architectural motif in eukaryotic RNA polymerases, *Structure* **6** (5), 555-559

Wienand, U., Sommer, H., Schwarz, Z., Shepherd, N., Saedler, H., Kreuzaler, F., Ragg, H., Fautz, E., Hahlbrock, K., Harrison, B., Peterson, P.A., 1982, A general method to identify plant structural genes among genomic DNA clones using transposable element- induced mutations, *Mol. Gen. Genet.* **187**: 195-201

Wind, M., Reines, D., 2000, Transcription elongation factor SII, *BioEssays* **22**(4), 327-336

Yanagisawa, S., 1995, A novel DNA-binding domain that may form a single zinc finger motif, *Nucleic Acids Res.* **23** (17), 3403-3410

7 Anhang

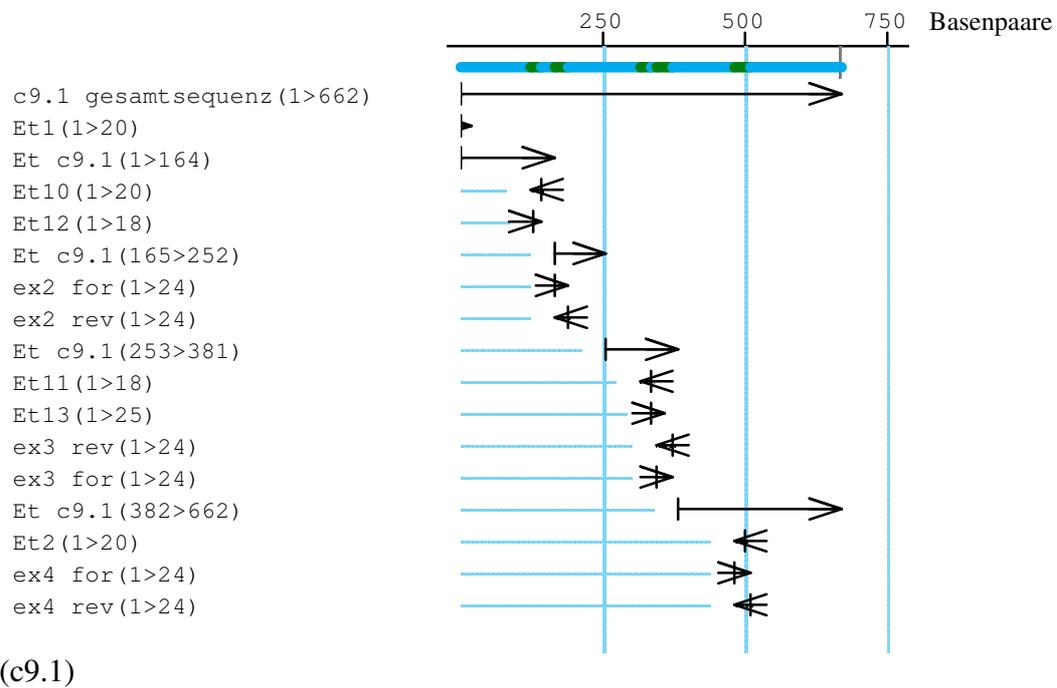
7.1 Darstellung der Positionen der verwendeten Primer innerhalb der *Etched1*cDNA von LC

Abb.48

7.2 Darstellung der Positionen der verwendeten Primer innerhalb der genomischen *EtI*-DNA (LC)

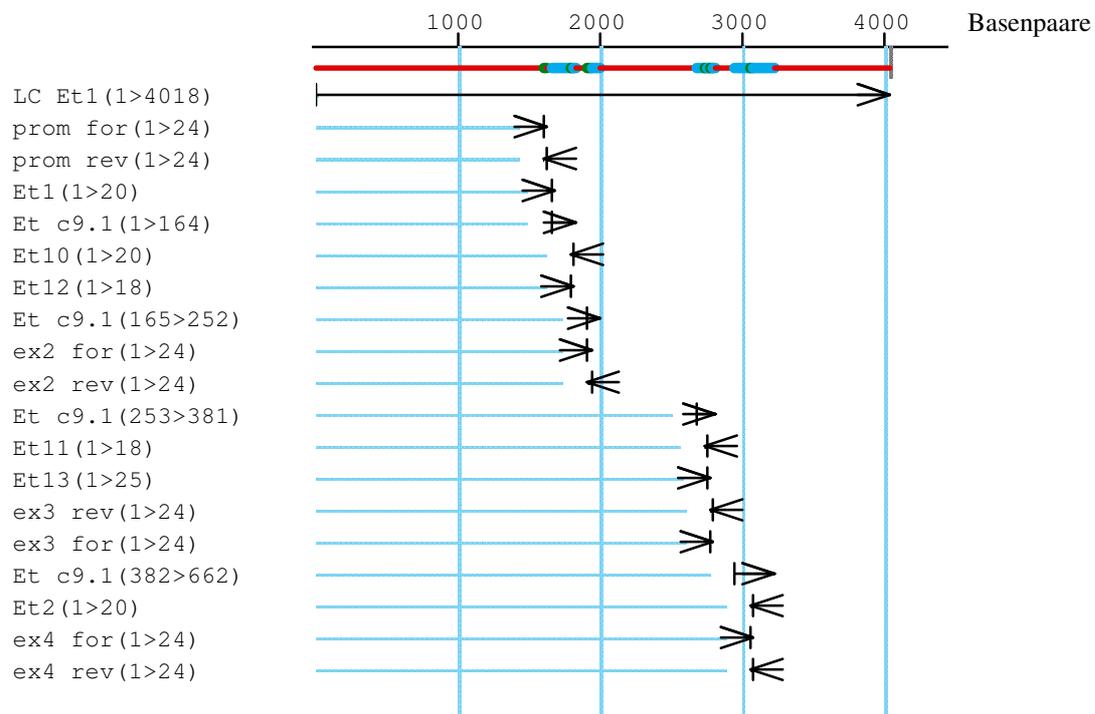


Abb. 49

7.3 Meßergebnisse zu 3.4.1

Bestimmung der Chlorophyllfluoreszenz als Parameter für die Aktivität des Photosystems II

Linie	Blatt Nummer	Größe Pflanze ca.	F0	Fv	Fmax	Fv Fmax
2389 LC 1	1	12.5 cm	11	18	29	0.62
2389 LC 1	2	12.5 cm	29	27	56	0.48
2389 LC 2	1	9 cm	38	56	94	0.59
2389 LC 2	2	-	-	-	-	-
2389 LC 3	1	8 cm	31	38	69	0.55
2389 LC 3	2	-	-	-	-	-
2389 LC 4	1	9 cm	24	40	64	0.63
2389 LC 4	2	9 cm	11	19	30	0.63
2389 LC 5	1	10 cm	23	40	63	0.63
2389 LC 5	2	10 cm	28	37	65	0.56
2389 LC 6	1	10 cm	25	43	68	0.63
2389 LC 6	2	10 cm	24	61	85	0,71
2389 LC 7	1	7.5 cm	37	49	86	0.57
2389 LC 7	2	7.5 cm	22	33	55	0.60
2389 LC 8	1	8.5 cm	35	48	83	0.58
2389 LC 8	2	8.5 cm	23	38	61	0.62
2389 LC 9	1	7 cm	31	38	69	0.55
2389 LC 9	2	7 cm	31	36	67	0.54

<i>etl-ref 1/1</i>	1	11 cm	32	39	71	0.55
<i>etl-ref 1/2</i>	2	11 cm	29	32	61	0.52
<i>etl-ref 1/3</i>	3	11 cm	19	13	32	0.41
<i>etl-ref 2/1</i>	1	11.5 cm	33	37	70	0.53
<i>etl-ref 2/2</i>	2	11.5 cm	27	30	57	0.53
<i>etl-ref 2/3</i>	3	11.5 cm	12	14	26	0,54
<i>etl-ref 3/1</i>	1	12 cm	37	39	76	0.51
<i>etl-ref 3/2</i>	2	12 cm	18,5	62,5	81	0.52
<i>etl-ref 3/3</i>	3	12 cm	18	17	35	0.49
<i>etl-ref 4/1</i>	1	11 cm	29	24	53	0.45
<i>etl-ref 4/2</i>	2	11 cm	29	19	48	0.40
<i>etl-ref 4/3</i>	3	11 cm	14	9	25	0.36
<i>etl-ref 5/1</i>	1	9 cm	32	38	70	0.54
<i>etl-ref 5/2</i>	2	9 cm	23	24	47	0.51
<i>etl-ref 5/3</i>	3	9 cm	15	13	28	0.46
<i>etl-ref 6/1</i>	1	11.5 cm	36	35	71	0.49
<i>etl-ref 6/2</i>	2	11.5 cm	33	31	64	0.48
<i>etl-ref 6/3</i>	3	11.5 cm	14	9	25	0.36
<i>etl-ref 7/1</i>	1	9 cm	31	36	67	0.54
<i>etl-ref 7/2</i>	2	9 cm	27	27	54	0.50
<i>etl-ref 8/1</i>	1	10 cm	31	36	67	0.54
<i>etl-ref 8/2</i>	2	10 cm	33	34	67	0.51
<i>etl-ref 9/1</i>	1	7 cm	38	34	72	0.47
<i>etl-ref 9/1</i>	2	7 cm	35	25	60	0.42

A188xB73 1/1	1	18 cm	22	44	66	0.67
A188xB73 1/2	2	18 cm	22	43	65	0.66

A188xB73 2/1	1	16 cm	28	50	78	0.64
A188xB73 2/2	2	16 cm	29	47	76	0.62
A188xB73 3/1	1	17 cm	19	47	66	0.71
A188xB73 3/2	2	17 cm	22	49	71	0.69
A188xB73 4/1	1	16 cm	19	46	65	0.71
A188xB73 4/2	2	16 cm	23	44	67	0.66
A188xB73 5/1	1	14 cm	22	44	66	0.66
A188xB73 5/2	2	14 cm	25	46	71	0.65

A188 1	1	11 cm	30	40	70	0.57
A188 1	2	11 cm	27	37	64	0.57
A188 2	1	11 cm	31	44	75	0.59
A188 2	2	11 cm	40	52	92	0.57
A188 3	1	11.5 cm	28	43	71	0.61
A188 3	2	11.5 cm	24	32	56	0.57
A188 4	1	9.5 cm	43	45	88	0.51
A188 4	2	9.5 cm	38	40	78	0.51
A188 5	1	8 cm	32	56	88	0.64
A188 5	2	8 cm	33	50	83	0.60

Pa91 1	1	11.5 cm	27	51	78	0.65
Pa91 1	2	11.5 cm	31	46	77	0.59
Pa91 2	1	12 cm	27	53	80	0.66
Pa91 2	2	12 cm	31	47	78	0.60
Pa91 3	1	10 cm	37	54	91	0.58
Pa91 3	2	-	-	-	-	-
Pa91 4	1	9 cm	42	52	94	0.55
Pa91 4	2	-	-	-	-	-
Pa91 5	1	9 cm	24	45	69	0.65
Pa91 5	2	9 cm	23	38	61	0.62

H99 1	1	-	-	-	-	-
H99 1	2	-	-	-	-	-
H99 2	1	10 cm	27	47	74	0.64
H99 2	2	-	-	-	-	-
H99 3	1	9 cm	25	49	74	0.66
H99 3	2	-	-	-	-	-
H99 5	1	-	-	-	-	-
H99 5	2	-	-	-	-	-

Transgene Linien pAct*Etched1*-Sense neg. 2395,
pAct*Etched1*-Sense positiv 2396 und 2397

2395 1	1	10 cm	24	47	71	0.66
95 1	2	10 cm	21	39	60	0.65
95 2	1	11 cm	27	48	75	0.64
95 2	2	11 cm	26	41	67	0.62
95 3	1	7 cm	39	47	86	0.55
95 3	2	-	-	-	-	-
95 4	1	9 cm	32	56	88	0.64
95 4	2	9 cm	28	43	71	0.61
95 5	1	-	-	-	-	-
95 5	2	-	-	-	-	-

2396 1	1	9 cm	24	47	71	0,66
96 2	2	9 cm	21	39	60	0.65
96 2	1	9.5 cm	32	48	80	0.55
96 2	2	9.5 cm	29	42	71	0.59
96 3	1	10 cm	29	46	75	0.61
96 3	2	10 cm	25	37	62	0.60
96 4	1	-	-	-	-	-
96 4	2	-	-	-	-	-
96 5	1	-	-	-	-	-
96 5	2	-	-	-	-	-

2397 1	1	8.5 cm	25	32	57	0.56
97 1	2	8.5 cm	32	38	70	0.54
97 2	1	10 cm	35	46	84	0.54
97 2	2	10 cm	28	37	65	0.56
97 3	1	14 cm	31	47	78	0.60
97 3	2	14 cm	32	38	70	0.54
97 4	1	12.5 cm	30	40	70	0.57
97 4	2	12.5 cm	36	51	86	0.59
97 5	1	9 cm	32	40	72	0.55
97 5	2	9 cm	30	40	70	0.57

Tabelle 11



Abbildung 50 Meßwerte der Chlorophyll-Fuoreszenz, mittels PAM gemessen, dargestellt. Gemessen wurden LC, *etl-ref* und Linien aller Wildtyppflanzen, die als Grundlage zur Herstellung transgener Pflanzen dienen. Außerdem wurden drei Linien transgener Pflanzen ebenfalls auf eine Änderung ihrer Reaktivität des Photosystem II untersucht. Diese Linien waren eine Kontroll-Linie, die kein *ActinEtched1*-Sense Konstrukt enthielt (2395 hier als 95... dargestellt), eine Linie, die nachweislich genotypisch transgen war, und deren T1-Generation einen *etched1*-Phänotyp zeigte (2396 hier 96..) und eine Linie, die positiv auf das Transgen getestet wurde, aber in der T1 und folgenden Generationen keinen ungewöhnlichen Phänotyp zeigte (2397 hier 97..)

Danksagung

Der größte Dank gilt Prof. Dr. Udo Wienand, der es mir ermöglichte meine Doktorarbeit an diesem wirklich interessanten Maisgen durchzuführen.

Vielen Dank auch für die geleistete Lesearbeit an meinen Zweitgutachter Prof. Dr. Schäfer. Außerdem möchte ich Dr. Karsten Frenzel für so manche technische und vor allem moralische Unterstützung und Aufmunterungen danken. Ebenso danke ich Dr. Preeti Garg, die mir viele interessante Tipps und Hinweise zu „unserem“ *EtchedI* geben konnte. Natürlich gilt mein Dank auch Dr. Oswaldo da Costa é Silva. Er war derjenige, der mich während der Diplomarbeit in das *etchedI* Thema sehr gut einarbeitete, so dass ich letztendlich weiter daran arbeiten wollte. Dank gibt's auch für Dr. Reinhold Brettschneider, der sich immer als freundlicher, kompetenter Ansprechpartner in „meinem“ Labor gezeigt hat und den größten Anteil bei der Herstellung der transgenen Pflanzen geleistet hat. Ein großes Dankeschön auch für Dr. René Lorbiecke. Er hatte viele Anregungen zum Thema *etchedI*-Mutation. Außerdem ist er ein wirklich kompetenter Korrekturleser. Vielen Dank auch an die beiden „Kleinen“ Carina Paul und Katja Müller, die mir die Zeit im Büro sehr angenehm gemacht haben. Auch die älteren „Mädels“ haben viele nette Gesprächsrunden abgerundet. Ich danke daher Dr. back Edelgard Brinkmann nicht nur für unzählige Torten und Kuchen und Dr. sek Elke Peleikis für die gelegentliche Übernahme von, von mir nicht unbedingt geliebten, bürokratischen Bestellpflichten, sondern auch für manchen Rat. Großer Dank gilt auch Ulrike Peters, die öfter wichtige Beiträge zur Logistik meiner Versuchsplanung geliefert hat. Ferner danke ich auch Markus Herrmann für unzählige gesungene Sequenzen...

Insgesamt war die Zeit innerhalb der Arbeitsgruppe das Beste was mir wohl passieren konnte. Ich danke daher auch den vielen Ehemaligen, die ich seit meinem ersten Hi-Wi- Job im Herbst 1996 in der AMPI- Gruppe kennen lernen durfte, wie Dr. Sabine Klaussen, Dr. Inka Pusch, Dr. Katja Warnke, Dr. Natascha Tehen, Dr. Jelena Kirsch, Dr. Susanne Hansen, Sylke Wahlandt und vielen anderen, die diesen Rahmen sprengen würden. Ich hatte selten so viel Spaß und ergiebige Gespräche wie in Frühstückspausen, bei Mensaessen und den privaten Einladungen meiner Kollegen!

Ganz besonders danken möchte ich meiner Mutter, die mich immer verständnisvoll aufgemuntert hat, und meinem Mann Gerhard, der mich in jeder Hinsicht liebevoll bei diesem langwierigen Projekt unterstützt hat.

Lebenslauf

Name: Martina Waßmann, geb. Ahrend
Geboren: 26. Oktober 1968 in Hamburg
Familienstand: verheiratet

Bildungsweg:

1974-1980 Grundschule Imstedt in Hamburg
1980-1987 Gymnasium Krausestraße in Hamburg
Abitur

Berufliche Ausbildung und Berufstätigkeit:

1988-1990 Ausbildung zur Chemielaborantin, Chemikon GmbH, Hamburg
1988-1991 Ausbildung zur Chemielaborantin, NTL-Forschung, Schenefeld
b. Hamburg
1991-1993 Chemielaborantin, Allergopharma Joachim Ganzer KG, Reinbek
bei Hamburg

Studium:

1993-1998 Studium Biochemie/Molekularbiologie an der Universität
Hamburg, Schwerpunkte Biochemie/Molekularbiologie,
Mikrobiologie, Molekulare Medizin, Diplomarbeit in der
Arbeitsgruppe Angewandte Molekularbiologie der Pflanzen I im
Institut für Allgemeine Botanik, Abschluß Diplom
1999-2002 Promotion in der Arbeitsgruppe Angewandte Molekularbiologie
der Pflanzen im Institut für Allgemeine Botanik

Nebentätigkeiten:

WS 1996/97 Studentische Hilfskraft in der Abteilung AMPI
Inst. f. Allg. Botanik

Präsentationen:

26.2.02-1.3.02 15.Tagung „Molekularbiologie der Pflanzen“; Dabringhausen,
Vortrag zum Thema: Das *Etched1* Gen aus *Zea mays L.* kodiert
für ein Protein mit Homologie zum eukaryotischen
Transkriptions-Elongations-Faktor TFIIIS

Hiermit versichere ich, diese Arbeit mit keiner weiteren als der angegebenen Hilfe selbständig verfaßt zu haben. Ich habe keine anderen als die angeführten Quellen und Hilfsmittel verwendet und die den benutzten Quellen entnommenen Textstellen und Inhalt als solche kenntlich gemacht.

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

Hamburg, den 11. November 2002

Martina Waßmann